

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-530867

(P2015-530867A)

(43) 公表日 平成27年10月29日 (2015. 10. 29)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B 0 2 4
C 0 7 K 16/40 (2006.01)	C 0 7 K 16/40 Z N A	4 B 0 6 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B 0 6 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C 0 7 6
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 C 0 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 119 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2015-517471 (P2015-517471)
 (86) (22) 出願日 平成25年6月14日 (2013. 6. 14)
 (85) 翻訳文提出日 平成27年2月10日 (2015. 2. 10)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2013/046032
 (87) 国際公開番号 W02013/188855
 (87) 国際公開日 平成25年12月19日 (2013. 12. 19)
 (31) 優先権主張番号 61/660, 605
 (32) 優先日 平成24年6月15日 (2012. 6. 15)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/786, 280
 (32) 優先日 平成25年3月14日 (2013. 3. 14)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 509012625
 ジェネンテック, インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウス
 サンフランシスコ ディーエヌエー
 ウェイ 1
 (74) 代理人 100109726
 弁理士 園田 吉隆
 (74) 代理人 100101199
 弁理士 小林 義教
 (72) 発明者 ウー, イェン
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 940
 80-4990, サウス サンフランシ
 スコ, ディーエヌエー ウェイ 1

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗PCSK9抗体、製剤、投薬、及び使用方法

(57) 【要約】

本発明は、抗PCSK9抗体、製剤、投与レジメン、及びそれを使用する方法を提供する。

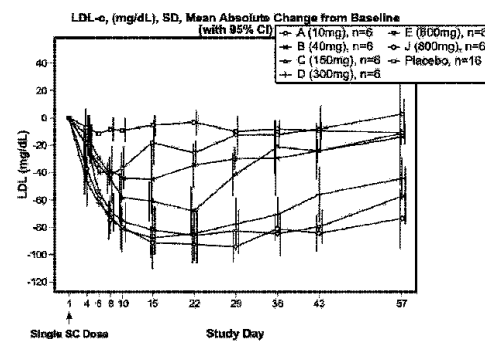


FIGURE 16

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

6つの超可変領域（HVR）配列、すなわち：

（i） X_1 は S 又は T であり； X_2 は G、R 又は S であり； X_3 は H、T 又は Y であり； X_4 は A 又は T である、G F T F $X_1 X_2 X_3 X_4$ I H（配列番号 28）を含む HVR-H1；

（i i）R I S P A N G N T N Y A D S V K G（配列番号 4）を含む HVR-H2；

（i i i）W I G S R E L Y I M D Y（配列番号 5）を含む HVR-H3；

（i v） X_1 は S 又は T である、R A S Q D V S X_1 A V A（配列番号 29）を含む HVR-L1；

（v） X_1 は F 又は S である、S A S X_1 L Y S（配列番号 30）を含む HVR-L2；及び

（v i） X_1 は P、R 又は T であり； X_2 は A、I、S 又は T であり； X_3 は L、P 又は Q であり； X_4 は A、H、P 又は S である、Q Q A Y $X_1 X_2 X_3 X_4$ T（配列番号 37）を含む HVR-L3

を含む、重鎖及び軽鎖可変ドメインを含む抗 P C S K 9 抗体。

【請求項 2】

（a）配列番号 1、配列番号 2 又は配列番号 3 のアミノ酸配列を含む HVR-H1、（b）配列番号 4 のアミノ酸配列を含む HVR-H2、及び（c）配列番号 5 のアミノ酸配列を含む HVR-H3 を含む、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 3】

（a）配列番号 6 又は配列番号 7 のアミノ酸配列を含む HVR-L1、（b）配列番号 8 又は配列番号 26 のアミノ酸配列を含む HVR-L2、及び（c）配列番号 33 のアミノ酸配列を含む HVR-L3 を更に含む、請求項 2 に記載の抗体。

【請求項 4】

（a）配列番号 6 又は配列番号 7 のアミノ酸配列を含む HVR-L1、（b）配列番号 8 又は配列番号 26 のアミノ酸配列を含む HVR-L2、及び（c）配列番号 33 のアミノ酸配列を含む HVR-L3 を含む、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 5】

（1）配列番号 3 のアミノ酸配列を含む HVR-H1；
（2）配列番号 4 のアミノ酸配列を含む HVR-H2；
（3）配列番号 5 のアミノ酸配列を含む HVR-H3；
（4）配列番号 7 のアミノ酸配列を含む HVR-L1；
（5）配列番号 8 のアミノ酸配列を含む HVR-L2；及び
（6）配列番号 33 のアミノ酸配列を含む HVR-L3

を含む、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 6】

配列番号 17 の VH 配列を含む、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 7】

配列番号 34 の VL 配列を含む、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 8】

配列番号 17 の VH、及び配列番号 34 の VL を含む、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 9】

モノクローナル抗体である、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 10】

ヒト化されている、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 11】

ヒト抗体である、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 12】

F a b、F a b'-SH、F v、s c F v 又は（F a b'）₂ 断片から選択される抗体

断片である、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 1 3】

フレームワーク配列の少なくとも一部分がヒトコンセンサスフレームワーク配列である、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 1 4】

(i) 配列番号 3 5 のアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号 3 6 のアミノ酸配列を含む軽鎖、(i i) 配列番号 3 5 のアミノ酸 1 ～ 4 5 0 を含む重鎖及び配列番号 3 6 のアミノ酸配列を含む軽鎖、(i i i) 配列番号 3 5 のアミノ酸 1 ～ 4 4 9 を含む重鎖及び配列番号 3 6 のアミノ酸配列を含む軽鎖、又は(i v) 配列番号 3 5 の P 4 4 9 がアミド化されている、(i)、(i i) 又は(i i i) のいずれか一つの重鎖及び軽鎖を含む、請求項 1 に記載の抗体。

10

【請求項 1 5】

(a) 配列番号 5 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3、(b) 配列番号 3 3 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3、及び(c) 配列番号 4 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 を含む、抗 P C S K 9 抗体。

【請求項 1 6】

配列番号 3 4 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含む、抗 P C S K 9 抗体。

【請求項 1 7】

請求項 1 から 1 6 のいずれか一項に記載の抗 P C S K 9 抗体をコードする単離された核酸。

20

【請求項 1 8】

請求項 1 7 に記載の核酸を含むベクター。

【請求項 1 9】

発現ベクターである、請求項 1 8 に記載のベクター。

【請求項 2 0】

請求項 1 8 又は 1 9 に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 2 1】

原核生物である、請求項 2 0 に記載の宿主細胞。

【請求項 2 2】

真核生物である、請求項 2 0 に記載の宿主細胞。

30

【請求項 2 3】

抗 P C S K 9 抗体を作成するための方法であって、抗 P C S K 9 抗体をコードする核酸の発現に適した条件下で請求項 2 0 に記載の宿主細胞を培養することを含む方法。

【請求項 2 4】

宿主細胞により産生される抗 P C S K 9 抗体を回収することを更に含む、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 5】

P C S K 9 抗体をコードする核酸の発現に適した条件下で請求項 2 0 に記載の宿主細胞を培養すること、及び宿主細胞によって産生された抗 P C S K 9 抗体を回収することを含む方法により産生される、抗 P C S K 9 抗体。

40

【請求項 2 6】

請求項 1 から 1 6 及び 2 5 のいずれか一項に記載の抗 P C S K 9 抗体、並びに薬学的に許容される担体を含む、薬学的組成物。

【請求項 2 7】

1 5 0 から 2 2 5 m g / m L の抗 P C S K 9 抗体、1 0 から 3 0 m M のヒスチジンアセテート、1 5 0 から 1 7 0 m M のアルギニンアセテート、0 . 0 1 % から 0 . 0 3 % のポリソルベート、及び 5 . 8 から 6 . 2 の p H を含む、薬学的組成物。

【請求項 2 8】

組成物中の抗 P C S K 9 抗体又は抗体断片は 2 0 0 m g / m L であり、組成物中のヒスチジンアセテートは 2 0 m M であり、組成物中のアルギニンアセテートは 1 6 0 m M であ

50

り、及び組成物中のポリソルベート 20 は 0.02% であり、pH は 6.0 である、請求項 27 に記載の組成物。

【請求項 29】

皮下投与に適している、請求項 27 に記載の組成物。

【請求項 30】

前記組成物の粘度が 25℃ で 10 cP である、請求項 27 から 29 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 31】

抗 PC SK 9 抗体が、

(i) X_1 は S 又は T であり； X_2 は G、R 又は S であり； X_3 は H、T 又は Y であり； X_4 は A 又は T である、GFTFX₁X₂X₃X₄I H（配列番号 28）を含む HVR-H1；

(ii) RISPANGNTNYADSVKG（配列番号 4）を含む HVR-H2；

(iii) WIGSRELYIMDY（配列番号 5）を含む HVR-H3；

(iv) X_1 は S 又は T である、RASQDV SX₁AVA（配列番号 29）を含む HVR-L1；

(v) X_1 は F 又は S である、SASX₁LYS（配列番号 30）を含む HVR-L2；及び

(vi) X_1 は P、R 又は T であり； X_2 は A、I、S 又は T であり； X_3 は L、P 又は Q であり； X_4 は A、H、P 又は S である、QQSYX₁X₂X₃X₄T（配列番号 31）又は QQAYX₁X₂X₃X₄T（配列番号 37）を含む HVR-L3

からなる群から選択される、1、2、3、4、5、又は 6 つの超可変領域（HVR）配列を含む可変ドメインを含む、請求項 27 から 30 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 32】

抗 PC SK 9 抗体が、以下の 6 つの超可変領域（HVR）配列、すなわち：

(i) X_1 は S 又は T であり； X_2 は G、R 又は S であり； X_3 は H、T 又は Y であり； X_4 は A 又は T である、GFTFX₁X₂X₃X₄I H（配列番号 28）を含む HVR-H1；

(ii) RISPANGNTNYADSVKG（配列番号 4）を含む HVR-H2；

(iii) WIGSRELYIMDY（配列番号 5）を含む HVR-H3；

(iv) X_1 は S 又は T である、RASQDV SX₁AVA（配列番号 29）を含む HVR-L1；

(v) X_1 は F 又は S である、SASX₁LYS（配列番号 30）を含む HVR-L2；及び

(vi) X_1 は P、R 又は T であり； X_2 は A、I、S 又は T であり； X_3 は L、P 又は Q であり； X_4 は A、H、P 又は S である、QQSYX₁X₂X₃X₄T（配列番号 31）又は QQAYX₁X₂X₃X₄T（配列番号 37）を含む HVR-L3

を含む重鎖及び軽鎖可変ドメインを含む、請求項 27 から 30 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 33】

抗体が、(a) 配列番号 1、配列番号 2 又は配列番号 3 のアミノ酸配列を含む HVR-H1、(b) 配列番号 4 のアミノ酸配列を含む HVR-H2、及び (c) 配列番号 5 のアミノ酸配列を含む HVR-H3 を含む、請求項 32 に記載の組成物。

【請求項 34】

抗体が、(a) 配列番号 6 又は配列番号 7 のアミノ酸配列を含む HVR-L1；(b) 配列番号 8 又は配列番号 26 のアミノ酸配列を含む HVR-L2；及び (c) 配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 14 又は配列番号 33 のアミノ酸配列を含む HVR-L3 を更に含む、請求項 33 に記載の組成物。

【請求項 35】

抗体が、(a) 配列番号 6 又は配列番号 7 のアミノ酸配列を含む HVR-L1；(b)

配列番号 8 又は配列番号 26 のアミノ酸配列を含む HVR-L2 ; 及び (c) 配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 14 又は配列番号 33 のアミノ酸配列を含む HVR-L3 を含む、請求項 32 に記載の組成物。

【請求項 36】

抗体が、

- (1) 配列番号 1 のアミノ酸配列を含む HVR-H1 ;
- (2) 配列番号 4 のアミノ酸配列を含む HVR-H2 ;
- (3) 配列番号 5 のアミノ酸配列を含む HVR-H3 ;
- (4) 配列番号 7 のアミノ酸配列を含む HVR-L1 ;
- (5) 配列番号 8 のアミノ酸配列を含む HVR-L2 ; 及び
- (6) 配列番号 10 のアミノ酸配列を含む HVR-L3

を含む、請求項 32 に記載の組成物。

10

【請求項 37】

抗体が、

- (1) 配列番号 1 のアミノ酸配列を含む HVR-H1 ;
- (2) 配列番号 4 のアミノ酸配列を含む HVR-H2 ;
- (3) 配列番号 5 のアミノ酸配列を含む HVR-H3 ;
- (4) 配列番号 7 のアミノ酸配列を含む HVR-L1 ;
- (5) 配列番号 8 のアミノ酸配列を含む HVR-L2 ; 及び
- (6) 配列番号 11 のアミノ酸配列を含む HVR-L3

を含む、請求項 32 に記載の組成物。

20

【請求項 38】

抗体が、

- (1) 配列番号 2 のアミノ酸配列を含む HVR-H1 ;
- (2) 配列番号 4 のアミノ酸配列を含む HVR-H2 ;
- (3) 配列番号 5 のアミノ酸配列を含む HVR-H3 ;
- (4) 配列番号 7 のアミノ酸配列を含む HVR-L1 ;
- (5) 配列番号 8 のアミノ酸配列を含む HVR-L2 ; 及び
- (6) 配列番号 12 のアミノ酸配列を含む HVR-L3

を含む、請求項 32 に記載の組成物。

30

【請求項 39】

抗体が、

- (1) 配列番号 3 のアミノ酸配列を含む HVR-H1 ;
- (2) 配列番号 4 のアミノ酸配列を含む HVR-H2 ;
- (3) 配列番号 5 のアミノ酸配列を含む HVR-H3 ;
- (4) 配列番号 7 のアミノ酸配列を含む HVR-L1 ;
- (5) 配列番号 8 のアミノ酸配列を含む HVR-L2 ; 及び
- (6) 配列番号 13 のアミノ酸配列を含む HVR-L3

を含む、請求項 32 に記載の組成物。

40

【請求項 40】

抗体が、

- (1) 配列番号 1 のアミノ酸配列を含む HVR-H1 ;
- (2) 配列番号 4 のアミノ酸配列を含む HVR-H2 ;
- (3) 配列番号 5 のアミノ酸配列を含む HVR-H3 ;
- (4) 配列番号 7 のアミノ酸配列を含む HVR-L1 ;
- (5) 配列番号 8 のアミノ酸配列を含む HVR-L2 ; 及び
- (6) 配列番号 14 のアミノ酸配列を含む HVR-L3

を含む、請求項 32 に記載の組成物。

【請求項 41】

抗体が、

50

- (1) 配列番号3のアミノ酸配列を含むHVR-H1；
- (2) 配列番号4のアミノ酸配列を含むHVR-H2；
- (3) 配列番号5のアミノ酸配列を含むHVR-H3；
- (4) 配列番号7のアミノ酸配列を含むHVR-L1；
- (5) 配列番号8のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び
- (6) 配列番号33のアミノ酸配列を含むHVR-L3

を含む、請求項32に記載の組成物。

【請求項42】

抗体が、配列番号15、配列番号27、配列番号16又は配列番号17のVH配列を含む、請求項32に記載の組成物。

10

【請求項43】

抗体が、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23又は配列番号34のVL配列を含む、請求項32に記載の組成物。

【請求項44】

抗体が、配列番号15のVH配列、及び配列番号18のVL配列を含む、請求項32に記載の組成物。

【請求項45】

抗体が、配列番号15のVH配列、及び配列番号19のVL配列を含む、請求項32に記載の組成物。

【請求項46】

20

抗体が、配列番号27のVH配列、及び配列番号20のVL配列を含む、請求項32に記載の組成物。

【請求項47】

抗体が、配列番号16のVH配列、及び配列番号21のVL配列を含む、請求項32に記載の組成物。

【請求項48】

抗体が、配列番号17のVH配列、及び配列番号22のVL配列を含む、請求項32に記載の組成物。

【請求項49】

抗体が、配列番号27のVH配列、及び配列番号23のVL配列を含む、請求項32に記載の組成物。

30

【請求項50】

抗体が、配列番号17のVH配列、及び配列番号34のVL配列を含む、請求項32に記載の組成物。

【請求項51】

200から1200mgの範囲で個体に固定用量の抗体を送達するための、請求項26から50のいずれか一項に記載の組成物を含む皮下投与デバイス。

【請求項52】

プレフィルドシリンジである、請求項51に記載のデバイス。

【請求項53】

40

1-mLプレフィルドシリンジであり、プレフィルドシリンジ内の抗体濃度が200mg/mLである、請求項51に記載のデバイス。

【請求項54】

2.25-mLプレフィルドシリンジであり、プレフィルドシリンジ内の抗体濃度が200mg/mLである、請求項51に記載のデバイス。

【請求項55】

被検体においてLDLコレステロールのレベルを減少させる方法であって、請求項1から16及び25のいずれか一項に記載の抗PCSK9抗体、又は請求項26から50のいずれか一項に記載の組成物の有効量を被検体に投与することを含む方法。

【請求項56】

50

被検体においてコレステロール関連疾患を治療する方法であって、請求項 1 から 1 6 及び 2 5 のいずれか一項に記載の抗 P C S K 9 抗体、又は請求項 2 6 から 5 0 のいずれか一項に記載の組成物の有効量を被検体に投与することを含む方法。

【請求項 5 7】

被検体において高コレステロール血症を治療する方法であって、請求項 1 から 1 6 及び 2 5 のいずれか一項に記載の抗 P C S K 9 抗体、又は請求項 2 6 から 5 0 のいずれか一項に記載の組成物の有効量を被検体に投与することを含む方法。

【請求項 5 8】

抗 P C S K 9 抗体は、一回当たり 2 0 0 m g、3 8 0 m g、4 0 0 m g、6 0 0 m g、7 6 0 m g、又は 8 0 0 m g の用量で、4 週間ごと、6 週間ごと、8 週間ごと、1 0 週間ごと、又は 1 2 週間ごとに皮下投与される、請求項 5 5 から 5 7 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 5 9】

抗 P C S K 9 抗体は 2 0 0 m g で皮下投与される、請求項 5 8 に記載の方法。

【請求項 6 0】

抗 P C S K 9 抗体は 3 8 0 m g で皮下投与される、請求項 5 8 に記載の方法。

【請求項 6 1】

抗 P C S K 9 抗体は 4 0 0 m g で皮下投与される、請求項 5 8 に記載の方法。

【請求項 6 2】

抗 P C S K 9 抗体は 6 0 0 m g で皮下投与される、請求項 5 8 に記載の方法。

20

【請求項 6 3】

抗 P C S K 9 抗体は 7 6 0 m g で皮下投与される、請求項 5 8 に記載の方法。

【請求項 6 4】

抗 P C S K 9 抗体は 8 0 0 m g で皮下投与される、請求項 5 8 に記載の方法。

【請求項 6 5】

抗 P C S K 9 抗体は 4 週間ごとに投与される、請求項 5 9 から 6 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 6】

抗 P C S K 9 抗体は 6 週間ごとに投与される、請求項 5 9 から 6 4 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 6 7】

抗 P C S K 9 抗体は 8 週間ごとに投与される、請求項 5 9 から 6 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 8】

抗 P C S K 9 抗体は 1 0 週間ごとに投与される、請求項 5 9 から 6 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 9】

抗 P C S K 9 抗体は 1 2 週間ごとに投与される、請求項 5 9 から 6 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 0】

第二の医薬の有効量を被検体に投与することを更に含み、抗 P C S K 9 抗体が第一の医薬である、請求項 5 5 から 6 9 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 7 1】

第二の医薬が L D L R のレベルを上昇させる、請求項 7 0 に記載の方法。

【請求項 7 2】

第二の医薬が L D L コレステロールのレベルを減少させる、請求項 7 0 に記載の方法。

【請求項 7 3】

第二の医薬はスタチンを含む、請求項 7 0 に記載の方法。

【請求項 7 4】

スタチンは、アトルバスタチン、フルバスタチン、ロバスタチン、メバスタチン、ピタ

50

バスタチン、プラバスタチン、ロスバスタチン、シンバスタチン、及びそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される、請求項 7 3 に記載の方法。

【請求項 7 5】

第二の医薬は H D L コレステロールのレベルを上昇させる、請求項 7 0 に記載の方法。

【請求項 7 6】

被検体において L D L R に対する P C S K 9 の結合を阻害する方法であって、請求項 1 から 1 6 及び 2 5 のいずれか一項に記載の抗 P C S K 9 抗体、又は請求項 2 6 から 5 0 のいずれか一項に記載の組成物の有効量を被検体に投与することを含む方法。

【請求項 7 7】

被検体において L D L コレステロールのレベルを減少させる方法であって、有効量の抗 P C S K 9 抗体を、一回あたり 4 0 0 m g から 1 0 0 0 m g の用量で、4 週間から 1 2 週間ごと又は 1 ヶ月から 3 ヶ月ごとに、被検体に皮下投与することを含む方法。

【請求項 7 8】

L D L コレステロールレベルは、ベースラインから少なくとも 4 5 % 減少し、最終投与後少なくとも 1 ヶ月間減少したレベルで維持される、請求項 6 7 に記載の方法。

【請求項 7 9】

被検体においてコレステロール関連疾患を治療する方法であって、有効量の抗 P C S K 9 抗体を、一回あたり 4 0 0 m g から 1 0 0 0 m g の用量で、4 週間から 1 2 週間ごと又は 1 ヶ月から 3 ヶ月ごとに被検体に皮下投与することを含む方法。

【請求項 8 0】

被検体において高コレステロール血症を治療する方法であって、有効量の抗 P C S K 9 抗体を、一回あたり 4 0 0 m g から 1 0 0 0 m g の用量で、4 週間から 1 2 週間ごと又は 1 ヶ月から 3 ヶ月ごとに被検体に皮下投与することを含む方法。

【請求項 8 1】

被検体における L D L コレステロールレベルを減少させるための、請求項 1 ～ 1 6 及び 2 5 のいずれか一項に記載の抗 P C S K 9 抗体、又は請求項 2 6 ～ 5 0 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 8 2】

被検体におけるコレステロール関連疾患を治療するための、請求項 1 ～ 1 6 及び 2 5 のいずれか一項に記載の抗 P C S K 9 抗体、又は請求項 2 6 ～ 5 0 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 8 3】

被検体における高コレステロール血症を治療するための、請求項 1 ～ 1 6 及び 2 5 のいずれか一項に記載の抗 P C S K 9 抗体、又は請求項 2 6 ～ 5 0 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 8 4】

被検体における L D L R への P C S K 9 の結合を阻害するための、請求項 1 ～ 1 6 及び 2 5 のいずれか一項に記載の抗 P C S K 9 抗体、又は請求項 2 6 ～ 5 0 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 8 5】

被検体における L D L コレステロールレベルを減少させるための、4 週間から 1 2 週間ごと又は 1 ヶ月から 3 ヶ月ごとに一回あたり 4 0 0 m g から 1 0 0 0 m g の用量の投与のための抗 P C S K 9 抗体の皮下投与量。

【請求項 8 6】

被検体におけるコレステロール関連疾患を治療するための、4 週間から 1 2 週間ごと又は 1 ヶ月から 3 ヶ月ごとに一回あたり 4 0 0 m g から 1 0 0 0 m g の用量の投与のための抗 P C S K 9 抗体の皮下投与量。

【請求項 8 7】

被検体における高コレステロール血症を治療するための、4 週間から 1 2 週間ごと又は 1 ヶ月から 3 ヶ月ごとに一回あたり 4 0 0 m g から 1 0 0 0 m g の用量の投与のための抗

10

20

30

40

50

P C S K 9 抗体の皮下投与量。

【請求項 8 8】

被検体における L D L コレステロールレベルを減少させるための、請求項 1 ～ 1 6 及び 2 5 のいずれか一項に記載の抗 P C S K 9 抗体、又は請求項 2 6 ～ 5 0 のいずれか一項に記載の組成物の使用。

【請求項 8 9】

被検体におけるコレステロール関連疾患を治療するための、請求項 1 ～ 1 6 及び 2 5 のいずれか一項に記載の抗 P C S K 9 抗体、又は請求項 2 6 ～ 5 0 のいずれか一項に記載の組成物の使用。

【請求項 9 0】

被検体における高コレステロール血症を治療するための、請求項 1 ～ 1 6 及び 2 5 のいずれか一項に記載の抗 P C S K 9 抗体、又は請求項 2 6 ～ 5 0 のいずれか一項に記載の組成物の使用。

【請求項 9 1】

被検体における L D L R への P C S K 9 の結合を阻害するための、請求項 1 ～ 1 6 及び 2 5 のいずれか一項に記載の抗 P C S K 9 抗体、又は請求項 2 6 ～ 5 0 のいずれか一項に記載の組成物の使用。

【請求項 9 2】

被検体における L D L コレステロールレベルを減少させるための、4 週間から 1 2 週間ごと又は 1 ヶ月から 3 ヶ月ごとに一回あたり 4 0 0 m g から 1 0 0 0 m g の用量の投与のための抗 P C S K 9 抗体の皮下投与量の使用。

【請求項 9 3】

被検体におけるコレステロール関連疾患を治療するための、4 週間から 1 2 週間ごと又は 1 ヶ月から 3 ヶ月ごとに一回あたり 4 0 0 m g から 1 0 0 0 m g の用量の投与のための抗 P C S K 9 抗体の皮下投与量の使用。

【請求項 9 4】

被検体における高コレステロール血症を治療するための、4 週間から 1 2 週間ごと又は 1 ヶ月から 3 ヶ月ごとに一回あたり 4 0 0 m g から 1 0 0 0 m g の用量の投与のための抗 P C S K 9 抗体の皮下投与量の使用。

【請求項 9 5】

被検体における L D L コレステロールレベルを減少させるための医薬の製造のための、請求項 1 ～ 1 6 及び 2 5 のいずれか一項に記載の抗 P C S K 9 抗体、又は請求項 2 6 ～ 5 0 のいずれか一項に記載の組成物の使用。

【請求項 9 6】

被検体におけるコレステロール関連疾患を治療するための医薬の製造のための、請求項 1 ～ 1 6 及び 2 5 のいずれか一項に記載の抗 P C S K 9 抗体、又は請求項 2 6 ～ 5 0 のいずれか一項に記載の組成物の使用。

【請求項 9 7】

被検体における高コレステロール血症を治療するための医薬の製造のための、請求項 1 ～ 1 6 及び 2 5 のいずれか一項に記載の抗 P C S K 9 抗体、又は請求項 2 6 ～ 5 0 のいずれか一項に記載の組成物の使用。

【請求項 9 8】

被検体における L D L R への P C S K 9 の結合を阻害するための医薬の製造のための、請求項 1 ～ 1 6 及び 2 5 のいずれか一項に記載の抗 P C S K 9 抗体、又は請求項 2 6 ～ 5 0 のいずれか一項に記載の組成物の使用。

【請求項 9 9】

被検体における L D L コレステロールレベルを減少させるための医薬の製造のための、4 週間から 1 2 週間ごと又は 1 ヶ月から 3 ヶ月ごとに一回あたり 4 0 0 m g から 1 0 0 0 m g の用量の投与のための抗 P C S K 9 抗体の皮下投与量の使用。

【請求項 1 0 0】

被検体におけるコレステロール関連疾患を治療するための医薬の製造のための、4週間から12週間ごと又は1ヶ月から3ヶ月ごとに一回あたり400mgから1000mgの用量の投与のための抗PCSK9抗体の皮下投与量の使用。

【請求項101】

被検体における高コレステロール血症を治療するための医薬の製造のための、4週間から12週間ごと又は1ヶ月から3ヶ月ごとに一回あたり400mgから1000mgの用量の投与のための抗PCSK9抗体の皮下投与量の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2012年6月15日に出願された米国仮出願第61/786,280号、及び2010年3月24日に出願された米国仮出願第61/660,605号の優先権利を主張し、その内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

本発明は、抗PCSK9抗体、抗体製剤、投薬レジメン及び同じものを使用する方法に関する。

【背景技術】

【0003】

プロタンパク質転換酵素のサブチリシン／ケキシン (Kexin) のタイプ9 (PCSK9) は、プロタンパク質転換酵素の哺乳類サブチリシンファミリーのメンバーである。PCSK9は、血流中を循環する低密度リポタンパク質 (LDL) 粒子のレベルを制御することにより、コレステロール代謝に重要な役割を果たしている。PCSK9レベルの上昇は、肝臓におけるLDL受容体レベルを低減することが示されており、血漿中に高レベルのLDLコレステロールを生じ、冠動脈疾患への感受性の増加をもたらす。(Petersonら、J Lipid Res. 49(7):1595-9(2008)).従って、様々な治療的状態においてPCSK9の活性及びPCSK9が果たす対応する役割を阻害又は拮抗する、治療に基づくPCSK9のアнтаゴニストを生産することは非常に有利であろう。

【発明の概要】

【0004】

本発明は、PCSK9に対する様々な抗体の一部に基づいている。PCSK9は、重要で有利な治療標的として呈示され、本発明は、PCSK9の発現及び／又は活性に関連した病態を標的とすることにおいて使用のための治療薬及び診断薬としての抗体を提供する。従って、本発明は、PCSK9に関連する方法、組成物、キット及び製造品を提供する。

【0005】

ある実施態様において、PCSK9又はその断片に結合する抗体又は抗体断片が提供され、ここで該抗体は、

(i) X_1 はS又はTであり； X_2 はG、R又はSであり； X_3 はH、T又はYであり； X_4 はA又はTである、GFTFX₁X₂X₃X₄I H (配列番号28)を含むHVR-H1；

(ii) RISPANGNTNYADSVKG (配列番号4)を含むHVR-H2；

(iii) WIGSRELYIMDY (配列番号5)を含むHVR-H3；

(iv) X_1 はS又はTである、RASQDV SX₁AVA (配列番号29)を含むHVR-L1；

(v) X_1 はF又はSである、SASX₁LYS (配列番号30)を含むHVR-L2；及び

(vi) X_1 はP、R又はTであり； X_2 はA、I、S又はTであり； X_3 はL、P又はQであり； X_4 はA、H、P又はSである、QQSYX₁X₂X₃X₄T (配列番号31)又はQQAYX₁X₂X₃X₄T (配列番号37)を含むHVR-L3、からなる群

10

20

30

40

50

から選択される少なくとも一、二、三、四、五、又は六つの超可変領域（HVR）配列を含む可変ドメインを含む。

【0006】

ある実施態様において、PCSK9又はその断片に結合する抗体又は抗体断片が提供され、ここで該抗体は、次の6つのHVR配列を含む可変ドメインを含む：

（i） X_1 はS又はTであり； X_2 はG、R又はSであり； X_3 はH、T又はYであり； X_4 はA又はTである、GFTFX₁X₂X₃X₄I H（配列番号28）を含むHVR-H1；

（ii）RISPANGNTNYADSVKG（配列番号4）を含むHVR-H2；

（iii）WIGSRELYIMDY（配列番号5）を含むHVR-H3；

（iv） X_1 はS又はTである、RASQDV SX₁AVA（配列番号29）を含むHVR-L1；

（v） X_1 はF又はSである、SASX₁LYS（配列番号30）を含むHVR-L2；及び

（vi） X_1 はP、R又はTであり； X_2 はA、I、S又はTであり； X_3 はL、P又はQであり； X_4 はA、H、P又はSである、QQSYX₁X₂X₃X₄T（配列番号31）又はQQAYX₁X₂X₃X₄T（配列番号37）を含むHVR-L3。

【0007】

ある実施態様において、PCSK9又はその断片に結合する抗体又は抗体断片が提供され、ここで該抗体は、

（i） X_1 はS又はTであり； X_2 はG、R又はSであり； X_3 はH、T又はYであり； X_4 はA又はTであり、 X_5 はH又はNである、GFTFX₁X₂X₃X₄I X₅（配列番号45）を含むHVR-H1；

（ii）RISPANGNTNYADSVKG（配列番号4）を含むHVR-H2；

（iii）WIGSRELYIMDY（配列番号5）を含むHVR-H3；

（iv） X_1 はS又はTである、RASQDV SX₁AVA（配列番号29）を含むHVR-L1；

（v） X_1 はF又はSである、SASX₁LYS（配列番号30）を含むHVR-L2；及び

（vi） X_1 はP、R又はTであり； X_2 はA、I、S又はTであり； X_3 はL、P又はQであり； X_4 はA、H、P又はSである、QQSYX₁X₂X₃X₄T（配列番号31）又はQQAYX₁X₂X₃X₄T（配列番号37）を含むHVR-L3、

からなる群から選択される少なくとも一、二、三、四、五、又は六つの超可変領域（HVR）配列を含む可変ドメインを含む。

【0008】

ある実施態様において、PCSK9又はその断片に結合する抗体又は抗体断片が提供され、ここで該抗体は、次の6つのHVR配列を含む可変ドメインを含む：

（i） X_1 はS又はTであり； X_2 はG、R又はSであり； X_3 はH、T又はYであり； X_4 はA又はTであり、 X_5 はH又はNである、GFTFX₁X₂X₃X₄I X₅（配列番号45）を含むHVR-H1；

（ii）RISPANGNTNYADSVKG（配列番号4）を含むHVR-H2；

（iii）WIGSRELYIMDY（配列番号5）を含むHVR-H3；

（iv） X_1 はS又はTである、RASQDV SX₁AVA（配列番号29）を含むHVR-L1；

（v） X_1 はF又はSである、SASX₁LYS（配列番号30）を含むHVR-L2；及び

（vi） X_1 はP、R又はTであり； X_2 はA、I、S又はTであり； X_3 はL、P又はQであり； X_4 はA、H、P又はSである、QQSYX₁X₂X₃X₄T（配列番号31）又はQQAYX₁X₂X₃X₄T（配列番号37）を含むHVR-L3。

【0009】

10

20

30

40

50

ある実施態様において、PCSK9又はその断片に結合する抗体又は抗体断片が提供され、ここで該抗体は、

(i) X_1 はS又はTであり； X_2 はG、R又はSであり； X_3 はH、T又はYであり； X_4 はA又はTであり、 X_5 はH又はNである、GFTFX₁X₂X₃X₄IX₅（配列番号45）を含むHVR-H1；

(ii) RISPANGNTNYADSVKG（配列番号4）を含むHVR-H2；

(iii) WIGSRELYIMDY（配列番号5）を含むHVR-H3；

(iv) WIGSRELYIMDY（配列番号7）を含むHVR-L1；

(v) WIGSRELYIMDY（配列番号8）を含むHVR-L2；及び

(vi) X_1 はP、R又はTであり； X_2 はA、I、S又はTであり； X_3 はL、P又はQであり； X_4 はA、H、P又はSである、QQSYX₁X₂X₃X₄T（配列番号31）又はQQAYX₁X₂X₃X₄T（配列番号37）を含むHVR-L3、

からなる群から選択される少なくとも一、二、三、四、五、又は六つの超可変領域（HVR）配列を含む可変ドメインを含む。

【0010】

ある実施態様において、PCSK9又はその断片に結合する抗体又は抗体断片が提供され、ここで該抗体は、次の6つのHVR配列を含む可変ドメインを含む：

(i) X_1 はS又はTであり； X_2 はG、R又はSであり； X_3 はH、T又はYであり； X_4 はA又はTであり、 X_5 はH又はNである、GFTFX₁X₂X₃X₄IX₅（配列番号45）を含むHVR-H1；

(ii) RISPANGNTNYADSVKG（配列番号4）を含むHVR-H2；

(iii) WIGSRELYIMDY（配列番号5）を含むHVR-H3；

(iv) RASQDVSTAVA（配列番号7）を含むHVR-L1；

(v) SASFLYS（配列番号8）を含むHVR-L2；及び

(vi) X_1 はP、R又はTであり； X_2 はA、I、S又はTであり； X_3 はL、P又はQであり； X_4 はA、H、P又はSである、QQSYX₁X₂X₃X₄T（配列番号31）又はQQAYX₁X₂X₃X₄T（配列番号37）を含むHVR-L3。

【0011】

一実施態様において、PCSK9又はその断片に結合する抗体又は抗体断片が提供され、該抗体は（a）配列番号1、配列番号2、配列番号3又は配列番号42のアミノ酸配列を含むHVR-H1、（b）配列番号4のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び（c）配列番号5のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む。ある実施態様において、抗体は、（a）配列番号6又は配列番号7のアミノ酸配列を含むHVR-L1；（b）配列番号8又は配列番号26のアミノ酸配列を含むHVR-L2；（c）配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14又は配列番号33のアミノ酸配列を含むHVR-L3を更に含む。

【0012】

ある実施態様において、PCSK9又はその断片に結合する抗体又は抗体断片が提供され、該抗体は、（a）配列番号6又は配列番号7のアミノ酸配列を含むHVR-L1；（b）配列番号8又は配列番号26のアミノ酸配列を含むHVR-L2；（c）配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14又は配列番号33のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。ある実施態様において、抗体は、（a）配列番号1、配列番号2又は配列番号42のアミノ酸配列を含むHVR-H1、（b）配列番号4のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び（c）配列番号5のアミノ酸配列を含むHVR-H3を更に含む。

【0013】

ある実施態様において、PCSK9又はその断片に結合する抗体又は抗体断片が提供され、ここで該抗体は、

(1) 配列番号1のアミノ酸配列を含むHVR-H1；

(2) 配列番号4のアミノ酸配列を含むHVR-H2；

- (3) 配列番号5のアミノ酸配列を含むHVR-H3；
- (4) 配列番号6のアミノ酸配列を含むHVR-L1；
- (5) 配列番号26のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び
- (6) 配列番号9のアミノ酸配列を含むHVR-L3、を含む。

【0014】

ある実施態様において、PCSK9又はその断片に結合する抗体又は抗体断片が提供され、ここで該抗体は、

- (1) 配列番号1のアミノ酸配列を含むHVR-H1；
- (2) 配列番号4のアミノ酸配列を含むHVR-H2；
- (3) 配列番号5のアミノ酸配列を含むHVR-H3；
- (4) 配列番号7のアミノ酸配列を含むHVR-L1；
- (5) 配列番号8のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び
- (6) 配列番号9のアミノ酸配列を含むHVR-L3、を含む。

10

【0015】

ある実施態様において、PCSK9又はその断片に結合する抗体又は抗体断片が提供され、ここで該抗体は、

- (1) 配列番号1のアミノ酸配列を含むHVR-H1；
- (2) 配列番号4のアミノ酸配列を含むHVR-H2；
- (3) 配列番号5のアミノ酸配列を含むHVR-H3；
- (4) 配列番号7のアミノ酸配列を含むHVR-L1；
- (5) 配列番号8のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び
- (6) 配列番号10のアミノ酸配列を含むHVR-L3、を含む。

20

【0016】

別の実施態様において、PCSK9又はその断片に結合する抗体又は抗体断片が提供され、ここで該抗体は、

- (1) 配列番号1のアミノ酸配列を含むHVR-H1；
- (2) 配列番号4のアミノ酸配列を含むHVR-H2；
- (3) 配列番号5のアミノ酸配列を含むHVR-H3；
- (4) 配列番号7のアミノ酸配列を含むHVR-L1；
- (5) 配列番号8のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び
- (6) 配列番号11のアミノ酸配列を含むHVR-L3、を含む。

30

【0017】

別の実施態様において、PCSK9又はその断片に結合する抗体又は抗体断片が提供され、ここで該抗体は、

- (1) 配列番号2のアミノ酸配列を含むHVR-H1；
- (2) 配列番号4のアミノ酸配列を含むHVR-H2；
- (3) 配列番号5のアミノ酸配列を含むHVR-H3；
- (4) 配列番号7のアミノ酸配列を含むHVR-L1；
- (5) 配列番号8のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び
- (6) 配列番号12のアミノ酸配列を含むHVR-L3、を含む。

40

【0018】

別の実施態様において、PCSK9又はその断片に結合する抗体又は抗体断片が提供され、ここで該抗体は、

- (1) 配列番号42のアミノ酸配列を含むHVR-H1；
- (2) 配列番号4のアミノ酸配列を含むHVR-H2；
- (3) 配列番号5のアミノ酸配列を含むHVR-H3；
- (4) 配列番号7のアミノ酸配列を含むHVR-L1；
- (5) 配列番号8のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び
- (6) 配列番号12のアミノ酸配列を含むHVR-L3、を含む。

【0019】

50

別の実施態様において、P C S K 9 又はその断片に結合する抗体又は抗体断片が提供され、ここで該抗体は、

- (1) 配列番号 3 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1 ；
- (2) 配列番号 4 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 ；
- (3) 配列番号 5 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 ；
- (4) 配列番号 7 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1 ；
- (5) 配列番号 8 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2 ；及び
- (6) 配列番号 1 3 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 、を含む。

【0020】

別の実施態様において、P C S K 9 又はその断片に結合する抗体又は抗体断片が提供され、ここで該抗体は、

- (1) 配列番号 3 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1 ；
- (2) 配列番号 4 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 ；
- (3) 配列番号 5 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 ；
- (4) 配列番号 7 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1 ；
- (5) 配列番号 8 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2 ；及び
- (6) 配列番号 3 3 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 、を含む。

【0021】

別の実施態様において、P C S K 9 又はその断片に結合する抗体又は抗体断片が提供され、ここで該抗体は、

- (1) 配列番号 1 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1 ；
- (2) 配列番号 4 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 ；
- (3) 配列番号 5 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 ；
- (4) 配列番号 7 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1 ；
- (5) 配列番号 8 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2 ；及び
- (6) 配列番号 1 4 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 、を含む。

【0022】

ある実施態様において、P C S K 9 又はその断片に結合する抗体又は抗体断片が提供され、該抗体は、(a) 配列番号 1 5、配列番号 1 6、配列番号 1 7、配列番号 2 7 又は配列番号 4 3 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を持つ V H 配列；又は (b) 配列番号 1 8、配列番号 1 9、配列番号 2 0、配列番号 2 1、配列番号 2 2、配列番号 2 3、配列番号 3 4 又は配列番号 4 4 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を持つ V L 配列を含む。

【0023】

ある実施態様において、P C S K 9 又はその断片に結合する抗体又は抗体断片が提供され、該抗体は、配列番号 1 5、配列番号 1 6、配列番号 1 7、配列番号 2 7 又は配列番号 4 3 の V H 配列を含む。ある実施態様において、抗体は、配列番号 1 8、配列番号 1 9、配列番号 2 0、配列番号 2 1、配列番号 2 2、配列番号 2 3、配列番号 3 4 又は配列番号 4 4 の V L 配列を更に含む。

【0024】

一実施態様において、P C S K 9 又はその断片に結合する抗体又は抗体断片が提供され、該抗体は、配列番号 1 5 の V H 配列及び配列番号 1 8 の V L 配列を含む。別の実施態様において、P C S K 9 又はその断片に結合する抗体又は抗体断片が提供され、該抗体は、配列番号 2 7 の V H 配列及び配列番号 4 4 の V L 配列を含む。別の実施態様において、P C S K 9 又はその断片に結合する抗体又は抗体断片が提供され、該抗体は、配列番号 1 5 の V H 配列及び配列番号 1 9 の V L 配列を含む。別の実施態様において、P C S K 9 又はその断片に結合する抗体又は抗体断片が提供され、該抗体は、配列番号 2 7 の V H 配列及び配列番号 1 9 の V L 配列を含む。別の実施態様において、P C S K 9 又はその断片に結合する抗体又は抗体断片が提供され、該抗体は、配列番号 2 7 の V H 配列及び配列番号 2 0 の V L 配列を含む。別の実施態様において、P C S K 9 又はその断片に結合する抗体又

は抗体断片が提供され、該抗体は、配列番号 16 の V H 配列及び配列番号 21 の V L 配列を含む。別の実施態様において、P C S K 9 又はその断片に結合する抗体又は抗体断片が提供され、該抗体は、配列番号 43 の V H 配列及び配列番号 21 の V L 配列を含む。別の実施態様において、P C S K 9 又はその断片に結合する抗体又は抗体断片が提供され、該抗体は、配列番号 17 の V H 配列及び配列番号 22 の V L 配列を含む。別の実施態様において、P C S K 9 又はその断片に結合する抗体又は抗体断片が提供され、該抗体は、配列番号 27 の V H 配列及び配列番号 23 の V L 配列を含む。別の実施態様において、P C S K 9 又はその断片に結合する抗体又は抗体断片が提供され、該抗体は、配列番号 17 の V H 配列及び配列番号 34 の V L 配列を含む。

【0025】

ある実施態様において、P C S K 9 又はその断片に結合する抗体又は抗体断片が提供され、該抗体は、P C S K 9 の断片内のエピトープに結合する。ある実施態様において、P C S K 9 又はその断片に結合する抗体又は抗体断片が提供され、該抗体は、配列番号 24 のヒト P C S K 9 アミノ酸配列のアミノ酸 376 から 379 を含む、P C S K 9 の断片内のエピトープに結合する。ある実施態様において、この発明による抗体の機能的及び／又は構造的エピトープはヒト P C S K 9 の残基 D 238 を含む。ある実施態様において、この発明による抗体の機能的及び／又は構造的エピトープはヒト P C S K 9 の残基 A 239 を含む。ある実施態様において、この発明による抗体の機能的及び／又は構造的エピトープはヒト P C S K 9 の残基 D 238 及び A 239 を含む。ある実施態様において、この発明による抗体の機能的及び／又は構造的エピトープはヒト P C S K 9 の残基 E 366 を含む。ある実施態様において、この発明による抗体の機能的及び／又は構造的エピトープはヒト P C S K 9 の残基 D 367 を含む。ある実施態様において、この発明による抗体の機能的及び／又は構造的エピトープはヒト P C S K 9 の残基 E 366 及び D 367 を含む。ある実施態様において、この発明による抗体の機能的及び／又は構造的エピトープはヒト P C S K 9 の残基 H 391 を含む。ある実施態様において、この発明による抗体の機能的及び／又は構造的エピトープはヒト P C S K 9 の残基 E 366、D 367 及び H 391 を含む。ある実施態様において、この発明による抗体の機能的及び／又は構造的エピトープはヒト P C S K 9 の残基 A 239 及び H 391 を含む。ある実施態様において、機能的及び／又は構造的エピトープはヒト P C S K 9 の残基 A 239、A 341、E 366、D 367 及び H 391 の1つ又は複数を含む。ある実施態様において、機能的及び／又は構造的エピトープはヒト P C S K 9 の A 239、A 341、E 366、D 367 及び H 391 の近傍残基の1つ又は複数を含む。ある実施態様において、この発明による抗体の機能的及び／又は構造的エピトープは、ヒト P C S K 9 の (i) R 194 及び E 195 からなる群から選択される少なくとも一の残基、(i i) D 238 及び A 239 から選択される少なくとも一の残基、(i i i) A 341 及び Q 342 から選択される少なくとも一の残基、及び (i v) E 366、D 367、I 369、S 376、T 377、C 378、F 379、S 381 及び H 391 から選択される少なくとも一の残基を含む。ある実施態様において、機能的及び／又は構造的エピトープは、以下の残基：ヒト P C S K 9 の R 194、E 195、D 238、A 239、A 341、Q 342、E 366、D 367、I 369、S 376、T 377、C 378、F 379、S 381 及び H 391 の一、二、三、四、五、六、七、八、九、十、十一、十二、十三、十四、又は全てを含む。

【0026】

ある実施態様において、抗 P C S K 9 抗体は、モノクローナル抗体である。ある実施態様において、抗 P C S K 9 抗体は、ヒト化されている。ある実施態様において、抗 P C S K 9 抗体は、ヒト抗体である。ある実施態様において、抗 P C S K 9 抗体のフレームワーク配列の少なくとも一部分は、ヒトコンセンサスフレームワーク配列である。一実施態様において、抗体は、F a b、F a b' - S H、F v、s c F v、又は F (a b')₂ 断片から選択される抗体断片である。

【0027】

一態様において、上記抗 P C S K 9 抗体のいずれかをコードする核酸が提供される一実

10

20

30

40

50

施態様において、核酸分子を含むベクターが提供される。一実施態様において、ベクターは発現ベクターである。一実施態様において、ベクターを含む宿主細胞が提供される。一実施態様において、宿主細胞は、真核生物である。別の実施態様において、宿主細胞は、哺乳動物である。更に別の実施態様において、宿主細胞は、原核生物である。一実施態様において、抗PCSK9抗体を作成する方法が提供され、該方法は、抗体をコードする核酸の発現に適した条件下で宿主細胞を培養すること及び抗体を単離することを含む。ある実施態様において、本方法は、宿主細胞から抗PCSK9抗体を回収することを更に含む。ある実施態様において、本明細書に記載される抗PCSK9抗体のいずれかを含む組成物が提供される。一実施態様において、組成物は、薬学的に許容される担体を更に含む。

【0028】

10

一態様において、本明細書で提供される医薬組成物は、約100から約225mg/mLの抗PCSK9抗体、約180から約220mMのアルギニンコハク酸、約0.01%から約0.03%のポリソルベート、及び約5.2から約6.2までのpHを含む。ある実施態様において、組成物中の抗PCSK9抗体又は抗体断片は、約150mg/mLであり、組成物中のアルギニンコハク酸は、約200mMであり、組成物中のポリソルベート20は、約0.02%であり、そしてpHは約5.5である。ある実施態様において、組成物は皮下投与に適している。ある実施態様において、組成物の粘度は25℃で約10cPで未満である。本明細書において、当技術分野で周知の、又は記載される任意の抗PCSK9抗体は、組成物に製剤化してもよい。

【0029】

20

一態様において、本明細書で提供される医薬組成物は、約150から約225mg/mLの抗PCSK9抗体、約10から約30mMのヒスチジンアセテート、約150から約170mMのアルギニンアセテート、約0.01%から約0.03%のポリソルベート、約5.8から約6.2のpHを含む。ある実施態様において、組成物中の抗PCSK9抗体又は抗体断片は約200mg/mLであり、組成物中のヒスチジンアセテートは約20mMであり、組成物中のアルギニンアセテートは約160mMであり、及び組成物中のポリソルベート20は約0.02%であり、pHは約6.0である。ある実施態様において、組成物は皮下投与に適している。ある実施態様において、組成物の粘度は25℃で約10cPで未満である。本明細書において、当技術分野で周知の、又は記載される任意の抗PCSK9抗体は、組成物に製剤化してもよい。

30

【0030】

一態様において、本明細書で提供されるのは、抗PCSK9抗体、又は本明細書に記載の抗PCSK9抗体を含有する組成物を含む皮下投与デバイスである。特定の実施態様において、デバイスは、約200から約1200mgの範囲で、抗体を個体に一定用量を提供するためのものである。特定の実施態様において、デバイスはプレフィルドシリンジである。（例えば、0.5-mL、1-mL、1.25-mL、1.5-mL、1.75-mL、2-mL、2.25-mL、又は2.5-mLのシリンジ）特定の実施態様において、デバイスは、1-mLのプレフィルドシリンジであり、プレフィルドシリンジ内の抗体濃度は約200mg/mLである。特定の実施態様において、デバイスは、1.5-mLのプレフィルドシリンジであり、プレフィルドシリンジ内の抗体濃度は約200mg/mLである。特定の実施態様において、デバイスは、2-mLのプレフィルドシリンジであり、プレフィルドシリンジ内の抗体濃度は約200mg/mLである。特定の実施態様において、デバイスは、2.25-mLのプレフィルドシリンジであり、プレフィルドシリンジ内の抗体濃度は約200mg/mLである。特定の実施態様において、デバイスは、2.5-mLのプレフィルドシリンジであり、プレフィルドシリンジ内の抗体濃度は約200mg/mLである。

40

【0031】

一態様において、本発明は、被験体においてLDL受容体(LDLR)に対するPCSK9の結合を阻害する方法に関係し、該方法は、本明細書に記載される抗PCSK9抗体のいずれかの有効量を被験体に投与することを含む。別の態様において、本発明は、被験

50

体においてコレステロールのレベルを減少させる方法に関係し、該方法は、本明細書に記載される抗PCSK9抗体のいずれかの有効量を被験体に投与することを含む。一実施態様では、コレステロールは、LDLコレステロールである。別の態様において、本発明は、被験体においてLDLコレステロールのレベルを減少させる方法に関係し、該方法は、本明細書に記載される抗PCSK9抗体のいずれかの有効量を被験体に投与することを含む。ある実施態様において、本発明は、被験体において血清LDLコレステロールのレベルを低下させる方法に関係し、該方法は、本明細書に記載される抗PCSK9抗体のいずれかの有効量を被験体に投与することを含む。別の態様において、本発明は、被験体においてLDLコレステロールのレベルの上昇に関連する病態を治療する方法に関係し、該方法は、本明細書に記載される抗PCSK9抗体のいずれか一の有効量を被験体に投与することを含む。

10

【0032】

ある態様において、本発明は、コレステロール関連疾患を治療する方法に関する。意図されるコレステロール関連疾患の例示的かつ非限定的なリストは、本明細書の「組成物及び方法」で提供される。ある実施態様において、コレステロール関連疾患は、高コレステロール血症である。ある実施態様において、本発明は、本明細書に記載される抗PCSK9抗体のいずれか一の有効量を被験体に投与することを含む、高コレステロール血症を治療する方法に関する。ある実施態様において、本発明は、アテローム性動脈硬化症及び／又は循環器疾患を予防及び／又は治療する方法に関する。ある実施態様において、本発明は、本明細書に記載される抗PCSK9抗体のいずれか一の有効量を個体に投与することを含む、個体における再発性心血管イベントのリスクを低減する方法に関する。

20

【0033】

一態様において、本発明は、PCSK9の活性を除去し、阻害し、又は低減することにより、改善し、寛解し、抑制又は予防することができる任意の疾患又は病態を治療するための方法に関する。ある実施態様において、スタチンの使用を介して治療可能又は予防可能などちらかである疾患又は障害はまた、本明細書に記載の抗PCSK9抗体のいずれか一を用いて治療することができる。ある実施態様において、コレステロール合成又はLDLR発現の増加から利益を得ることが可能である障害又は疾患はまた、本明細書に記載の抗PCSK9抗体のいずれか一を用いて治療することができる。

【0034】

本明細書に記載される方法のある実施態様において、抗PCSK9抗体は、200mg、220mg、380mg、400mg、600mg、760mg、800mg、1000mg、1140mg、又は1200mgの用量で、2週間ごと、1ヶ月ごと、2ヶ月ごと、又は3ヶ月ごとに皮下投与される。本明細書に記載される方法のある実施態様において、抗PCSK9抗体は、200mg、220mg、380mg、400mg、600mg、760mg、800mg、1000mg、1140mg、又は1200mgの用量で、2週間ごとに皮下投与される。本明細書に記載される方法のある実施態様において、抗PCSK9抗体は、200mg、220mg、380mg、400mg、600mg、760mg、800mg、1000mg、1140mg、又は1200mgの用量で、1ヶ月ごとに皮下投与される。本明細書に記載される方法のある実施態様において、抗PCSK9抗体は、200mg、220mg、380mg、400mg、600mg、760mg、800mg、1000mg、1140mg、又は1200mgの用量で、2ヶ月ごとに皮下投与される。本明細書に記載される方法のある実施態様において、抗PCSK9抗体は、200mg、220mg、380mg、400mg、600mg、760mg、800mg、1000mg、1140mg、又は1200mgの用量で、3ヶ月ごとに皮下投与される。

30

40

【0035】

本明細書に記載される方法のある実施態様において、抗PCSK9抗体は、200～1200mg、200～1000mg、200～800mg、200～600mg、200～400mg、400～1200mg、400～1000mg、400～800mg、4

50

00～600mg、600～1200mg、600～1000mg、600～800mg、800～1200mg、800～1000mg、800～900mg、750～850mg、750～800mg、775～825mg、350～450mg、375～425mg、又は375～400mgの用量で、2週間ごと、1ヶ月ごと、2ヶ月ごと、又は3ヶ月ごとに皮下投与される。本明細書に記載される方法のある実施態様において、抗PCSK9抗体は、200～1200mg、200～1000mg、200～800mg、200～600mg、200～400mg、400～1200mg、400～1000mg、400～800mg、400～600mg、600～1200mg、600～1000mg、600～800mg、800～1200mg、800～1000mg、800～900mg、750～850mg、750～800mg、775～825mg、350～450mg、375～425mg、又は375～400mgの用量で、2週間ごとに皮下投与される。本明細書に記載される方法のある実施態様において、抗PCSK9抗体は、200～1200mg、200～1000mg、200～800mg、200～600mg、200～400mg、400～1200mg、400～1000mg、400～800mg、400～600mg、600～1200mg、600～1000mg、600～800mg、800～1200mg、800～1000mg、800～900mg、750～850mg、750～800mg、775～825mg、350～450mg、375～425mg、又は375～400mgの用量で、1ヶ月ごとに皮下投与される。本明細書に記載される方法のある実施態様において、抗PCSK9抗体は、200～1200mg、200～1000mg、200～800mg、200～600mg、200～400mg、400～1200mg、400～1000mg、400～800mg、400～600mg、600～1200mg、600～1000mg、600～800mg、800～1200mg、800～1000mg、800～900mg、750～850mg、750～800mg、775～825mg、350～450mg、375～425mg、又は375～400mgの用量で、2ヶ月ごとに皮下投与される。本明細書に記載される方法のある実施態様において、抗PCSK9抗体は、200～1200mg、200～1000mg、200～800mg、200～600mg、200～400mg、400～1200mg、400～1000mg、400～800mg、400～600mg、600～1200mg、600～1000mg、600～800mg、800～1200mg、800～1000mg、800～900mg、750～850mg、750～800mg、775～825mg、350～450mg、375～425mg、又は375～400mgの用量で、3ヶ月ごとに皮下投与される。

【0036】

本明細書に記載される方法のある実施態様において、抗PCSK9抗体は、200mg、220mg、380mg、400mg、600mg、760mg、800mg、1000mg、1140mg、又は1200mgの用量で、2週間ごと、4週間ごと、6週間ごと、8週間ごと、10週間ごと、又は12週間ごとに皮下投与される。本明細書に記載される方法のある実施態様において、抗PCSK9抗体は、200mg、220mg、380mg、400mg、600mg、760mg、800mg、1000mg、1140mg、又は1200mgの用量で、2週間ごとに皮下投与される。本明細書に記載される方法のある実施態様において、抗PCSK9抗体は、200mg、220mg、380mg、400mg、600mg、760mg、800mg、1000mg、1140mg、又は1200mgの用量で、4週間ごとに皮下投与される。本明細書に記載される方法のある実施態様において、抗PCSK9抗体は、200mg、220mg、380mg、400mg、600mg、760mg、800mg、1000mg、1140mg、又は1200mgの用量で、6週間ごとに皮下投与される。本明細書に記載される方法のある実施態様において、抗PCSK9抗体は、200mg、220mg、380mg、400mg、600mg、760mg、800mg、1000mg、1140mg、又は1200mgの用量で、8週間ごとに皮下投与される。本明細書に記載される方法のある実施態様において、抗PCSK9抗体は、200mg、220mg、380mg、400mg、60

【 0 0 3 7 】

50

0 0 m g、4 0 0 ~ 1 0 0 0 m g、4 0 0 ~ 8 0 0 m g、4 0 0 ~ 6 0 0 m g、6 0 0 ~ 1 2 0 0 m g、6 0 0 ~ 1 0 0 0 m g、6 0 0 ~ 8 0 0 m g、8 0 0 ~ 1 2 0 0 m g、8 0 0 ~ 1 0 0 0 m g、8 0 0 ~ 9 0 0 m g、7 5 0 ~ 8 5 0 m g、7 5 0 ~ 8 0 0 m g、7 7 5 ~ 8 2 5 m g、3 5 0 ~ 4 5 0 m g、3 7 5 ~ 4 2 5 m g、又は 3 7 5 ~ 4 0 0 m g の用量で、1 2 週間ごとに皮下投与される。

【0038】

本明細書に記載される方法のある実施態様において、抗 P C S K 9 抗体は、6 0 0 m g の用量で、8 週間ごとに皮下投与される。本明細書に記載される方法のある実施態様において、抗 P C S K 9 抗体は、8 0 0 m g の用量で、8 週間ごとに皮下投与される。本明細書に記載される方法のある実施態様において、抗 P C S K 9 抗体は、8 0 0 m g の用量で、1 0 週間ごとに皮下投与される。本明細書に記載される方法のある実施態様において、抗 P C S K 9 抗体は、8 0 0 m g の用量で、1 2 週間ごとに皮下投与される。本明細書に記載される方法のある実施態様において、抗 P C S K 9 抗体は、7 6 0 m g の用量で、用量で、8 週間ごとに皮下投与される。本明細書に記載される方法のある実施態様において、抗 P C S K 9 抗体は、7 6 0 m g の用量で、1 0 週間ごとに皮下投与される。本明細書に記載される方法のある実施態様において、抗 P C S K 9 抗体は、7 6 0 m g の用量で、1 2 週間ごとに皮下投与される。本明細書に記載される方法のある実施態様において、抗 P C S K 9 抗体は、4 0 0 m g の用量で、4 週間ごとに皮下投与される。本明細書に記載される方法のある実施態様において、抗 P C S K 9 抗体は、4 0 0 m g の用量で、8 週間ごとに皮下投与される。本明細書に記載される方法のある実施態様において、抗 P C S K 9 抗体は、4 0 0 m g の用量で、1 2 週間ごとに皮下投与される。本明細書に記載される方法のある実施態様において、抗 P C S K 9 抗体は、3 8 0 m g の用量で、4 週間ごとに皮下投与される。本明細書に記載される方法のある実施態様において、抗 P C S K 9 抗体は、3 8 0 m g の用量で、8 週間ごとに皮下投与される。本明細書に記載される方法のある実施態様において、抗 P C S K 9 抗体は、3 8 0 m g の用量で、1 2 週間ごとに皮下投与される。本明細書に記載される方法のある実施態様において、抗 P C S K 9 抗体は、2 2 0 m g の用量で、2 週間ごとに皮下投与される。本明細書に記載される方法のある実施態様において、抗 P C S K 9 抗体は、2 2 0 m g の用量で、4 週間ごとに皮下投与される。本明細書に記載される方法のある実施態様において、抗 P C S K 9 抗体は、2 2 0 m g の用量で、8 週間ごとに皮下投与される。

【0039】

本明細書に記載される方法のある実施態様において、抗 P C S K 9 抗体を投与された被検体は、L D L - c レベルについてモニターされ、それらのレベルが、2 5 又は 1 5 m g / d L 未満に低下した場合、その後、それらの用量は、用量及び／又は投与頻度を変更することにより、初期投与量の約 5 0 % 又は 2 5 % にまで調整される。本明細書に記載される方法のある実施態様において、被検体は抗 P C S K 9 抗体を 8 0 0 m g の初期用量で 8 週間ごとに投与され、被検体の L D L - c レベルはモニターされ、2 5 m g / d L 未満に L D L - c レベルが低下した場合、その用量は、8 週間ごとの抗 P C S K 9 抗体 2 0 0 m g に調整される。本明細書に記載される方法のある実施態様において、被検体は抗 P C S K 9 抗体を 8 0 0 m g の初期用量で 8 週間ごとに投与され、被検体の L D L - c レベルはモニターされ、1 5 m g / d L 未満に L D L - c レベルが低下した場合、その用量は、8 週間ごとの 2 0 0 m g の抗 P C S K 9 抗体に調整される。本明細書に記載される方法のある実施態様において、被検体は抗 P C S K 9 抗体を 7 6 0 m g の初期用量で 8 週間ごとに投与され、被検体の L D L - c レベルはモニターされ、2 5 m g / d L 未満に L D L - c レベルが低下した場合、その用量は、8 週間ごとの 2 0 0 m g の抗 P C S K 9 抗体に調整される。本明細書に記載される方法のある実施態様において、被検体は抗 P C S K 9 抗体を 7 6 0 m g の初期用量で 8 週間ごとに投与され、被検体の L D L - c レベルはモニターされ、1 5 m g / d L 未満に L D L - c レベルが低下した場合、その用量は、8 週間ごとの 2 0 0 m g の抗 P C S K 9 抗体に調整される。本明細書に記載される方法のある実施態様において、被検体は抗 P C S K 9 抗体を 7 6 0 m g の初期用量で 8 週間ごとに投与さ

れ、被検体のLDL-cレベルはモニターされ、25mg/dL未満にLDL-cレベルが低下した場合、その用量は、8週間ごとの190mgの抗PCSK9抗体に調整される。本明細書に記載される方法のある実施態様において、被検体は抗PCSK9抗体を760mgの初期用量で8週間ごとに投与され、被検体のLDL-cレベルはモニターされ、15mg/dL未満にLDL-cレベルが低下した場合、その用量は、8週間ごとの190mgの抗PCSK9抗体に調整される。本明細書に記載される方法のある実施態様において、被検体は抗PCSK9抗体を400mgの初期用量で4週間ごとに投与され、被検体のLDL-cレベルはモニターされ、25mg/dL未満にLDL-cレベルが低下した場合、その用量は、4週間ごとの100mgの抗PCSK9抗体に調整される。本明細書に記載される方法のある実施態様において、被検体は抗PCSK9抗体を380mgの初期用量で4週間ごとに投与され、被検体のLDL-cレベルはモニターされ、25mg/dL未満にLDL-cレベルが低下した場合、その用量は、4週間ごとの100mgの抗PCSK9抗体に調整される。本明細書に記載される方法のある実施態様において、被検体は抗PCSK9抗体を380mgの初期用量で4週間ごとに投与され、被検体のLDL-cレベルはモニターされ、15mg/dL未満にLDL-cレベルが低下した場合、その用量は、4週間ごとの100mgの抗PCSK9抗体に調整される。

10

20

【0040】

ある実施態様において、前述の皮下用量のいずれかは、皮下投与デバイスを用いて投与される。ある実施態様において、デバイスは、プレフィルドシリンジである。（例えば、0.5-mL、1-mL、1.25-mL、1.5-mL、1.75-mL、2-mL、2.25-mL、又は2.5-mLのシリンジ）ある実施態様において、デバイスは、1-mLプレフィルドシリンジであり、プレフィルドシリンジ内の抗体濃度が約200mg/mLである。ある実施態様において、デバイスは、1.5-mLプレフィルドシリンジであり、プレフィルドシリンジ内の抗体濃度が約200mg/mLである。ある実施態様において、デバイスは、2-mLプレフィルドシリンジであり、プレフィルドシリンジ内の抗体濃度が約200mg/mLである。ある実施態様において、デバイスは、2.25-mLプレフィルドシリンジであり、プレフィルドシリンジ内の抗体濃度が約200mg/mLである。ある実施態様において、デバイスは、2.5-mLのプレフィルドシリンジであり、プレフィルドシリンジ内の抗体濃度が約200mg/mLである。ある実施態様において、フルフラットな用量（full flat dose）を得るために、複数のシリンジ、例えば、1筒のシリンジ、2筒のシリンジ、3筒のシリンジ、又は4筒のシリンジを用いてもよい。代替的な実施態様において、高用量、シングルユースの、皮下注入デバイスは、フルフラットな用量（full flat dose）、例えば、3mL、4mL、5mL、6mL、7mL、8mL、9mL又は10mLを投与することができる用量を得るために、使用されてもよい。

30

【0041】

ある実施態様において、用量が800mgであり、200mg/mLの抗PCSK9抗体を含む2筒の2.25mLシリンジを用いて、8週間毎に投与する。ある実施態様において、用量が800mgであり、200mg/mLの濃度の抗PCSK9抗体を含む3筒の2.25mLシリンジを用いて8週間ごとに投与する。ある実施態様において、用量が800mgであり、200mg/mLの濃度の抗PCSK9抗体を含む2筒の2.25mLシリンジを用いて、10週間ごとに投与する。ある実施態様において、用量が800mgであり、200mg/mLの濃度の抗PCSK9抗体を含む3筒の2.25mLシリンジを用いて10週間ごとに投与する。ある実施態様において、用量が800mgであり、200mg/mLの濃度の抗PCSK9抗体を含む2筒の2.25mLシリンジを用いて、12週間ごとに投与する。ある実施態様において、用量が800mgであり、200m

40

50

g/mLの濃度の抗PCSK9抗体を含む3筒の2.25mLシリンジを用いて、12週間ごとに投与する。ある実施態様において、用量が800mgであり、高容量、シングルユースの、200mg/mLの抗PCSK9抗体の4mLを含む皮下注入デバイスを用いて、8週間ごとに投与する。

【0042】

ある実施態様において、用量が760mgであり、200mg/mLの濃度の抗PCSK9抗体を含む2筒の2.25mLシリンジを用いて、8週間ごとに投与する。ある実施態様において、用量が760mgであり、200mg/mLの濃度の抗PCSK9抗体を含む2筒の2.25mLシリンジを用いて、10週間ごとに投与する。ある実施態様において、用量が760mgであり、200mg/mLの濃度の抗PCSK9抗体を含む2筒の2.25mLシリンジを用いて、12週間ごとに投与する。

10

【0043】

ある実施態様において、用量が600mgであり、200mg/mLの濃度の抗PCSK9抗体を含む2筒の2.25mLシリンジを用いて、8週間ごとに投与する。ある実施態様において、用量が600mgであり、200mg/mLの濃度の抗PCSK9抗体を含む2筒の2.25mLシリンジを用いて、12週間ごとに投与する。

【0044】

ある実施態様において、用量が400mgであり、200mg/mLの濃度の抗PCSK9抗体を含む1筒の2.5mLシリンジを用いて、4週間ごとに投与する。ある実施態様において、用量が400mgであり、200mg/mLの濃度の抗PCSK9抗体を含む2筒の2.25mLシリンジを用いて、4週間ごとに投与する。ある実施態様において、用量が380mgであり、200mg/mLの濃度の抗PCSK9抗体を含む1筒の2.25mLシリンジを用いて、4週間ごとに投与する。

20

【0045】

ある実施態様において、本明細書に記載される方法は、第二の医薬の有効量を被検体に投与することを更に含み、ここで抗PCSK9抗体が第一の医薬である。一実施態様において、第二の医薬はLDLRタンパク質のレベルを上昇させる。別の実施態様において、第二の医薬はLDLコレステロールのレベルを減少させる。別の実施態様において、第二の医薬はスタチンを含む。別の実施態様において、スタチンは、アトルバスタチン、フルバスタチン、ロバスタチン、メバスタチン、ピタバスタチン、プラバスタチン、ロスバスタチン、シンバスタチン、及びそれらの任意の組み合わせから成る群から選択される。別の実施態様において、第二の医薬はHDLコレステロールのレベルを上昇させる。所定の実施態様において、被検体又は個体はヒトである。

30

【0046】

一態様において、本発明は、PCSK9タンパク質を含むことが疑われるサンプル中でPCSK9タンパク質を検出する方法に関し、該方法は、(a)本明細書に記載される抗PCSK9抗体とサンプルを接触させ；(b)抗PCSK9抗体とPCSK9タンパク質の間の複合体の形成を検出することを含む。一実施態様において、抗PCSK9抗体は検出可能に標識されている。

【0047】

本明細書に記載される任意の実施態様又はその組み合わせは、任意かつ全ての抗PCSK9抗体、本明細書に記載される発明の方法及び使用に適用する。

40

【図面の簡単な説明】

【0048】

【図1】図1は、抗PCSK9抗体の、重鎖HVR配列、H1（出現順にそれぞれ、配列番号1、1、11、1、2、42、3、3、1）、H2（配列番号4として全て開示）、及びH3（配列番号5として全て開示）、及び軽鎖HVR配列、L1（出現順にそれぞれ、配列番号6、7、7、7、7、7、7、77、及び7）、L2（出現順にそれぞれ、配列番号26、8、8、8、8、8、8、8、8、及び8）及びL3（出現順にそれぞれ、配列番号9、9、10、10、11、12、12、13、33、及び14）を示す。

50

【図2A-B】図2A-Bは、抗PCSK9抗体の、(A)重鎖可変ドメイン(出現順にそれぞれ、配列番号15、27、15、27、27、16、43、17、17、及び27)、及び(B)軽鎖可変ドメイン(出現順にそれぞれ、配列番号18、44、19、19、20、21、21、22、34、及び23)を示す。位置は、Kabatに従って番号付けられ、超可変領域は囲まれている。

【図3A-D】図3A-Dは、(A)ヒトPCSK9、(B)マウスPCSK9、(C)カニクイザルPCSK9及びラットPCSK9、及び(D)アカゲザルPCSK9に対する抗PCSK9抗体(IgG)の解離定数を示す。

【図4】抗PCSK9抗体は、競合結合ELISAにおいてLDLRへのPCSK9結合を阻害する。ブランク(抗体なし、白四角)及びコントロール抗体(白丸)は破線で示されている。抗PCSK9抗体は実線で示されている。抗PCSK9抗体のIC₅₀値が表に示されている。

【図5】抗PCSK9抗体の異なる濃度を15 µg/mlのPCSK9と共にインキュベートし、4時間He p G 2細胞に添加した。細胞は、表面LDLRのFACS解析のために処理した。データは、抗PCSK9抗体がLDLRダウンレギュレーションを効果的に防いだことを示している。陽性コントロールはPCSK9で処理されていない細胞である。

【図6】抗LDLR抗体を用いたウエスタンブロットは、マウス肝臓において1時間の30 µgのPCSK9がLDLRレベルを有意にダウンレギュレートしたことを示している。

【図7】抗LDLR抗体によるウエスタンブロットは、全5つの抗PCSK9抗体が、マウスの肝臓でLDLRダウンレギュレーションを防いだことを示している。下のイムノブロットの図は、治療群あたり4肝臓のプール(各肝臓からのタンパク質が10 µg)である。

【図8】図8は、単回I.V.注射後のC57JBL/6マウスの血清中の抗PCSK9抗体濃度を示す。示されるのは、投薬群0.5 mg/kg; 5 mg/kg、及び20 mg/kg (n=3)の平均濃度である。

【図9】図9は、5 mg/kgの抗PCSK9抗体のI.V.注射後のC57JBL/6野生型 及びPCSK9^{-/-}マウスの血清中における抗PCSK9抗体の濃度を示す。各投薬群の平均濃度が示される(n=3)。

【図10】図10は、単回I.V.注射後の個々のカニクイザルの血清中の抗PCSK9抗体濃度を示す。3つの投薬群には、5 mg/kg; 20 mg/kg; 及び60 mg/kgが含まれている。

【図11】図11は、単回I.V.注射後のカニクイザルの血清中の抗PCSK9抗体濃度を示す。示されるのは、投薬群5 mg/kg; 20 mg/kg、及び60 mg/kg (n=3)の平均濃度である。

【図12】図12は、8つのコントロール(Crt1)又は抗PCSK9抗体のどちらかの単回投薬(10 mg/kg体重)により治療されたマウスの血清中の総コレステロールのレベルを示す。コレステロールのレベルは図に示されるように異なる日に測定された。

【図13】図13は、コントロール又は抗PCSK9抗体のどちらかの単回投薬(10 mg/kg体重)により治療されたマウス由来の血清中の総コレステロールのレベルを示す。

【図14】図14は、コホートAからJを含む第I相試験のデザインの概略図を示す。各コホートは、活性剤で治療された患者6例、及びプラセボで治療された患者2例が含まれ、コホートあたりの患者は8例であり、合計で80例の患者である。

【図15】図15は、AからJの試験コホートについての薬物動態データを示している。単回投与コホートAからE、及びJの結果が左のパネルに示し、複数回投与コホートFからIからの結果は、右のパネルに示している。赤矢印は、薬剤投与のタイミングを示している。

【図16】図16は、単回投与コホートについて、LDL-c (mg/dL) レベルにお

10

20

30

40

50

けるベースラインからの平均絶対変化を示している。

【図 17】図 17 は、単回投与コホートについて、LDL-c レベルにおけるベースラインからの平均変化率を示している。

【図 18】図 18 は、複数回投与コホートについて、LDL-c (mg/dL) レベルでのベースラインからの平均絶対変化を示している。

【図 19】図 19 は、複数回投与コホートについて、LDL-c 値におけるベースラインからの平均変化率を示している。

【図 20】図 20 は、200 mM のアルギニンコハク酸、0.02 % の PS20、pH 5.5 の製剤中のタンパク質濃度の関数としての抗 PCSK9 の粘度を示す。

【図 21】図 21 は、2 cc のガラスバイアル中のポリソルベート 20 (PS20) の種々の濃度を含む攪拌した抗 PCSK9 サンプル及びその対照について、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) (左のパネル) 及び濁度 (右のパネル) の分析を示している。

【図 22】図 22 は、ペプチドマッピングによる様々な条件下で抗 PCSK9 中のメチオニン及びトリプトファン残基の酸化を示している。

【図 23】図 23 は、ペプチドマッピングによる様々な条件下で、抗 PCSK9 の CDR 中及び隣接するメチオニン及びトリプトファン残基の酸化を示している。

【図 24】図 24 は、pH 5.0 ~ 6.5 (200 mM のアルギニンコハク酸、pH 5.0 ~ 6.0 の 0.02 % の PS20 又は 20 mM のヒスチジン HCl、160 mM の塩酸アルギニン、pH 6.5 の 0.02 % の PS20) の 200 mg/ml の抗 PCSK9 に対する、イオン交換クロマトグラフィー (IEC) (左のパネル) 及び SEC (右のパネル) の pH 速度プロフィールを示す。

【図 25】図 25 は、HCl 製剤 (20 mM のヒスチジン塩酸塩、160 mM のアルギニン塩酸塩、0.02 % の PS20、pH 6.0) における、200 mg/mL の抗 PCSK9) 及び Acetate 製剤 (20 mM のヒスチジンアセテート、160 mM のアルギニンアセテート、0.02 % の PS20、pH 6.0) における、200 mg/mL の抗 PCSK9) において凍結保存中の抗 PCSK9 について、SEC によるメインピーク (左のパネル) (%) 及び高分子量種 (HMWS) (%) のデータを示している。

【図 26】図 26 は、40 °C 保存 1 ヶ月後の CE-SDS (上)、SEC (中央)、及び IEC (下) による、pH 6.0 の 200 mg/mL の抗 PCSK9 におけるカウンターイオンの影響を示している。

【図 27】図 27 は、試験薬の用量コホートの概要、抗 PCSK9 抗体の投与レジメン、及び試験の各群の患者数を含む、第 I 相臨床試験の試験デザインを示している。

【図 28】図 28 は、抗 PCSK9 抗体又はプラセボを投与された患者における、平均薬物動態 (+/- 標準偏差) (左のパネル) 及び、PCSK9 の合計の平均 (+/- 標準誤差) (右のパネル) を示している。

【図 29】図 29 は、抗 PCSK9 抗体又はプラセボを投与された患者で認められた直接法の LDL コレステロールのベースラインからの絶対変化を示す。

【図 30】図 30 は、抗 PCSK9 抗体又はプラセボを投与された患者で認められた直接法の LDL コレステロールのベースラインからの相対変化を示す。

【図 31】図 31 は、抗 PCSK9 抗体又はプラセボを投与された患者で認められた総コレステロールのベースラインからの絶対変化を示す。

【図 32】図 32 は、抗 PCSK9 抗体又はプラセボを投与された患者で認められた総コレステロールのベースラインからの相対変化を示す。

【図 33】図 33 は、抗 PCSK9 抗体又はプラセボを投与された患者における非 HDL コレステロールのベースラインからの絶対変化を示す。

【図 34】図 34 は、抗 PCSK9 抗体又はプラセボを投与された患者における非 HDL コレステロールのベースラインからの相対変化を示す。

【図 35】図 35 は、抗 PCSK9 抗体又はプラセボを投与された患者におけるアポリポタンパク質 B のベースラインからの絶対変化を示す。

【図 36】図 36 は、抗 PCSK9 抗体又はプラセボを投与された患者におけるアポリポ

10

20

30

40

50

タンパク質 B のベースラインからの相対変化を示す。

【図 3 7】図 3 7 A は、少なくとも一回の来院で抗 P C S K 9 抗体又はプラセボを投与した後、直接法の L D L - c 値が 1 5 m g / d L 以下の患者の割合を示し、図 3 7 B は、少なくとも一回の来院で抗 P C S K 9 抗体又はプラセボを投与された後、直接法の L D L - c 値が 2 5 m g / d L 以下の患者の割合を示している。

【 0 0 4 9 】

本発明の実施態様の詳細な記述

本明細書に記載され又は参照される技術及び手順は一般に良く理解され、かつ、当業者による従来の方法論、例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd. edition(2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY(F. M. Ausubel, et al. eds.,(2003)); the series METHODS IN ENZYMOLOGY(Academic Press, Inc.): PCR 2: A PRACTICAL APPROACH(M. J. MacPherson, B. D. Hames and G. R. Taylor eds.(1995)), Harlow and Lane, eds.(1988) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, and ANIMAL CELL CULTURE(R. I. Freshney, ed.(1987)); Oligonucleotide Synthesis(M. J. Gait, ed., 1984); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook(J. E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; Animal Cell Culture(R. I. Freshney), ed., 1987); Introduction to Cell and Tissue Culture(J. P. Mather and P. E. Roberts, 1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures(A. Doyle, J. B. Griffiths, and D. G. Newell, eds., 1993-8) J. Wiley and Sons; Handbook of Experimental Immunology(D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds.); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells(J. M. Miller and M. P. Calos, eds., 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction,(Mullis et al., eds., 1994); Current Protocols in Immunology(J. E. Coligan et al., eds., 1991); Short Protocols in Molecular Biology(Wiley and Sons, 1999); Immunobiology(C. A. Janeway and P. Travers, 1997); Antibodies(P. Finch, 1997); Antibodies: A Practical Approach(D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); Monoclonal Antibodies: A Practical Approach(P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using Antibodies: A Laboratory Manual(E. Harlow and D. Lane(Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies(M. Zanetti and J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995); and Cancer: Principles and Practice of Oncology(V. T. DeVita et al., eds., J.B. Lippincott Company, 1993)に記載される広く利用される方法論を使用して通常利用されている。

【 0 0 5 0 】

I. 定義

別に規定されない限り、本明細書で使用される技術用語及び科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を持つ。Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 2nd ed., J. Wiley & Sons(New York, N.Y. 1994), 及びMarch, Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure 4th ed., John Wiley & Sons(New York, N.Y. 1992)は、当業者に、本出願で使用される多くの用語に対する一般的な指針を提供する。本明細書に引用される全ての参考文献は、特許出願及び刊行物を含み、その全体が参考により援用される。

【 0 0 5 1 】

本明細書を解釈する目的のために、以下の定義が適用され、適切な場合はいつでも、単数で使われる用語はまたその逆も複数形を含む。本明細書で用いる用語は、特定の実施態様を説明するためのものであり、限定することを目的としていないことを理解すべきである。以下に記載される任意の定義が参照により本明細書に組み込まれる任意の文書との競合する場合には、以下に記載される定義が統制するべきである。

【 0 0 5 2 】

本明細書及び請求項を通じて、免疫グロブリン重鎖の残基の番号付けは、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service

, National Institutes of Health, Bethesda, Md.(1991)にあるE Uインデックスのそれであり、参照により本明細書に明示的に援用される。

【0053】

本明細書における目的のための「アクセプターヒトフレームワーク」とは、下記に定義されるように、ヒト免疫グロブリンフレームワーク又はヒトコンセンサスフレームワークから得られる軽鎖可変ドメイン(VL)フレームワーク又は重鎖可変ドメイン(VH)フレームワークのアミノ酸配列を含有するフレームワークである。ヒト免疫グロブリンのフレームワーク又はヒトコンセンサスフレームワーク「に由来する」アクセプターヒトフレームワークは、その同一のアミノ酸配列を含んでもよく、又はそれはアミノ酸配列の変化を含み得る。幾つかの実施態様において、アミノ酸変化の数は、10以下、9以下、8以下、7以下、6以下、5以下、4以下、3以下、又は2以下である。幾つかの実施態様において、VLアクセプターヒトフレームワークは、Vはヒト免疫グロブリンのフレームワーク配列又はヒトコンセンサスフレームワーク配列に、配列が同一である。

10

【0054】

「親和性」とは、分子(例えば、抗体)の単一結合部位とその結合パートナー(例えば、抗原)との間の非共有結合相互作用の総和の強度を指す。本明細書で使用する場合、特に断らない限り、「結合親和性」は、結合対(例えば、抗体と抗原)のメンバー間の1:1の相互作用を反映している本質的な結合親和性を指す。そのパートナーYに対する分子Xの親和性は、一般的に解離定数(Kd)で表すことができる。親和性は、本明細書に記載したものを含む、当技術分野で知られている一般的な方法によって測定することができる。結合親和性を測定するための具体的な例示であって典型的な実施態様は、以下で説明される。

20

【0055】

「親和性成熟」抗体とは、その改変を有していない親抗体と比較して、抗原に対する抗体の親和性に改良を生じせしめる、その一又は複数の超可変領域(HVR)において一又は複数の改変を持つものである。

【0056】

用語「抗PCSK9抗体」、「抗PCSK9」、「PCSK9抗体」及び「PCSK9に結合する抗体」は、PCSK9を標的とし、診断薬剤及び/又は治療的薬剤として有用であるように十分な親和性でPCSK9に結合することができる抗体を指す。一実施態様において、抗PCSK9抗体の、無関係な、非PCSK9タンパク質への結合の程度は、例えば、ラジオイムノアッセイ(RIA)によって測定される場合、抗体のPCSK9への結合の約10%未満である。ある実施態様において、PCSK9へ結合する抗体は、解離定数(Kd)が、 $\leq 1 \mu\text{M}$ 、 $\leq 100 \text{ nM}$ 、 $\leq 10 \text{ nM}$ 、 $\leq 1 \text{ nM}$ 、 $\leq 0.1 \text{ nM}$ 、 $\leq 0.01 \text{ nM}$ 、又は $\leq 0.001 \text{ nM}$ (例えば、 10^{-8} M 未満、例えば、 10^{-8} M から 10^{-13} M 、例えば、 10^{-9} M から 10^{-13} M)を有する。ある実施態様において、抗PCSK9抗体は、異なる種由来のPCSK9間で保存されているPCSK9のエピトープに結合する。

30

【0057】

用語「抗体」は最も広い意味で用いられ、様々な抗体構造を包含し、限定されないが、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多特異性抗体(例えば二重特異性抗体)、及び、所望の抗原結合活性を示す限り、抗体断片を含む。

40

【0058】

「抗体断片」は、インタクトな抗体が結合する抗原に結合するインタクトな抗体の一部を含むインタクトな抗体以外の分子を指す。抗体断片の例としては、限定されないが、Fv、Fab、Fab'、Fab'-SHは、F(ab')₂、ダイアボディ、直鎖状抗体、単鎖抗体分子(例えばscFv)、及び抗体断片から形成された多重特異性抗体を含む。抗体のパパイン消化は、「Fab」断片と呼ばれる2つの同一の抗体結合断片を生成し、その各々は単一の抗原結合部位を持ち、残りは容易に結晶化する能力を反映して「Fc」断片と命名される。パパイン処置は、2つの抗原結合部位を有し、なお抗原を架橋する

50

ことが可能な $F(a b')_2$ 断片を産生する。

【0059】

参照抗体として「同一のエピトープに結合する抗体」とは、競合アッセイにおいて50%以上、参照抗体のその抗原への結合をブロックする抗体、逆に競合アッセイにおいて50%以上、その抗体のその抗原への結合をブロックするその参照抗体を指す。典型的な競合アッセイが、本明細書において提供される。ある実施態様において、PCSK9に結合した抗PCSK9抗体Fab断片の結晶構造に基づいてエピトープが決定される。

【0060】

用語「キメラ」抗体は、重鎖及び／又は軽鎖の一部が特定の起源又は種から由来し、一方重鎖及び／又は軽鎖の残りが異なる起源又は種から由来する抗体を指す。

10

【0061】

抗体の「クラス」は、その重鎖が保有する定常ドメイン又は定常領域のタイプを指す。抗体の5つの主要なクラスがあり：IgA、IgD、IgE、IgG及びIgM、及びこれらのいくつかは、さらにサブクラス（アイソタイプ）、例えば、IgG₁、IgG₂に、IgG₃、IgG₄、IGA₁、及びIgA₂に分けることができる。免疫グロブリンの異なるクラスに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ α 、 δ 、 ϵ 、 γ 、及び μ と呼ばれる。

【0062】

本明細書で用いられる「細胞傷害性薬物」という用語は、細胞の機能を阻害又は阻止し及び／又は細胞破壊を生ずる物質を指す。細胞傷害性薬物は、限定されないが、放射性同位体（例えば、At²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²、P³²、Pb²¹²及びLuの放射性同位体）：化学療法剤又は薬物（例えば、メトトレキセート、アドリアマイシン、ビンカルカロイド（ビンクリスチン、ビンブラスチン、エトポシド）、ドキソルビシン、メルファラン、マイトマイシンC、クロラムブシル、ダウノルビシンまたは他の挿入剤）、増殖阻害剤、酵素及びその断片、例えば核酸分解酵素など、抗生物質、小分子毒素などの毒素、又は細菌、真菌、植物又は動物由来の酵素活性毒素（それらの断片及び／又はその変異体を含む）、及び以下に開示される様々な抗腫瘍剤又は抗癌剤を包含する。

20

【0063】

用語「ダイアボディ」は、2つの抗原結合部位を持つ抗体断片を指し、その断片は、同一ポリペプチド鎖（VH-VL）の軽鎖可変ドメイン（VL）に連結した重鎖可変ドメイン（VH）を含む。非常に短いために同一鎖上で2つのドメインの対形成ができないリンカーを使用して、ドメインを他の鎖の相補ドメインと強制的に対形成させ、2つの抗原結合部位を創製する。ダイアボディは二価でも二特異性であってもよい。ダイアボディは、例えば、欧州特許第404097号；国際公開第1993/11161号；Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134(2003)；及びHollinger et al., PNAS USA 90: 6444-6448(1993)に更に詳細に記載されている。トリアボディ及びテトラボディもまた Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134(2003)に記載されている。

30

【0064】

「エフェクター機能」とは、抗体のアイソタイプにより変わる、抗体のFc領域に起因する生物学的活性を指す。抗体エフェクター機能の例としては、C1q結合及び補体依存性細胞傷害（CDC）；Fc受容体結合；抗体依存性細胞媒介性細胞障害（ADCC）；貪食、細胞表面受容体（例えば、B細胞受容体）のダウンレギュレーション、及びB細胞の活性化を含む。

40

【0065】

薬剤、例えば、薬学的製剤の「有効量」とは、所望の治療的又予防的結果を達成するために必要な用量及び期間での有効な量を指す。

【0066】

「Fab」断片は、重鎖と軽鎖可変ドメインを含み、かつまた軽鎖の定常ドメイン及び重鎖の第一定常ドメイン（CH1）を含む。Fab'断片は、抗体ヒンジ領域からの1つ

50

又は複数のシステインを含む重鎖 C H 1 ドメインのカルボキシル末端で 2 ～ 3 の付加残基を有する点が F a b 断片とは異なる。F a b ' - S H は、本明細書において、F a b ' の一般名称であり、定常ドメインのシステイン残基が遊離チオール基を持つ。F (a b ') 2 抗体断片は、間にヒンジシステインを有する F a b ' 断片の対として生産された。また、抗体断片の他の化学結合も知られている。抗体断片の他の化学結合も知られている。

【0067】

用語「F c 領域」は、定常領域の少なくとも一部を含む、免疫グロブリン重鎖の C 末端領域を定義するために使用される。その用語は、天然配列 F c 領域と変異体 F c 領域を含む。ある実施態様において、ヒト I g G 重鎖 F c 領域は C y s 2 2 6 又は P r o 2 3 0 から重鎖のカルボキシル末端まで伸長する。しかし、F c 領域の C 末端リジン (L y s 4 4 7) は存在しているか、又は存在していない場合がある。本明細書に明記されていない限り、F c 領域又は定常領域内のアミノ酸残基の番号付けは、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991 に記載されるように、E U インデックスとも呼ばれる E U 番号付けシステムに従う。Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

【0068】

「フレームワーク」又は「F R」は、超可変領域 (H V R) 残基以外の可変ドメイン残基を指す。可変ドメインの F R は、一般的に 4 つの F R のドメイン: F R 1、F R 2、F R 3、及び F R 4 からなる。従って、H V R 及び F R 配列は一般に V H (又は V L) の以下の配列に現れる: F R 1 - H 1 (L 1) - F R 2 - H 2 (L 2) - F R 3 - H 3 (L 3) - F R 4。

【0069】

用語「完全長抗体」、「インタクトな抗体」及び「全抗体」は、本明細書中で互換的に使用され、天然型抗体構造と実質的に類似の構造を有するか、又は本明細書で定義される F c 領域を含む重鎖を有する抗体を指す。

【0070】

「F v」は、完全な抗原結合部位を含む最小抗体断片である。一実施態様において、2 本鎖「F v」種は、一本の重鎖と一本の軽鎖の可変ドメインが、堅固な非共有結合をなした二量体からなる。一本鎖 F v (s c F v) 種では、柔軟なペプチドリンカーによって 1 の重鎖及び 1 の軽鎖可変ドメインは共有結合性に連結することができ、よって軽鎖及び重鎖は、二本鎖 F v 種におけるものと類似の「二量体」構造に結合することができる。この配置において、各可変ドメインの 3 つの H V R は相互作用し、V H - V L 二量体の表面に抗原結合部位を形成する。集合的に、6 つの H V R が抗体に抗原結合特異性を付与する。しかしながら、単一の可変ドメイン (又は抗原に対して特異的な 3 つの H V R のみを含む F v の半分) でさえ、全結合部位よりも親和性が低くなるが、抗原を認識して結合する能力を有している。

【0071】

用語「宿主細胞」、「宿主細胞株」及び「宿主細胞培養」は互換的に使用され、外因性の核酸が導入された細胞を指し、そのような細胞の子孫を含める。宿主細胞は、「形質転換体」及び「形質転換された細胞」を含み、継代の数に関係なく、それに由来する一次形質転換細胞及び子孫が含まれる。子孫は親細胞と核酸含量が完全に同一ではないかもしれないが、突然変異が含まれる場合がある。最初に形質転換された細胞においてスクリーニングまたは選択されたものと同じ機能又は生物活性を有する変異型子孫が本明細書において含まれる。

【0072】

「ヒト抗体」は、ヒト又はヒト細胞により産生されるか、又はヒト抗体のレパートリー又は他のヒト抗体をコードする配列を利用した非ヒト起源に由来する抗体のそれに対応するアミノ酸配列を有するものである。ヒト抗体のこの定義は、非ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体を特に除外する。

【0073】

「ヒトコンセンサスフレームワーク」とは、ヒト免疫グロブリンV L又はV Hフレームワーク配列の選択において最も一般的に存在するアミノ酸残基を表すフレームワークである。一般的には、ヒト免疫グロブリンV L又はV H配列の選択は、可変ドメイン配列のサブグループからのものである。一般的には、配列のサブグループは、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD(1991), vols. 1-3にあるサブグループである。一実施態様において、V Lについて、サブグループは上掲のK a b a tらにあるサブグループカップ I である。一実施態様において、V Hについて、サブグループは上掲のK a b a tらにあるサブグループ I I I である。

10

【0074】

「ヒト化」抗体は、非ヒトH V R由来のアミノ酸残基、及びヒトF R由来アミノ酸残基を含むキメラ抗体を指す。所定の実施態様において、ヒト化抗体は、少なくとも一つ、典型的には2つの可変ドメインの全てを実質的に含み、H V R（例えば、C D R）の全て又は実質的に全てが、非ヒト抗体のものに対応し、全てまたは実質的にF Rの全てが、ヒト抗体のものに対応する。ヒト化抗体は、任意で、ヒト抗体由来の抗体定常領域の少なくとも一部を含んでもよい。抗体の「ヒト化型」、例えば、非ヒト抗体は、ヒト化を遂げた抗体を指す。

【0075】

本明細書で使用される用語「高コレステロール血症」は、コレステロールのレベルが所望のレベルを超えて上昇した状態を指す。ある実施態様において、L D Lコレステロールのレベルは所望のレベルを超えて上昇している。ある実施態様において、血清L D Lコレステロールのレベルは所望のレベルを超えて上昇している。

20

【0076】

本明細書で使用される用語「超可変領域」又は「H V R」は、配列が超可変であるか、及び／又は構造的に定義されたループ（「超可変ループ」）を形成する抗体可変ドメインの各領域を指す。一般的に、天然型4鎖抗体は、V H（H 1、H 2、H 3）に3つ、及びV L（L 1、L 2、L 3）に3つの6つのH V R Sを含む。H V Rは、一般的に超可変ループ由来及び／又は「相補性決定領域」（C D R）由来のアミノ酸残基を含み、後者は、最高の配列可変性であり、及び／又は抗原認識に関与している。典型的な超可変ループはアミノ酸残基 26-32（L 1）、50-52（L 2）、91-96（L 3）、26-32（H 1）、53-55（H 2）、及び96-101（H 3）で生じる。(Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917(1987))。典型的なC D R（C D R-L 1、C D R-L 2、C D R-L 3、C D R-H 1、C D R-H 2、及びC D R-H 3）は、アミノ酸残基L 1の24-34、L 2の50-56、L 3の89-97、H 1の31-35 B、H 2の50-65、及びH 3の95-102に生じる。(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版、Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD(1991))。V HのC D R 1の例外を除いて、C D Rは一般的に超可変ループを形成するアミノ酸残基を含む。C D Rは、抗原に接触する残基である「特異性決定残基」又は「S D R」を含む。S D Rは、略称（abbreviated）C D R、又はa-C D Rと呼ばれる、C D Rの領域内に含まれている。典型的なa-C D R（a-C D R-L 1、a-C D R-L 2、a-C D R-L 3、a-C D R-H 1、a-C D R-H 2、及びa-C D R-H 3）は、アミノ酸残基L 1の31-34、L 2の50-55、L 3の89-96、H 1の31-35 B、H 2の50-58、及びH 3の95-102に生じる。(Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633(2008)を参照のこと)特に断らない限り、可変ドメイン内のH V R残基及び他の残基（例えば、F R残基）は、上掲のK a b a tらに従い、本明細書において番号が付けられる。

30

40

【0077】

「イムノコンジュゲート」は、1つ又は複数の異種分子にコンジュゲートした抗体であり、限定されないが、細胞傷害性薬物を含む。

50

【0078】

「個体」又は「被検体」は、哺乳動物である。哺乳動物は、限定されないが、家畜動物（例えば、ウシ、ヒツジ、ネコ、イヌ、ウマ）、霊長類（例えば、ヒト、サルなどの非ヒト霊長類）、ウサギ、げっ歯類（例えば、マウス及びラット）を含む。所定の実施態様において、個体又は被検体はヒトである。

【0079】

「単離された」抗体は、その自然環境の成分から分離されたものである。幾つかの実施態様において、抗体は、例えば、電気泳動（例えば、SDS-PAGE、等電点電気泳動（IEF）、キャピラリー電気泳動）又はクロマトグラフィー（例えば、イオン交換又は逆相HPLC）により決定されるように、95%以上または99%の純度に精製される。抗体純度の評価法の総説としては、例えばFlatman et al., J. Chromatogr. B 848:79-87 (2007)を参照のこと。

10

【0080】

「単離された」核酸は、その自然環境の成分から分離された核酸分子を指す。単離された核酸は、核酸分子を通常含む細胞に含まれる核酸分子を含むが、しかし、その核酸分子は、染色体外又はその自然の染色体上の位置とは異なる染色体位置に存在している。

【0081】

「抗PCSK9抗体をコードする単離された核酸」は、抗体の重鎖及び軽鎖（又はその断片）をコードする1つ又は複数の核酸分子を指し、単一のベクター又は別個のベクター内のそのような核酸分子、及び宿主細胞の1つ又は複数の位置に存在するそのような核酸分子を含む。

20

【0082】

本明細書で使用される用語「モノクローナル抗体」とは、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を意味し、すなわち、例えば、天然に生じる変異を含み、又はモノクローナル抗体製剤の製造時に発生し、一般的に少量で存在している変異体などの、可能性のある変異体抗体を除き、集団を構成する個々の抗体は同一であり、及び／又は同じエピトープに結合する。異なる決定基（エピトープ）に対する異なる抗体を一般的に含む、ポリクローナル抗体調製物とは対照的に、モノクローナル抗体調製物の各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対するものである。従って、修飾語「モノクローナル」は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体の特徴を示し、任意の特定の方法による抗体の産生を必要とするものとして解釈されるべきではない。例えば、本発明に従って使用されるモノクローナル抗体は、限定されないが、ハイブリドーマ法、組換えDNA法、ファージディスプレイ法、ヒト免疫グロブリン遺伝子座の全部又は一部を含むトランスジェニック動物を利用する方法を含む様々な技術によって作成され、モノクローナル抗体を作製するためのそのような方法及び他の例示的な方法は、本明細書に記載されている。

30

【0083】

「ネイキッド抗体」とは、異種の部分（例えば、細胞傷害性部分）又は放射性標識にコンジュゲートしていない抗体を指す。ネイキッド抗体は薬学的製剤中に存在してもよい。

【0084】

「天然型抗体」は、天然に生じる様々な構造をとる免疫グロブリン分子を指す。例えば、天然型IgG抗体は、ジスルフィド結合している2つの同一の軽鎖と2つの同一の重鎖から成る約150,000ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。N末端からC末端に、各重鎖は、可変重鎖ドメイン又は重鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域（VH）を有し、3つの定常ドメイン（CH1、CH2及びCH3）が続く。同様に、N末端からC末端に、各軽鎖は、可変軽鎖ドメイン又は軽鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域（VL）を有し、定常軽鎖（CL）ドメインが続く。抗体の軽鎖は、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ（κ）とラムダ（λ）と呼ばれる、2つのタイプのいずれかに割り当てることができる。

40

【0085】

用語「パッケージ挿入物」は、効能、用法、用量、投与、併用療法、禁忌についての情

50

報、及び／又はそのような治療用製品の使用に関する警告を含む、治療用製品の商用パッケージに慣習的に含まれている指示書を指すために使用される。

【0086】

「参照ポリペプチド配列に関する「パーセント (%) アミノ酸配列同一性」は、配列を整列させ、最大のパーセント配列同一性を得るために必要ならば間隙を導入した後、如何なる保存的置換も配列同一性の一部と考えないとした、参照ポリペプチドのアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセントとして定義される。パーセントアミノ酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、当業者の技量の範囲にある種々の方法、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGN、又はMegalign (DNASTAR) ソフトウェアのような公に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用することにより達成可能である。当業者であれば、比較される配列の完全長に対して最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、配列をアラインするための適切なパラメーターを決定することができる。しかし、ここでの目的のためには、%アミノ酸配列同一性の値は、配列比較コンピュータプログラムALIGN-2を使用することによって生成される。ALIGN-2 配列比較コンピュータプログラムはジェネテック社によって作製され、ソースコードは米国著作権庁、ワシントンD. C. , 20559に使用者用書類とともに提出され、米国著作権登録番号TXU510087の下で登録されている。ALIGN-2もまた、ジェネテック社、サウスサンフランシスコ、カリフォルニアから公的に入手可能であり、又はそのソースコードからコンパイルすることができる。ALIGN-2 プログラムは、デジタルUNIXのV4.0Dを含む、UNIXオペレーティングシステム上での使用のためにコンパイルされるべきである。全ての配列比較パラメーターは、ALIGN-2 プログラムによって設定され変動しない。

【0087】

アミノ酸配列比較にALIGN-2 が用いられる状況では、与えられたアミノ酸配列Aの、与えられたアミノ酸配列Bとの、又はそれに対する%アミノ酸配列同一性（或いは、与えられたアミノ酸配列Bと、又はそれに対して所定の%アミノ酸配列同一性を持つ又は含む与えられたアミノ酸配列Aと言うこともできる）は次のように計算される：

分率X/Yの100倍

ここで、Xは配列アラインメントプログラムALIGN-2により、AとBのそのプログラムのアラインメントにおいて同一と一致したスコアのアミノ酸残基の数であり、YはBの全アミノ酸残基数である。アミノ酸配列Aの長さがアミノ酸配列Bの長さと異なる場合、AのBに対する%アミノ酸配列同一性は、BのAに対する%アミノ酸配列同一性とは異なることは理解されるであろう。特に断らない限り、本明細書で使用されるすべての%アミノ酸配列同一性値が、ALIGN-2 コンピュータプログラムを使用し、直前の段落で説明したように、得られる。

【0088】

用語「薬学的製剤」又は「薬学的組成物」は、その中に有効で含有される活性成分の生物学的活性を許容するような形態であって、製剤を投与する被検体にとって許容できない毒性である他の成分を含まない調製物を指す。

【0089】

「薬学的に許容される担体」は、被検体に非毒性であり、有効成分以外の製剤処方中の成分を指す。薬学的に許容される担体は、限定されないが、緩衝剤、賦形剤、安定剤、又は保存剤を含む。

【0090】

特に断らない限り、本明細書で使用する用語「プロタンパク質転換酵素サブチリシンケキシタイプ9」「PCSK9」又は「NARC16-1」は、霊長類（例えばヒト）及びげっ歯類（例えば、マウス、ラット）などの哺乳動物を含む任意の脊椎動物由来の任意の天然型PCSK9を指す。その用語は、「完全長」、未処理のPCSK9並びに細胞内でのプロセッシングから生じた任意の形態のPCSK9又はその断片を包含する。その用語はまた、天然に存在するPCSK9の変異体、例えば、スプライス変異体又は対立遺伝

子変異体を包含する。

【0091】

本明細書で使用される用語「PCSK9抗体」又はPCSK9の「生物学的活性」は、PCSK9の任意の生物学的作用を包含する。ある実施態様において、PCSK9の活性は、基質または受容体に相互作用するか又は結合するPCSK9の機能が含まれる。ある実施態様において、PCSK9の生物学的活性は、LDL受容体(LDLR)に結合するPCSK9の機能である。ある実施態様において、PCSK9はLDLRに結合し、LDLRが関与する反応を触媒する。ある実施態様において、PCSK9の活性は、LDLRの利用能を減少させ又は低減するPCSK9の機能が含まれる。ある実施態様において、PCSK9の生物学的活性は、被検体においてLDLの量を増加させるPCSK9の機能を含む。ある実施態様において、PCSK9の生物学的活性は、被検体においてLDLに結合するために利用可能であるLDLRの量を減少させるPCSK9の機能を含む。ある実施態様において、PCSK9の生物学的活性は、LDLに結合するために利用可能であるLDLRの量を減少させるPCSK9の機能を含む。ある実施態様において、PCSK9の生物学的活性は、PCSK9のシグナル伝達から生じる任意の生物学的活性を含む。

10

【0092】

「単鎖Fv」又は「scFv」抗体断片は、抗体のVHドメイン及びVLドメインを含み、これらのドメインは、単一のポリペプチド鎖に存在する。一般に、scFvポリペプチドはVH及びVLドメイン間にポリペプチドリッカーを更に含み、それはSFVが抗原結合に望まれる構造を形成することを可能にする。scFvの総説については、例えば、Pluckthun, in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York, 1994), 頁269-315を参照。

20

【0093】

本明細書で用いられるように、「治療」（及び「治療する(treat)」または「治療している(treating)」など文法上の変形）は、治療されている個体の自然経過を変えようと試みる臨床的介入を指し、予防のために、または臨床病理の過程においてのいずれかで実行できる。治療の望ましい効果は、限定されないが、疾患の発症又は再発を予防すること、症状の緩和、疾患の任意の直接的または間接的な病理学的帰結の縮小、疾患の進行の速度を遅らせること、疾患状態の改善又は緩和、及び寛解又は予後の改善を含む。幾つかの実施態様において、本発明の抗体は、疾患の発症を遅延させるか又は疾患の進行を遅くするために使用される。

30

【0094】

用語「可変領域」又は「可変ドメイン」は、抗体の抗原への結合に関与する抗体の重鎖または軽鎖のドメインを指す。天然型抗体の可変重鎖ドメイン及び軽鎖（それぞれVH及びVL）は、4つの保存されたフレームワーク領域(FR)と3つの超可変領域(HVR)を含む各ドメインを持ち、一般的に似たような構造を有する。（例えば、Kindt et al. Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., 91頁(2007)を参照）。単一のVH又はVLドメインが、抗原結合特異性を付与するのに十分であり得る。更に、特定の抗原に結合する抗体は、相補的なVL又はVHドメインのそれぞれのライブラリーをスクリーニングするために、抗原に特異的に結合する抗体由来のVH又はVLドメインを用いて単離することができる。例えば、Portolano et al., J. Immunol. 150:880-887(1993); Clarkson et al., Nature 352:624-628(1991)を参照。

40

【0095】

本明細書で使用される、用語「ベクター」は、それがリンクされている別の核酸を伝播することができる核酸分子を指す。この用語は、自己複製核酸構造としてのベクター、並びにそれが導入された宿主細胞のゲノムに組み込まれたベクターを含む。ある種のベクターは、それらが動作可能なようにリンクされている核酸の発現を指示することができる。このようなベクターは、本明細書では「発現ベクター」と言う。

【0096】

本明細書で使用されるように、単数形の「a」、「an」及び「the」は、特に指示

50

がない限り、複数への参照が含まれる。

【0097】

本明細書で用いられる「約」という用語は、容易にこの技術分野における当業者に知られているそれぞれの値についての通常の誤差範囲を意味する。本明細書中の「およそ」の値又はパラメーターへの言及は、その値又はパラメーター自体に対する実施態様を含む（記載する）。

【0098】

本明細書に記載される本発明の態様及び実施態様は、態様及び実施態様を「含む」及び／又は「から本質的になる」を含む。

【0099】

I. 組成物及び方法

一態様において、本発明は、抗PCSK9抗体で得られた実験結果に一部に基づいている。得られた結果は、抗PCSK9抗体によりPCSK9の生物学的活性を遮断することは、LDLRの減少の防止につながる。加えて、結果は、抗PCSK9抗体の投与が被験体における総LDLコレステロールのレベルを減少させることを実証している。従って、本発明のPCSK9抗体は、本明細書に記載のように、PCSK9に関連する病態、例えばコレステロール関連疾患を標的にすることに使用のための、重要な治療薬及び診断薬を提供する。

【0100】

ある実施態様において、「コレステロール関連疾患」は、高コレステロール血症、心臓病、メタボリックシンドローム、糖尿病、冠動脈心疾患、脳卒中、心血管疾患、アルツハイマー病、そして一般的に脂質代謝異常の任意の1つ又は複数を包含し、これらは、例えば、血清総コレステロールの上昇、LDLの上昇、トリグリセリドの上昇、VLDLの上昇、及び／又はHDLの低下によって明らかにすることができる。単独又は他の薬剤と併用のどちらかで抗PCSK9抗体を使用して治療可能な一次性及び二次性の脂質代謝異常の幾つかの非限定的な例は、メタボリックシンドローム、糖尿病、家族性複合型高脂血症、家族性高トリグリセリド血症、ヘテロ接合性高コレステロール血症、ヘテロ接合性高コレステロール血症、家族性高コレステロール血症（familial defective apolipoprotein B-100）を含む家族性高コレステロール血症；多遺伝子性高コレステロール血症；レムナントリムーバル疾患（remnant removal disease）、肝性リパーゼ欠損症；以下の任意に対する二次性の脂質異常症：食傷、甲状腺機能低下症、エストロゲン及びプロゲステロン治療、βブロッカー、及びチアジド系利尿薬を含む薬物；ネフローゼ症候群、慢性腎不全、クッシング症候群、原発性胆汁性肝硬変、糖原病、肝細胞腫、胆汁うっ滞、先端巨大症、インスリノーマ、成長ホルモン単独欠損症、及びアルコール誘導性高トリグリセリド血症を包含する。本明細書に記載される抗PCSK9抗体はまた動脈硬化性疾患、例えば、冠状動脈性心臓病、冠動脈疾患、末梢動脈疾患、脳卒中（虚血性及び出血性）、狭心症又は脳血管疾患及び急性冠動脈症候群、心筋梗塞の予防又は治療において有用であり得る。ある実施態様において、本明細書に記載される抗PCSK9抗体は、非致死性心臓発作、致命的及び非致死性脳卒中、特定の種類の心臓手術、心不全による入院、心臓疾患の患者における胸痛、及び／又は心臓病、以前の心臓発作、以前の心臓手術などを理由とする心血管系イベント及び／又は動脈血栓の所見のある胸痛のリスクを低減することにおいて有用である。ある実施態様において、抗PCSK9抗体及び本明細書に記載される方法は、心血管系イベントのリスクを低減させるために使用することができる。

【0101】

A. 典型的な抗PCSK9抗体

一態様において、本発明は、PCSK9に結合する単離された抗体を提供する。ある実施態様において、抗PCSK9抗体はPCSK9活性を調節する。

【0102】

一態様において、本発明は、（a）配列番号1、配列番号2又は配列番号42のアミノ

10

20

30

40

50

酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号4のアミノ酸配列を含むHVR-H2；(c)配列番号5のアミノ酸配列を含むHVR-H3；(d)配列番号6又は配列番号7のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(e)配列番号8又は配列番号26のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(f)配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13又は配列番号33のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される、少なくとも一、二、三、四、五、又は六つのHVRを含む抗PCSK9抗体を提供する。

【0103】

一態様において、本発明は、(a)配列番号1、配列番号2、配列番号3又は配列番号42のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号4のアミノ酸配列を含むHVR-H2；(c)配列番号5のアミノ酸配列を含むHVR-H3；(d)配列番号6又は配列番号7のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(e)配列番号8又は配列番号26のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(f)配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14又は配列番号33のアミノ酸配列を含む、六つのHVRを含む抗PCSK9抗体を提供する。

【0104】

一態様において、本発明は、(a)配列番号1、配列番号2又は配列番号42のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号4のアミノ酸配列を含むHVR-H2；及び(c)配列番号5のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される、少なくとも一つのVH-HVR配列、少なくとも二つのVH-HVR配列、又は三つ全てのVH-HVR配列を含む抗体を提供する。一実施態様において、抗体は、配列番号5のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む。一実施態様において、抗体は、配列番号5のアミノ酸配列を含むHVR-H3、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13又は配列番号33のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。更なる実施態様において、抗体は、配列番号5のアミノ酸配列を含むHVR-H3、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13又は配列番号33のアミノ酸配列を含むHVR-L3、及び配列番号4のアミノ酸配列を含むHVR-H2を含む。更なる実施態様において、抗体は、(a)配列番号1、配列番号2又は配列番号42のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号4のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(c)配列番号5のアミノ酸配列を含むHVR-H3を更に含む。

【0105】

別の実施態様において、本発明は、(a)配列番号6又は配列番号7のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(b)配列番号8又は配列番号26のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(c)配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13又は配列番号33のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される、少なくとも一つのVL-HVR配列、少なくとも二つのVL-HVR配列、又は三つ全てのVL-HVR配列を含む抗体を提供する。一実施態様において、抗体は、(a)配列番号6又は配列番号7のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(b)配列番号8又は配列番号26のアミノ酸配列を含むHVR-L2；(c)配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13又は配列番号33のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。

【0106】

その他の態様において、本発明の抗体は、(a)(i)配列番号1、配列番号2又は配列番号42のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii)配列番号4のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(iii)配列番号5のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される少なくとも一つのVH-HVR配列、少なくとも二つのVH-HVR配列、又は三つ全てのVH-HVR配列を含むVHドメイン、及び(b)(i)配列番号6又は配列番号7のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(ii)配列番号8又は配列番号26のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(c)配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13又は配列番号33のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される少なくとも一つのVL-HVR配列、少なくとも二つのVL-HVR配列、又は三つ全てのVL-HVR配列を含むVLドメインを含む。

【0107】

その他の態様において、本発明は、(a) 配列番号1のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b) 配列番号4のアミノ酸配列を含むHVR-H2；(c) 配列番号5のアミノ酸配列を含むHVR-H3；(d) 配列番号6のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(e) 配列番号26のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(f) 配列番号9のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む抗体を提供する。その他の態様において、本発明は、(a) 配列番号1のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b) 配列番号4のアミノ酸配列を含むHVR-H2；(c) 配列番号5のアミノ酸配列を含むHVR-H3；(d) 配列番号7のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(e) 配列番号8のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(f) 配列番号9のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む抗体を提供する。その他の態様において、本発明は、(a) 配列番号1のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b) 配列番号4のアミノ酸配列を含むHVR-H2；(c) 配列番号5のアミノ酸配列を含むHVR-H3；(d) 配列番号7のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(e) 配列番号8のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(f) 配列番号10のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む抗体を提供する。その他の態様において、本発明は、(a) 配列番号1のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b) 配列番号4のアミノ酸配列を含むHVR-H2；(c) 配列番号5のアミノ酸配列を含むHVR-H3；(d) 配列番号7のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(e) 配列番号8のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(f) 配列番号11のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む抗体を提供する。その他の態様において、本発明は、(a) 配列番号2のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b) 配列番号4のアミノ酸配列を含むHVR-H2；(c) 配列番号5のアミノ酸配列を含むHVR-H3；(d) 配列番号7のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(e) 配列番号8のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(f) 配列番号12のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む抗体を提供する。その他の態様において、本発明は、(a) 配列番号42のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b) 配列番号4のアミノ酸配列を含むHVR-H2；(c) 配列番号5のアミノ酸配列を含むHVR-H3；(d) 配列番号7のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(e) 配列番号8のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(f) 配列番号12のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む抗体を提供する。その他の態様において、本発明は、(a) 配列番号3のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b) 配列番号4のアミノ酸配列を含むHVR-H2；(c) 配列番号5のアミノ酸配列を含むHVR-H3；(d) 配列番号7のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(e) 配列番号8のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(f) 配列番号13のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む抗体を提供する。その他の態様において、本発明は、(a) 配列番号1のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b) 配列番号4のアミノ酸配列を含むHVR-H2；(c) 配列番号5のアミノ酸配列を含むHVR-H3；(d) 配列番号7のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(e) 配列番号8のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(f) 配列番号14のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む抗体を提供する。その他の態様において、本発明は、(a) 配列番号3のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b) 配列番号4のアミノ酸配列を含むHVR-H2；(c) 配列番号5のアミノ酸配列を含むHVR-H3；(d) 配列番号7のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(e) 配列番号8のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(f) 配列番号33のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む抗体を提供する。

【0108】

ある実施態様において、抗PCSK9抗体は、ヒト化されている。一実施態様において、抗PCSK9抗体は、上記実施態様のいずれかにおけるHVRを含み、更に、アクセプターヒトフレームワーク、例えばヒト免疫グロブリンのフレームワーク又はヒトコンセンサスフレームワークを含む。

【0109】

その他の態様において、抗PCSK9抗体は、配列番号15、配列番号16、配列番号17又は配列番号43のアミノ酸配列に対して、少なくとも90%、91%、92%、9

3 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は100 %の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン（VH）配列を含む。ある実施態様において、少なくとも90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、又は99 %の同一性を有するVH配列は、参照配列に対して置換（例えば保存的置換）、挿入、又は欠失を含むが、その配列を含むPCSK9抗体は、PCSK9へ結合する能力を保持する。所定の実施態様において、総計1から10のアミノ酸が、配列番号15、配列番号17、配列番号27又は配列番号43において、置換され、挿入され、及び／又は欠失している。所定の実施態様において、置換、挿入、又は欠失は、HVR外の（すなわちFR内の）領域で生じる。任意で、抗PCSK9抗体は、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号27、配列番号22又は配列番号43のVL配列を、その配列の翻訳後修飾を含め、包含する。特定の実施態様において、VHは、（a）配列番号1、配列番号2、配列番号3又は配列番号42のアミノ酸配列を含むHVR-H1、（b）配列番号4のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び（c）配列番号5のアミノ酸配列を含むHVR-H3、から選択される一、二、又は三のHVRを含む。

【0110】

その他の態様において、抗PCSK9抗体が提供され、その抗体は、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22又は配列番号44のアミノ酸配列に対して、少なくとも90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は100 %の配列同一性を有する軽鎖可変ドメイン（VL）を含む。ある実施態様において、少なくとも90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、又は99 %の同一性を有するVL配列は、参照配列に対して置換（例えば保存的置換）、挿入、又は欠失を含むが、その配列を含むPCSK9抗体は、PCSK9へ結合する能力を保持する。所定の実施態様において、総計1から10のアミノ酸が、配列番号18、配列番号19、配列番号20、又は配列番号21のVHにおいて、又は配列番号22、配列番号23、配列番号34、又は配列番号44において、置換され、挿入され、及び／又は欠失している。所定の実施態様において、置換、挿入、又は欠失は、HVR外の（すなわちFR内の）領域で生じる。任意で、抗PCSK9抗体は、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22又は配列番号44のVL配列を、その配列の翻訳後修飾を含め、包含する。特定の実施態様において、VLは、（a）配列番号6又は配列番号7のアミノ酸配列を含むHVR-L1；（b）配列番号8又は配列番号26のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び（c）配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13又は配列番号33のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される、一、二、又は三のHVRを含む。

【0111】

その他の態様において、抗PCSK9抗体が提供され、その抗体は、上記に与えられた実施態様のいずれかにあるVH、及び上記に与えられた実施態様のいずれかにあるVLを含む。一実施態様において、抗体は、配列の翻訳後修飾を含む、それぞれ配列番号15及び配列番号18のVHとVLを含む。一実施態様において、抗体は、配列の翻訳後修飾を含む、それぞれ配列番号27及び配列番号44のVHとVLを含む。一実施態様において、抗体は、配列の翻訳後修飾を含む、それぞれ配列番号15及び配列番号19のVHとVLを含む。一実施態様において、抗体は、配列の翻訳後修飾を含む、それぞれ配列番号27及び配列番号19のVHとVLを含む。一実施態様において、抗体は、配列の翻訳後修飾を含む、それぞれ配列番号27及び配列番号20のVHとVLを含む。一実施態様において、抗体は、配列の翻訳後修飾を含む、それぞれ配列番号16及び配列番号21のVHとVLを含む。一実施態様において、抗体は、配列の翻訳後修飾を含む、それぞれ配列番号43及び配列番号21のVHとVLを含む。一実施態様において、抗体は、配列の翻訳後修飾を含む、それぞれ配列番号17及び配列番号22のVHとVLを含む。一実施態様において、抗体は、配列の翻訳後修飾を含む、それぞれ配列番号27及び配列番号23のVHとVLを含む。一実施態様において、抗体は、配列の翻訳後修飾を含む、それぞれ配列番号17及び配列番号34のVHとVLを含む。

【0112】

その他の態様において、抗NRP1抗体は、配列番号35のアミノ酸配列に対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン（VH）配列を含む。ある実施態様において、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%の同一性を有するVH配列は、参照配列に対して置換（例えば保存的置換）、挿入、又は欠失を含むが、その配列を含むPCSK9抗体は、PCSK9へ結合する能力を保持する。ある実施態様において、配列番号35において、合計1から10のアミノ酸が、置換、挿入及び／又は欠失している。所定の実施態様において、置換、挿入、又は欠失は、HVR外の（すなわちFR内の）領域で生じる。任意で、抗PCSK9抗体は、配列番号15、配列番号16、配列番号17又は配列番号43のVL配列を、その配列の翻訳後修飾を含め、包含する。ある実施態様において、重鎖は、（a）配列番号1、配列番号2、配列番号3又は配列番号42のアミノ酸配列を含むHVR-H1、（b）配列番号4のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び（c）配列番号5のアミノ酸配列を含むHVR-H3、から選択される一、二、又は三のHVRを含む。

10

【0113】

その他の態様において、配列番号36のアミノ酸配列に対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する軽鎖可変ドメイン（VL）を含む、抗NRP1抗体が提供される。ある実施態様において、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%の同一性を有するVL配列は、参照配列に対して置換（例えば保存的置換）、挿入、又は欠失を含むが、その配列を含むPCSK9抗体は、PCSK9へ結合する能力を保持する。ある実施態様において、配列番号36において、合計1から10のアミノ酸が、置換、挿入及び／又は欠失している。所定の実施態様において、置換、挿入、又は欠失は、HVR外の（すなわちFR内の）領域で生じる。任意で、抗PCSK9抗体は、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22又は配列番号44のVL配列を、その配列の翻訳後修飾を含め、包含する。特定の実施態様において、VLは、（a）配列番号6又は配列番号7のアミノ酸配列を含むHVR-L1；（b）配列番号8又は配列番号26のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び（c）配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13又は配列番号33のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される、一、二、又は三のHVRを含む。

20

30

【0114】

その他の態様において、抗PCSK9抗体が提供され、その抗体は、上記に与えられた実施態様のいずれかにあるVH、及び上記に与えられた実施態様のいずれかにあるVLを含む。一実施態様において、二重特異性抗体は、配列番号35のアミノ酸配列を含む第一の重鎖、及び配列番号36のアミノ酸配列を含む第二の重鎖を含む。ある実施態様において、配列番号35は、C末端で、例えば、K451、又はG450及びK451が含まれていないが、1つ又は2つのアミノ酸がトランケートされる。ある実施態様において、配列番号35におけるP449はアミド化されている。

40

抗体508.20.33b重鎖アミノ酸配列（配列番号35）

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSSSTAIHWVRQA
PGKGLEWVARISPANGNTNYADSVKGRFTISADTSKNTAY
LQMNSLR AEDTAVYYCARWIGSRELYIMDYWGQGDTLVTVS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSSVVTVTPSSSLGTQ
TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVTLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSRE

50

EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPP
VLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHY
TQKSLSLSPGK

抗体 508. 20. 33b 軽鎖アミノ酸配列 (配列番号 36)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVS TAVAWYQQK P
GKAPKLLIYSASF LYS GVP SRFS GSGSGTDF TLT ISSLQP
EDFATYYCQQAYPALHTFGQGT KVEIKRTVAAPS VFIFPP
SDEQLKSGTASVVC LLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDS TYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQG
LSSPVT KSFNRGEC

10

【0115】

ある実施態様において、配列番号 35 は、C 末端で、例えば、K451、又は G450 及び K451 が含まれていないが、1 つ又は 2 つのアミノ酸がトランケートされる (例えば、配列番号 35 のアミノ酸 1 ~ 449 又は配列番号 35 のアミノ酸 1 ~ 450 を含む重鎖)。ある実施態様において、配列番号 35 における P449 はアミド化されている

【0116】

ある実施態様において、機能性エピトープは、コンビナトリアルアラニンスキャンニングによってマッピングすることができる。このプロセスにおいて、コンビナトリアルアラニンスキャンニング戦略は、抗 PCSK9 抗体との相互作用のために必要である PCSK9 タンパク質中のアミノ酸を同定するために用いることができる。ある実施態様において、エ

ピトープは立体構造をとり、PCSK9 に結合した抗 PCSK9 抗体の Fab 断片の結晶構造がそのエピトープを同定するために用いられ得る。一態様において、本発明は、本明細書に与えられた抗 PCSK9 抗体と同一エピトープに結合する抗体を提供する。例えば、ある実施態様において、配列番号 15 の VH 配列及び配列番号 19 の VL 配列を含む抗 PCSK9 抗体と同じエピトープに結合する抗体が提供される。ある実施態様において、配列番号 27 の VH 配列及び配列番号 19 の VL 配列を含む抗 PCSK9 抗体と同じエピトープに結合する抗体が提供される。ある実施態様において、配列番号 27 の VH 配列及び配列番号 20 の VL 配列を含む抗 PCSK9 抗体と同じエピトープに結合する抗体が提供される。ある実施態様において、配列番号 16 の VH 配列及び配列番号 21 の VL 配列を含む抗 PCSK9 抗体と同じエピトープに結合する抗体が提供される。ある実施態様において、配列番号 43 の VH 配列及び配列番号 21 の VL 配列を含む抗 PCSK9 抗体と同じエピトープに結合する抗体が提供される。ある実施態様において、配列番号 17 の VH 配列及び配列番号 22 の VL 配列を含む抗 PCSK9 抗体と同じエピトープに結合する抗体が提供される。ある実施態様において、配列番号 27 の VH 配列及び配列番号 23 の VL 配列を含む抗 PCSK9 抗体と同じエピトープに結合する抗体が提供される。ある実施態様において、配列番号 17 の VH 配列及び配列番号 34 の VL 配列を含む抗 PCSK9 抗体と同じエピトープに結合する抗体が提供される。

20

30

【0117】

一態様において、本発明は、本明細書に記載される抗体のいずれか一と競合的にヒト PCSK9 に結合する抗 PCSK9 抗体、又はその抗原結合断片を提供する。ある実施態様

において、競合的結合が ELISA アッセイを用いて決定され得る。例えば、ある実施態様において、配列番号 15 の VH 配列及び配列番号 19 の VL 配列を含む抗 PCSK9 抗体と競合的に PCSK9 に結合する抗体が提供される。ある実施態様において、配列番号 27 の VH 配列及び配列番号 19 の VL 配列を含む抗 PCSK9 抗体と競合的に PCSK9 に結合する抗体が提供される。ある実施態様において、配列番号 27 の VH 配列及び配列番号 20 の VL 配列を含む抗 PCSK9 抗体と競合的に PCSK9 に結合する抗体が提供される。ある実施態様において、配列番号 16 の VH 配列及び配列番号 21 の VL 配列を含む抗 PCSK9 抗体と競合的に PCSK9 に結合する抗体が提供される。ある実施態様において、配列番号 43 の VH 配列及び配列番号 21 の VL 配列を含む抗 PCSK9 抗体と競合的に PCSK9 に結合する抗体が提供される。ある実施態様において、配列番号

40

50

17のVH配列及び配列番号22のVL配列を含む抗PCSK9抗体と競合的にPCSK9に結合する抗体が提供される。ある実施態様において、配列番号27のVH配列及び配列番号23のVL配列を含む抗PCSK9抗体と競合的にPCSK9に結合する抗体が提供される。ある実施態様において、配列番号17のVH配列及び配列番号34のVL配列を含む抗PCSK9抗体と競合的にPCSK9に結合する抗体が提供される。

【0118】

ある実施態様において、本明細書に記載されるPCSK9の断片内のエピトープへ結合する抗体が提供される。ある実施態様において、配列番号24のヒトPCSK9アミノ酸配列のアミノ酸376から379を含む、PCSK9の断片内のエピトープに結合する抗体が提供される。ある実施態様において、この発明による抗体の機能的及び／又は構造的エピトープはヒトPCSK9の残基D238を含む。ある実施態様において、この発明による抗体の機能的及び／又は構造的エピトープはヒトPCSK9の残基A239を含む。ある実施態様において、この発明による抗体の機能的及び／又は構造的エピトープはヒトPCSK9の残基D238及びA239を含む。ある実施態様において、この発明による抗体の機能的及び／又は構造的エピトープはヒトPCSK9の残基E366を含む。ある実施態様において、この発明による抗体の機能的及び／又は構造的エピトープはヒトPCSK9の残基D367を含む。ある実施態様において、この発明による抗体の機能的及び／又は構造的エピトープはヒトPCSK9の残基E366及びD367を含む。ある実施態様において、この発明による抗体の機能的及び／又は構造的エピトープはヒトPCSK9の残基H391を含む。ある実施態様において、この発明による抗体の機能的及び／又は構造的エピトープはヒトPCSK9の残基E366、D367及びH391を含む。ある実施態様において、この発明による抗体の機能的及び／又は構造的エピトープはヒトPCSK9の残基A239及びH391を含む。ある実施態様において、機能的及び／又は構造的エピトープはヒトPCSK9の残基A239、A341、E366、D367及びH391の1つ又は複数を含む。ある実施態様において、機能的及び／又は構造的エピトープはヒトPCSK9のA239、A341、E366、D367及びH391の近傍残基の1つ又は複数を含む。ある実施態様において、この発明による抗体の機能的及び／又は構造的エピトープは、ヒトPCSK9の(i) R194及びE195からなる群から選択される少なくとも一の残基、(ii) D238及びA239から選択される少なくとも一の残基、(iii) A341及びQ342から選択される少なくとも一の残基、及び(iv) E366、D367、I369、S376、T377、C378、F379、S381及びH391から選択される少なくとも一の残基を含む。ある実施態様において、機能的及び／又は構造的エピトープは、以下の残基：ヒトPCSK9のR194、E195、D238、A239、A341、Q342、E366、D367、I369、S376、T377、C378、F379、S381及びH391の一、二、三、四、五、六、七、八、九、十、十一、十二、十三、十四、又は全てを含む。

【0119】

本発明の更なる態様では、上記実施態様のいずれかに記載の抗PCSK9抗体は、キメラ、ヒト化又はヒト抗体を含むモノクローナル抗体である。一実施態様において、抗PCSK9抗体は、抗体フラグメント、例えば、Fv、Fab、Fab'、scFv、ダイアボディ、又はF(ab')₂断片である。その他の態様において、抗体は、全長抗体、例えば、インタクトなIgG₁抗体、又は本明細書において定義された他の抗体クラス又はアイソタイプである。

【0120】

更なる態様にて、以下のセクション1-7で説明されるように、上記実施態様のいずれかに記載の抗PCSK9抗体は、単独または組み合わせで、任意の特徴を組み込むことができる：

【0121】

1. 抗体親和性

所定の実施態様において、本明細書において与えられる抗体は、解離定数(K_d)が、

$\leq 1 \mu\text{M}$ 、 $\leq 100 \text{ nM}$ 、 $\leq 10 \text{ nM}$ 、 $\leq 1 \text{ nM}$ 、 $\leq 0.1 \text{ nM}$ 、 $\leq 0.01 \text{ nM}$ 、又は
 $\leq 0.001 \text{ nM}$ （例えば、 10^{-8} M 未満、例えば、 10^{-8} M から 10^{-13} M
 、例えば、 10^{-9} M から 10^{-13} M ）である。

【0122】

一実施態様において、以下のアッセイにより説明されるように、 K_d は、目的の抗体の
 Fab型とその抗原を用いて実施される放射標識抗原結合アッセイ（RIA）により測定
 される。非標識抗原の力価測定系の存在下で、最小濃度の（ ^{125}I ）一標識抗原にてF
 abを均衡化して、抗Fab抗体コートプレートと結合した抗原を捕獲することによって
 抗原に対するFabの溶液結合親和性を測定する（例としてChen, et al., J. Mol. Biol.
 293:865-881(1999)を参照）。アッセイの条件を決めるために、MICROTITER（
 登録商標）マルチウェルプレート（Thermo Scientific）を $5 \mu\text{g}/\text{ml}$
 の捕獲抗Fab抗体（Cappel Labs）を含む 50 mM 炭酸ナトリウム（ pH
 9.6）にて一晩コートして、その後2%（w/v）のウシ血清アルブミンを含むPBS
 にて室温（およそ 23°C ）で2～5時間、ブロックする。非吸着プレート（Nunc #
 269620）に、 100 pM 又は 26 pM の ^{125}I 抗原を段階希釈した所望のF
 abと混合する（例えば、Presta等,(1997) Cancer Res. 57: 4593-4599の抗VEGF抗
 体、Fab-12の評価と一致する）。ついで目的のFabを一晩インキュベートする；
 しかし、インキュベーションは平衡状態に達したことを確認するまでに長時間（例えばお
 よそ65時間）かかるかもしれない。その後、混合物を捕獲プレートに移し、室温で（例
 えば1時間）インキュベートする。そして、溶液を取り除き、プレートを0.1%のポリ
 ソルベート20（TWEEN-20（登録商標））を含むPBSにて8回洗浄する。プレ
 ートが乾燥したら、 $150 \mu\text{l}/\text{ウェル}$ の閃光物質（MICROSCINT-20TM；
 Packard）を加え、プレートをTOPCOUNTTMγ計測器（Packard
 ）にて10分間計測する。最大結合の20%か又はそれ以下濃度のFabを選択してそれ
 ぞれ競合結合測定に用いる。

【0123】

他の実施態様によると、～10反応単位（RU）の固定した抗原CM5チップを用いて
 25°C のBIACORE（登録商標）-2000又はBIACORE（登録商標）-30
 00（BIACore, Inc., Piscataway, NJ）を用いる表面プラズモ
 ン共鳴アッセイを使用して K_d を測定する。簡単に言うと、カルボキシメチル化デキスト
 ランバイオセンサーチップ（CM5、BIACORE Inc.）を、提供者の指示書に
 従ってN-エチル-N'-（3-ジメチルアミノプロピル）-カルボジイミド塩酸塩（E
 DC）及びN-ヒドロキシスクシニミド（NHS）で活性化する。抗原を 10 mM 酢酸
 ナトリウム、 pH 4.8で $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ （～ $0.2 \mu\text{M}$ ）に希釈し、結合したタンパク質
 の応答単位（RU）がおよそ10になるように $5 \mu\text{l}/\text{分}$ の流速で注入する。抗原の注入
 後、反応しない群をブロックするために 1 M のエタノールアミンを注入した。動力学的な
 測定のために、Fabの2倍の段階希釈（ 0.78 nM から 500 nM ）を、 25°C で
 、およそ $25 \mu\text{l}/\text{分}$ の流速で0.05%ポリソルベート20（TWEEN-20TM）
 界面活性剤（PBST）を含むPBSに注入する。会合センサーグラム及び解離センサー
 グラムを同時にフィットさせることによる単純一対一ラングミュア結合モデル（simpl
 e one-to-one Langmuir binding model）（BI
 ACORE（登録商標）Evaluationソフトウェアバージョン3.2）を用いて
 、会合速度（kon）と解離速度（koff）を算出した。平衡解離定数（ K_d ）を $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$
 比として算出した。例えば、Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881(199
 9)を参照。上記の表面プラズモン共鳴アッセイによる結合速度が $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ を上
 回る場合、分光計、例えば、流動停止を備えた分光光度計（stop-flow equ
 ipped spectrophotometer）（Aviv Instruments）
 又は攪拌キュベットを備えた8000シリーズ SLM-AMINCOTM分光光度計（
 ThermoSpectronic）で測定される、漸増濃度の抗原の存在下にて、PB
 S（ pH 7.2）、 25°C の、 20 nM の抗抗原抗体（Fab型）の蛍光放出強度（励起

= 295 nm ; 放出 = 340 nm、帯域通過 = 16 nm) における増加又は減少を測定する蛍光消光技術を用いて結合速度を測定することができる。

【0124】

2. 抗体断片

所定の実施態様において、本明細書で提供される抗体は、抗体断片である。抗体断片は、限定されないが、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、Fv、及びscFv断片、及び下記の他の断片を含む。所定の抗体断片の総説については、Hudson et al. Nat. Med. 9:129-134(2003)を参照。scFv断片の総説については、例えば、Pluckthun, in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York), pp. 269-315(1994)を参照；また、国際公開第93/16185号；及び米国特許第5,571,894号及び第5,587,458号も参照。サルベージ受容体結合エピトープ残基を含み、かつインビボ半減期を増加させたFab及びF(ab')₂断片の議論については、米国特許第5869046号を参照のこと。

【0125】

ダイアボディは2価または二重特異性であり得る2つの抗原結合部位を有する抗体断片である。ダイアボディは、例えば、欧州特許第404097号；国際公開第1993/11161号；Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134(2003)；及びHollinger et al., PNAS USA 90: 6444-6448(1993) に更に詳細に記載されている。トリアボディ及びテトラボディもまた Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134(2003)に記載されている。

【0126】

単ドメイン抗体は、抗体の重鎖可変ドメインの全て又は一部、又は軽鎖可変ドメインの全て又は一部を含む抗体断片である。所定の実施態様において、単ドメイン抗体は、ヒト単ドメイン抗体である(Domantis, Inc., Waltham, MA；例えば、米国特許第6,248,516 B1号を参照)。

【0127】

抗体断片は様々な技術で作成することができ、限定されないが、本明細書に記載するように、インタクトな抗体の分解、並びに組換え宿主細胞(例えば、大腸菌やファージ)による生産を含む。

【0128】

3. キメラ及びヒト化抗体

ある実施態様において、本明細書で提供される抗体は、キメラ抗体である。所定のキメラ抗体は、例えば、米国特許第4,816,567号、及びMorrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855(1984)に記載されている。一例において、キメラ抗体は、非ヒト可変領域(例えば、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、又はサル等の非ヒト霊長類由来の可変領域)及びヒト定常領域を含む。更なる例において、キメラ抗体は、クラスまたはサブクラスが親抗体のものから変更された「クラススイッチ」抗体である。キメラ抗体は、その抗原結合断片を含む。

【0129】

所定の実施態様において、キメラ抗体は、ヒト化抗体である。典型的には、非ヒト抗体は、ヒトに対する免疫原性を低減するために、親の非ヒト抗体の特異性と親和性を保持したまま、ヒト化されている。一般に、ヒト化抗体は、HVR、例えば、CDR(またはその一部)が、非ヒト抗体から由来し、FR(またはその一部)がヒト抗体配列に由来する、1つ又は複数の可変ドメインを含む。ヒト化抗体はまた、任意で、ヒト定常領域の少なくとも一部をも含む。所定の実施態様において、ヒト化抗体の幾つかのFR残基は、抗体特異性又は親和性を回復又は改善するめに、非ヒト抗体(例えば、HVR残基が由来する抗体)由来の対応する残基で置換されている。

【0130】

ヒト化抗体及びそれらの製造方法は、例えば、Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633(2008)に総説され、更に、Riechmann et al., Nature 332:323-329(1988)；

Queen et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86:10029-10033(1989); 米国特許第 5, 821, 337、7, 527, 791、6, 982, 321, 及び 7, 087, 409; Kashmiri et al., Methods 36:25-34(2005) (S D R (a - C D R) グラフティングを記述); Padlan, Mol. Immunol. 28:489-498(1991) (「リサーフェシング」を記述); Dall'Acqua et al., Methods 36:43-60(2005) (「F R シャッフリング」を記述); 及び Osbourn et al., Methods 36:61-68(2005) 及び Klimka et al., Br. J. Cancer, 83:252-260(2000) (F R のシャッフリングへの「誘導選択」アプローチを記述) に記載されている。

【0131】

ヒト化に用いられ得るヒトフレームワーク領域は、限定されないが、「ベストフィット」法を用いて選択されるフレームワーク領域 (例えば、Sims et al. J. Immunol. 151:2296(1993)); 軽鎖または重鎖の可変領域の特定のサブグループのヒト抗体のコンセンサス配列由来のフレームワーク領域 (例えば、Carter et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285(1992); 及び Presta et al. J. Immunol., 151:2623(1993)を参照); ヒト成熟 (体細胞変異) フレームワーク領域またはヒト生殖細胞系フレームワーク領域 (例えば、Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633(2008)を参照); 及び F R ライブラリースクリーニング由来のフレームワーク領域 (例えば、Baca et al., J. Biol. Chem. 272:10678-10684(1997) 及び Rosok et al., J. Biol. Chem. 271:22611-22618(1996)を参照) を含む。

【0132】

4. ヒト抗体

所定の実施態様において、本明細書で提供される抗体は、ヒト抗体である。ヒト抗体は、当技術分野で公知の様々な技術を用いて生産することができる。ヒト抗体は一般的に van Dijk and van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol. 5: 368-74(2001) 及び Lonberg, Curr. Opin. Immunol. 20:450-459(2008) に記載されている。

【0133】

ヒト抗体は、抗原チャレンジに応答して、インタクトなヒト抗体又はヒト可変領域を持つ又はインタクトな抗体を産生するように改変されたトランスジェニック動物に、免疫原を投与することにより調製することができる。このような動物は、典型的には、内因性免疫グロブリン遺伝子座を置換するか、又は染色体外に存在するか又は動物の染色体にランダムに組み込まれている、ヒト免疫グロブリン遺伝子座の全てまたは一部を含む。このようなトランスジェニックマウスでは、内因性免疫グロブリン遺伝子座は、一般的に不活性化される。トランスジェニック動物からヒト抗体を得るための方法の総説については、Lonberg, Nat. Biotech. 23:1117-1125(2005)を参照。また、例えば、XENOMOUSETM 技術を記載している、米国特許第 6, 075, 181 号及び 6, 150, 584 号; HuMa b (登録商標) 技術を記載している米国特許第 5, 770, 429 号; K-MOUSE (登録商標) 技術を記載している米国特許第 7, 041, 870 号及び、Velo c i Mouse (登録商標) 技術を記載している米国特許出願公開第 2007/0061900 号) を参照。このような動物で生成されたインタクトな抗体由来のヒト可変領域は、例えば、異なるヒト定常領域と組み合わせることにより、更に改変される可能性がある。

【0134】

ヒト抗体は、ハイブリドーマベース法によって作成することができる。ヒトモノクローナル抗体の産生のためのヒト骨髓腫及びマウス-ヒトヘテロ細胞株が記載されている。(例えば、Kozbor J. Immunol., 133: 3001(1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63(Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); 及び Boerner et al., J. Immunol., 147: 86(1991)を参照) ヒト B 細胞ハイブリドーマ技術を介して生成されたヒト抗体はまた、Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562(2006) に記載されている。更なる方法は、例えば、米国特許第 7, 189, 826 号 (ハイブリドーマ細胞株からのモノクローナルヒト I g M 抗体の産生を記

載している)及びNi, Xiandai Mianyixue, 26(4):265-268(2006) (ヒト-ヒトハイブリドーマを記載している)に記載されたものを含む。ヒトハイブリドーマ技術(トリオーマ技術)もまた、Vollmers and Brandlein, Histology and Histopathology, 20(3):927-937(2005) 及びVollmers and Brandlein, Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, 27(3):185-91(2005)に記載される。

【0135】

ヒト抗体はまた、ヒト由来のファージディスプレイライブラリーから選択されたFvクローン可変ドメイン配列を単離することによって生成され得る。このような可変ドメイン配列は、次に所望のヒト定常ドメインと組み合わせてもよい。抗体ライブラリーからヒト抗体を選択するための技術が、以下に説明される。

10

【0136】

5. ライブラリー由来の抗体

本発明の抗体は、所望の活性または活性(複数)を有する抗体についてコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングすることによって単離することができる。例えば、様々な方法が、ファージディスプレイライブラリーを生成し、所望の結合特性を有する抗体についてのライブラリーをスクリーニングするために、当該技術分野で知られている。そのような方法は、例えば、Hoogenboom et al. in Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001)に総説され、更に、例えば、McCafferty et al., Nature 348:552-554; Clackson et al., Nature 352: 624-628(1991); Marks et al., J. Mol. Biol. 222: 581-597(1992); Marks and Bradbury, in Methods in Molecular Biology 248:161-175(Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu et al., J. Mol. Biol. 338(2): 299-310(2004); Lee et al., J. Mol. Biol. 340(5): 1073-1093(2004); Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(34): 12467-12472(2004); 及びLee et al., J. Immunol. Methods 284(1-2): 119-132(2004)に記載されている。

20

【0137】

所定のファージディスプレイ法において、VH及びVL遺伝子のレパートリーがポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により個別にクローニングされ、ファージライブラリーにランダムに再結合され、その後、Winter et al., Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455(1994)に記載されるように、抗原結合ファージについてスクリーニングすることができる。ファージは、通常、抗体断片を、単鎖Fv(scFv)断片、またはFab断片のいずれかとして提示する。免疫された起源からのライブラリーは、ハイブリドーマを構築する必要性を伴うことなく免疫原に高親和性抗体を提供する。代わりに、Griffiths et al., EMBO J, 12: 725-734(1993)に記載されるように、ナイーブなレパートリーが、任意の免疫感作無しで、広範囲の非自己抗原及び自己抗原に対して、抗体の単一起源を提供するために、(例えば、ヒトから)クローン化することができる。最後に、ナイーブなライブラリーはまた、Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388(1992)に記載されるように、非常に可変なCDR3領域をコードし、インビトロで再構成を達成するために、幹細胞由来の未転位V遺伝子セグメントをクローニングし、ランダム配列を含むPCRプライマーを使用することにより合成することができる。ヒト抗体ファージライブラリーを記述する特許公報は、例えば、米国特許第5,750,373号、及び米国特許出願公開第2005/0079574号、2005/0119455号、2005/0266000号、2007/0117126号、2007/0160598号、2007/0237764号、2007/0292936号及び2009/0002360を含む。

30

40

【0138】

ヒト抗体ライブラリーから単離された抗体又は抗体断片は、本明細書でヒト抗体又はヒト抗体の断片とみなされる。

【0139】

6. 多重特異性抗体

所定の実施態様において、本明細書で提供される抗体は、多重特異性抗体、例えば二重特異性抗体である。多重特異性抗体は、少なくとも二つの異なる部位に対して結合特異性

50

を有するモノクローナル抗体である。ある実施態様において、結合特異性の一つはPCSK9に対してであり、他は、任意の他の抗原に対してである。ある実施態様において、二重特異性抗体は、PCSK9の2つの異なるエピトープに結合することができる。二重特異性抗体はまたPCSK9を発現する細胞に対して細胞傷害性薬物を局在化させるために用いることができる。二重特異性抗体は、全長抗体又は抗体断片として調製することができる。

【0140】

多重特異性抗体を作製するための技術は、限定されないが、異なる特異性を有する2つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖対の組換え共発現(Milstein and Cuello, Nature 305: 537(1983))、国際公開第93/08829号、及びTraunecker et al., EMBO J. 10: 3655(1991)を参照)及び“knob-in-hole”エンジニアリング(例えば、米国特許第 5, 731, 168号を参照)を含む。多重特異抗体はまた、抗体のFcヘテロ2量体分子を作成するための静電ステアリング効果を操作すること(国際公開第2009/089004A1号)、2つ以上の抗体又は断片を架橋すること(例えば米国特許第4, 676, 980号、及びBrennan et al., Science, 229: 81(1985)を参照)、二重特異性抗体を生成するためにロイシンジッパーを使用すること(例えば、Kostelny et al., J. Immunol., 148(5):1547-1553(1992)を参照)、二重特異性抗体フラグメントを作製するため、「ダイアボディ」技術を使用すること(例えば、Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448(1993)を参照)、単鎖Fv(sFv)ダイマーを使用すること(例えば、Gruber et al., J. Immunol., 152:5368(1994)を参照)、及び、例えばTutt et al. J. Immunol. 147: 60(1991)に記載されているように、三重特異性抗体を調製することによって作成することができる。

【0141】

「オクトパス抗体」を含む、3つ以上の機能性抗原結合部位を持つ改変抗体もまた本明細書に含まれる(例えば、米国特許出願公開第2006/0025576A1号を参照)。

【0142】

本明細書中の抗体又は断片はまた、PCSK9並びにその他の異なる抗原(例えば米国特許出願公開第2008/0069820号参照)に結合する抗原結合部位を含む、「2重作用(Dual Acting)FAb」又は「DAF」を含む。

【0143】

7. 抗体変異体

所定の実施態様において、本明細書で提供される抗体のアミノ酸配列変異体が企図される。例えば、抗体の結合親和性及び/又は他の生物学的特性を改善することが望まれ得る。抗体のアミノ酸配列変異体は、抗体をコードするヌクレオチド配列に適切な改変を導入することにより、又はペプチド合成によって調製することができる。このような改変は、例えば、抗体のアミノ酸配列内における、残基の欠失、及び/又は挿入及び/又は置換を含む。最終コンストラクトが所望の特性、例えば、抗原結合を有していることを条件として、欠失、挿入、及び置換の任意の組み合わせが、最終構築物に到達させるために作成され得る。

【0144】

a) 置換、挿入、及び欠失変異体

所定の実施態様において、1つ又は複数のアミノ酸置換を有する抗体変異体が提供される。置換突然変異の対象となる部位は、HVRとFRを含む。保存的置換は、表1の「保存的置換」の見出しの下に示されている。より実質的な変更が、表1の「例示的置換」の見出しの下に与えられ、アミノ酸側鎖のクラスを参照して以下に更に説明される。アミノ酸置換は、目的の抗体に導入することができ、その産物は、所望の活性、例えば、抗原結合の保持/改善、免疫原性の減少、又はADCC又はCDCの改善についてスクリーニングされた。

表A

10

20

30

40

50

元の 残基	例示的 置換	好ましい 置換
A l a (A)	V a l ; L e u ; I l e	V a l
A r g (R)	L y s ; G l n ; A s n	L y s
A s n (N)	G l n ; H i s ; A s p , L y s ; A r g	G l n
A s p (D)	G l u ; A s n	G l u
C y s (C)	S e r ; A l a	S e r
G l n (Q)	A s n ; G l u	A s n
G l u (E)	A s p ; G l n	A s p
G l y (G)	A l a	A l a
H i s (H)	A s n ; G l n ; L y s ; A r g	A r g
I l e (I)	L e u ; V a l ; M e t ; A l a ; P h e ; ノルロイシン	L e u
L e u (L)	ノルロイシン ; I l e ; V a l ; M e t ; A l a ; P h e	I l e
L y s (K)	A r g ; G l n ; A s n	A r g
M e t (M)	L e u ; P h e ; I l e	L e u
P h e (F)	T r p ; L e u ; V a l ; I l e ; A l a ; T y r	T y r
P r o (P)	A l a	A l a
S e r (S)	T h r	T h r
T h r (T)	V a l ; S e r	S e r
T r p (W)	T y r ; P h e	T y r
T y r (Y)	T r p ; P h e ; T h r ; S e r	P h e
V a l (V)	I l e ; L e u ; M e t ; P h e ; A l a ; ノルロイシン	L e u

10

20

30

【0145】

アミノ酸は共通の側鎖特性に基づいてグループに分けることができる：

40

(1) 疎水性：ノルロイシン、M e t、A l a、V a l、L e u、I l e；

(2) 中性の親水性：C y s、S e r、T h r、A s n、G l n；

(3) 酸性：A s p、G l u；

(4) 塩基性：H i s、L y s、A r g；

(5) 鎖配向に影響する残基：G l y、P r o；

(6) 芳香族：T r p、T y r、P h e.

【0146】

非保存的置換は、これらの分類の一つのメンバーを他の分類に交換することを必要とするであろう。

【0147】

50

置換変異体の一つのタイプは、親抗体（例えば、ヒト化又はヒト抗体など）の1つ又は複数の高頻度可変領域残基の置換を含む。一般的には、さらなる研究のために選択され得られた変異体は、親抗体と比較して、特定の生物学的特性の改変（例えば、改善）（例えば、親和性の増加、免疫原性を減少）を有し、及び／又は親抗体の特定の生物学的特性を実質的に保持しているであろう。典型的な置換変異体は、親和性成熟抗体であり、例えば、本明細書に記載されるファージディスプレイベースの親和性成熟技術を用いて、簡便に生成され得る。簡潔に言えば、1つ又は複数のHVR残基が変異し、変異体抗体は、ファージ上に表示され、特定の生物学的活性（例えば、結合親和性）についてスクリーニングされる。

【0148】

変更（例えば、置換）は、例えば抗体の親和性を向上させるために、HVRで行うことができる。このような変更は、HVRの「ホットスポット」、すなわち、体細胞成熟過程中に高頻度で変異を受けるコドンにコードされた残基で（例えばChowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196(2008)を参照）、及び／又はSDR(a-CDR)で行うことができ、得られた変異体VH又はVLが結合親和性について試験される。二次ライブラリーから構築し選択し直すことによる親和性成熟が、例えばHoogenboomらの*Methods in Molecular Biology* 178:1-37(O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001)に記載されている。親和性成熟の幾つかの実施態様において、多様性が、種々の方法（例えば、変異性PCR、鎖シャッフリング、又はオリゴヌクレオチド指定突然変異誘発）のいずれかにより、成熟のために選択された可変遺伝子中に導入される。次いで、二次ライブラリーが作成される。次いで、ライブラリーは、所望の親和性を持つ抗体変異体を同定するためにスクリーニングされる。多様性を導入するもう一つの方法は、いくつかのHVR残基（例えば、一度に4から6残基）がランダム化されたHVR指向のアプローチを伴う。抗原結合に関与するHVR残基は、例えばアラニンスキャニング突然変異誘発、またはモデリングを用いて、特異的に同定され得る。CDR-H3及びCDR-L3がしばしば標的にされる。

【0149】

所定の実施態様において、置換、挿入、または欠失は、そのような改変が抗原に結合する抗体の能力を実質的に低下させない限りにおいて、1つ又は複数のHVR内で発生する可能性がある。例えば、実質的に結合親和性を低下させない保存的改変（例えば本明細書で与えられる保存的置換）をHVR内で行うことができる。このような改変は、HVR「ホットスポット」又はSDRの外側であってもよい。上記に与えられた変異体VH又はVL配列の所定の実施態様において、各HVRは不変であるか、又はわずか1個、2個または3個のアミノ酸置換が含まれているかのいずれかである。

【0150】

突然変異誘発のために標的とすることができる抗体の残基又は領域を同定するための有用な方法は、Cunningham及びWells(1989) *Science*, 244:1081-1085により説明されるように、「アラニンスキャニング変異誘発」と呼ばれる。この方法では、標的残基の残基またはグループ（例えば、arg、asp、his、lys及びgluなどの荷電残基）が同定され、抗原と抗体との相互作用が影響を受けるかどうかを判断するために、中性または負に荷電したアミノ酸（例えば、アラニンまたはポリアラニン）に置換される。更なる置換が、最初の置換に対する機能的感受性を示すアミノ酸の位置に導入され得る。代わりに、又は更に、抗原抗体複合体の結晶構造が、抗体と抗原との接触点を同定する。そのような接触残基及び隣接残基が、置換の候補として標的とされるか又は排除され得る。変異体はそれらが所望の特性を含むかどうかを決定するためにスクリーニングされ得る。

【0151】

アミノ酸配列挿入は、一残基から百以上の残基を含有するポリペプチド長にわたるアミノ及び／又はカルボキシル末端融合、並びに単一または複数のアミノ酸残基の配列内挿入を含む。末端挿入の例としては、N末端メチオニン残基を有する抗体が含まれる。抗体分子の他の挿入変異体は、酵素に対する抗体のN末端またはC末端への融合（例えばADEPTの場合）、または抗体の血清半減期を増加させるポリペプチドへの融合を含む。

【0152】

b) グリコシル化変異体

所定の実施態様において、本明細書で提供される抗体は抗体がグリコシル化される程度を増加または減少するように改変される。抗体へのグリコシル化部位の付加または欠失は、1つ又は複数のグリコシル化部位が作成または削除されるようにアミノ酸配列を変えることによって簡便に達成することができる。

【0153】

抗体がFc領域を含む場合には、それに付着する糖を変えることができる。哺乳動物細胞によって生成された天然型抗体は、典型的には、Fc領域のCH2ドメインのAsn297にN-結合により一般的に付着した分岐鎖、二分岐オリゴ糖を含んでいる。例えばWrightらのTIBTECH 15:26-32(1997)を参照。オリゴ糖は、様々な炭水化物、例えば、二分岐糖鎖構造の「幹」のGlcNAcに結合した、マンノース、N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)、ガラクトース、シアル酸、並びにフコースを含み得る。幾つかの実施態様において、本発明の抗体におけるオリゴ糖の改変は一定の改善された特性を有する抗体変異型を作成するために行われ得る。

【0154】

一実施態様において、抗体変異体は、Fc領域に（直接または間接的に）付着されたフコースを欠いた糖鎖構造を有して提供される。例えば、このような抗体のフコース量は、1%から80%、1%から65%、5%から65%、または20%から40%であり得る。フコースの量は、例えば、国際公開第2008/077546号に記載されているように、MALDI-TOF質量分析法によって測定されるAsn297に付着しているすべての糖構造の合計（例えば、コンプレックス、ハイブリッド及び高マンノース構造）に対して、Asn297の糖鎖中のフコースの平均量を計算することによって決定される。Asn297は、Fc領域（Fc領域残基のEU番号付け）でおよそ297の位置に位置するアスパラギン残基を指し、しかし、Asn297もまた位置297の上流または下流のおよそ±3アミノ酸に、すなわち抗体の軽微な配列変異に起因して、位置294と300の間に配置され得る。このようなフコシル化変異体はADC機能を改善させた可能性がある。例えば、米国特許出願公開第2003/0157108号（Presta, L.）；米国特許出願公開第2004/0093621号（協和発酵工業株式会社）を参照。

「フコース非修飾」又は「フコース欠損」抗体変異体に関連する出版物の例としては、米国特許出願公開第2003/0157108号、国際公開第2000/61739号、国際公開第2001/29246号、米国特許出願公開第2003/0115614号、米国特許出願公開第2002/0164328号、米国特許出願公開第2004/0093621号、米国特許出願公開第2004/0132140号、米国特許出願公開第2004/0110704号、米国特許出願公開第2004/0110282号、米国特許出願公開第2004/0109865号、国際公開第2003/085119号、国際公開第2003/084570号、国際公開第2005/035586号、国際公開第2005/035778号、国際公開第2005/053742号、国際公開第2002/031140号、Okazaki et al. J. Mol. Biol. 336:1239-1249(2004); Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614(2004)が含まれる。非フコシル化抗体を産生する能力を有する細胞株の例としては、タンパク質フコシル化を欠損しているLecl3 CHO細胞（RipkaらのArch. Biochem. Biophys. 249:533-545(1986)；米国特許出願公開第2003/0157108 A1号, Presta, L.；及び国際公開第2004/056312 A1号, Adamsら、especially at Example 11）、及びノックアウト細胞株、アルファ-1、6-フコシルトランスフェラーゼ遺伝子、FUT8、ノックアウトCHO細胞（例えば、Yamane-OhnukiらのBiotech. Bioeng. 87: 614(2004); Kanda, Y. ら、Biotechnol. Bioeng., 94(4):680-688(2006); 及び国際公開第2003/085107号を参照）を含む。

【0155】

抗体変異体が、例えば、抗体のFc領域に結合した二分岐オリゴ糖がGlcNAcによ

って二分されている二分オリゴ糖とともに更に与えられる。このような抗体変異体はフコシル化を減少させ、及び／又はA D C C機能を改善している可能性がある。そのような抗体変異体の例は、例えば、国際公開第2003/011878号（Jean-Mairetら）；米国特許第6,602,684号（Umanaら）；及び米国特許出願公開第2005/0123546号（Umanaら）に記載されている。Fc領域に結合したオリゴ糖内に少なくとも1つのガラクトース残基を持つ抗体変異体も提供される。このような抗体変異体はC D C機能を改善させた可能性がある。このような抗体変異体は、例えば、国際公開第1997/30087号（Patelら）；国際公開第1998/58964号（Raju, S.）；及び国際公開第1999/22764号（Raju, S.）に記載されている。

10

【0156】

c) Fc領域変異体

所定の実施態様において、1つ又は複数のアミノ酸改変を、本明細書で提供される抗体のFc領域に導入することができ、それによってFc領域変異体を生成する。Fc領域の変異体は、1つ又は複数のアミノ酸位置においてアミノ酸修飾（例えば置換）を含むヒトFc領域の配列（例えば、ヒトIgG1、IgG2、IgG3又はIgG4のFc領域）を含んでもよい。

【0157】

所定の実施態様において、本発明は、インビボにおける抗体の半減期が重要であるが、ある種のエフェクター機能（例えば補体及びA D C Cなど）が不要または有害である用途のための望ましい候補とならしめる、全てではないが一部のエフェクター機能を有する抗体変異体を意図している。インビトロ及び／又はインビボでの細胞毒性アッセイでは、C D C活性及び／又はA D C C活性の減少／枯渇を確認するために行うことができる。例えば、Fc受容体（FcR）結合アッセイは、抗体がFcR結合を欠くが（それゆえ、おそらくA D C C活性を欠く）、FcRn結合能力を保持していることを確認するために行うことができる。A D C Cを媒介する初代細胞、NK細胞は、Fc（RIIIのみ、を発現するが、単球はFc（RI、Fc（RII及びFc（RIIIを発現する。造血細胞におけるFcRの発現は、Ravetch及びKinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492(1991)の464ページの表3に要約されている。目的の分子のA D C C活性を評価するためのインビトロアッセイの非限定的な例は、米国特許第5,500,362号（例えば、Hellstrom, I.らのProc. Nat'l Acad. Sci. USA 83:7059-7063(1986)を参照）及びHellstrom, Iら、Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82:1499-1502(1985); 5,821,337(Bruggemann, M.ら、J. Exp. Med. 166:1351-1361(1987)を参照）に説明される。あるいは、非放射性アッセイ法を用いることができる（例えば、フローサイトメトリー用のA C T I^{T M}非放射性細胞傷害性アッセイ（Cell Technology, Inc. Mountain View, CA；及びCytotox 96（登録商標）非放射性細胞毒性アッセイ（Promega, Madison, WI）を参照。このようなアッセイに有用なエフェクター細胞には、末梢血単核細胞（PBMC）及びナチュラルキラー（NK）細胞が含まれる。代わりに、又は更に、目的の分子のA D C C活性は、Clynesら、PNAS USA 95:652-656（1998）に開示されるように、インビボで、例えば動物モデルにおいて評価することができる。C1q結合アッセイはまた、抗体が体C1qを結合することができないこと、したがって、C D C活性を欠いていることを確認するために行うことができる。例えば、国際公開第2006/029879号及び国際公開第2005/100402号のC1q及びC3c結合ELISAを参照。補体活性化を評価するために、C D Cアッセイを行うことができる（例えば、Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163(1996); Cragg, M.S.ら、Blood 101:1045-1052(2003);並びにCragg, M.S.及びM.J. Glennie, Blood 103:2738-2743(2004)を参照）。FcRn結合、及びインビボでのクリアランス／半減期の測定もまた、当該分野で公知の方法を用いて行うことができる（例えば、Petkova, S.B.ら、Int'l. Immunol. 18(12):1759-1769(2006)を参照）。

20

30

40

【0158】

50

エフェクター機能が減少した抗体は、F c 領域の残基 238、265、269、270、297、327、329 の1つ又は複数の置換を有するものが含まれる（米国特許第 6737056 号）。そのような F c 変異体は、残基 265 及び 297 のアラニンへの置換を有する、いわゆる、「DANA」F c 変異体を含む、アミノ酸位置 265、269、270、297 及び 327 の2以上での置換を有する F c 変異体を含む（米国特許第 7, 332, 581 号）。

【0159】

F c R への改善又は減少させた結合を持つ特定の抗体変異体が記載されている。（例えば、米国特許第 6, 737, 056 号；国際公開第 2004/056312 号、及び Shields ら、J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604(2001)を参照）。

10

【0160】

所定の実施態様において、抗体変異体は A D C C を改善する1つ又は複数のアミノ酸置換、例えば、F c 領域の位置 298、333、及び／又は 334 における置換（E U の残基番号付け）を含む。

【0161】

幾つかの実施態様において、改変された（すなわち改善されたか減少した）C1q 結合及び／又は補体依存性細胞傷害（CDC）を生じる、F c 領域における改変がなされ、例えば、米国特許第 6, 194, 551 号、国際公開第 99/51642 号、及び Idusogiera らの J. Immunol. 164: 4178-4184(2000)に説明される。

【0162】

増加した半減期を持ち、胎仔への母性 I g G の移送を担う、新生児 F c 受容体（F c R n）への結合が改善された抗体（Guyer ら、J. Immunol. 117:587(1976) 及び Kim ら、J. Immunol. 24:249(1994)）が、米国特許出願公開第 2005/0014934 A1 号（Hinton ら）に記載されている。これらの抗体は、F c R n への F c 領域の結合を改善する1つ又は複数の置換を有する F c 領域を含む。このような F c 変異体は、F c 領域の残基：238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424 又は 434 の1つ又は複数の置換、例えば、F c 領域の残基 434 の置換を有するものが含まれる（米国特許第 7, 371, 826 号）。

20

【0163】

Duncan & Winter, Nature 322:738-40(1988)；米国特許第 5, 648, 260 号；米国特許第 5, 624, 821 号；及び、F c 領域の変異体の他の例に関しては国際公開第 94/29351 号も参照のこと。

30

【0164】

d) システイン操作抗体変異体

所定の実施態様において、抗体の1つ又は複数の残基がシステイン残基で置換されている、システイン改変抗体、例えば、「thioMAbs」を作成することが望まれ得る。特定の実施態様において、置換された残基は、抗体のアクセス可能な部位で起きる。それらの残基をシステインで置換することにより、反応性チオール基は、それによって抗体のアクセス可能な部位に配置され、本明細書中でさらに記載されるように、イムノコンジュゲートを作成するために、例えば薬物部分またはリンカー薬剤部分などの他の部分に抗体をコンジュゲートするために使用することができる。所定の実施態様において、1つ又は複数の以下の残基がシステインで置換され得る：軽鎖の V205（Kabatt の番号付け）；重鎖の A118（EU 番号付け）；及び重鎖 F c 領域の S400（EU 番号付け）。システイン改変抗体は、例えば、米国特許第 7521541 号に記載のように生成され得る。

40

【0165】

e) 抗体誘導体

所定の実施態様において、本明細書で提供される抗体は、当技術分野で知られ、容易に入手されている追加の非タンパク質部分を含むように更に改変することができる。抗体の

50

誘導体化に適した部分としては、限定されないが、水溶性ポリマーを含む。水溶性ポリマーの非限定的な例は、限定されないが、ポリエチレングリコール（PEG）、エチレングリコール／プロピレングリコールの共重合体、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリ－1，3－ジオキソラン、ポリ－1，3，6－トリオキソラン、エチレン／無水マレイン酸共重合体、ポリアミノ酸（単独重合体又はランダム共重合体のいずれか）及びデキストラン又はポリ（*n*－ビニルピロリドン）ポリエチレングリコール、プロピレングリコール単独重合体、プロピレンオキシド／エチレンオキシド共重合体、ポリオキシエチル化ポリオール（例えばグリセロール）、ポリビニルアルコール及びこれらの混合物を包含する。ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドはその水中での安定性のために製造上の利点を有し得る。ポリマーはいずれかの分子量のものであってよく、そして分枝鎖又は未分枝鎖であってよい。抗体に結合するポリマーの数は変動してよく、そして、1を超える重合体が結合する場合は、それらは同じか又は異なる分子であることができる。一般的に、誘導体化に使用するポリマーの数及び／又は種類は、限定されないが、向上させるべき抗体の特定の特性又は機能、抗体誘導体が特定の条件下で治療に使用されるのか等を考慮しながら決定することができる。

10

【0166】

その他の実施態様において、放射線への曝露によって選択的に加熱されてもよい抗体と非タンパク質部分とのコンジュゲートが、提供される。一実施態様において、非タンパク質部分はカーボンナノチューブである（Kam et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 11600-11605(2005)）。放射線は、任意の波長であって良いが、限定されないものの、通常

20

の細胞に害を与えないが、抗体－非タンパク質部分の近位細胞が死滅される温度に非タンパク質部分を加熱する波長が含まれる。

【0167】

B. 組換え方法及び組成物

本明細書に記載される抗PCSK9抗体は、例えば米国特許第4,816,567号で説明したように、組換えの方法及び組成物を用いて製造することができる。一実施態様において、本明細書に記載される抗PCSK9抗体をコードする単離された核酸が提供される。このような核酸は、抗体のVLを含むアミノ酸配列、及び／又は抗体のVHを含むアミノ酸配列（例えば、抗体の軽鎖及び／又は重鎖）をコードし得る。ある実施態様において、抗PCSK9重鎖可変領域をコードする単離された核酸が提供され、その核酸は、配列番号38又は配列番号39の核酸配列に対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する配列を含む。ある実施態様において、抗PCSK9ある実施態様において、抗PCSK9重鎖可変領域をコードする単離された核酸が提供され、核酸は、配列番号38又は39を含む。可変領域をコードする単離された核酸が提供され、その核酸は、配列番号40又は配列番号41の核酸配列に対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する配列を含む。ある実施態様において、抗PCSK9重鎖可変領域及び抗PCSK9軽鎖可変領域をコードする単離された核酸が提供され、重鎖可変領域をコードする核酸は、配列番号38又は配列番号39の核酸配列に対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する配列を含み、軽鎖可変領域をコードする核酸は、配列番号40又は配列番号41の核酸配列に対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する配列を含む。ある実施態様において、抗PCSK9重鎖可変領域をコードする単離された核酸が提供され、核酸は、配列番号38又は39を含む。ある実施態様において、抗PCSK9軽鎖可変領域をコードする単離された核酸が提供され、核酸は、配列番号40又は41を含む。ある実施態様において、抗PCSK9重鎖可変領域及び軽鎖可変

30

40

50

領域をコードする単離された核酸が提供され、重鎖をコードする核酸は、配列番号 39 を含み、軽鎖をコードする核酸は、配列番号 41 を含む。

抗体 508.20.33b の全長重鎖核酸配列 (配列番号 38)

```

G A A   G T T C A G C T G G   T G G A G T C T G G   C G G T G G C C T G   G T G
C A G C C A G   G G G G C T C A C T   C C G T T T G T C C   T G T G C A G C T T
   C T G G C T T C A C   C T T C T C T A G T   A C T G C T A T T C   A C T G G G
T G C G   T C A G G C C C C G   G G T A A G G G C C   T G G A A T G G G T   T G
C T A G G A T T   T C T C C T G C T A   A C G G T A A T A C   T A A C T A T G C
C   G A T A G C G T C A   A G G G C C G T T T   C A C T A T A A G C   G C A G A
C A C A T   C C A A A A A C A C   A G C C T A C C T A   C A A A T G A A C A   G
C T T A A G A G C   T G A G G A C A C T   G C C G T C T A T T   A T T G T G C T
C G   T T G G A T C G G G   T C C C G G G A G C   T G T A C A T T A T   G G A C
T A C T G G   G G T C A A G G A A   C C C T G G T C A C   C G T C T C C T C G
G C C T C C A C C A   A G G G C C C A T C   G G T C T T C C C C   C T G G C A C
C C T   C C T C C A A G A G   C A C C T C T G G G   G G C A C A G C G G   C C C
T G G G C T G   C C T G G T C A A G   G A C T A C T T C C   C C G A A C C G G T
   G A C G G T G T C G   T G G A A C T C A G   G C G C C C T G A C   C A G C G G
C G T G   C A C A C C T T C C   C G G C T G T C C T   A C A G T C C T C A   G G
A C T C T A C T   C C C T C A G C A G   C G T G G T G A C T   G T G C C C T C T
A   G C A G C T T G G G   C A C C C A G A C C   T A C A T C T G C A   A C G T G
A A T C A   C A A G C C C A G C   A A C A C C A A A G G   T G G A C A A G A A   A
G T T G A G C C C   A A A T C T T G T G   A C A A A A C T C A   C A C A T G C C
C A   C C G T G C C C A G   C A C C T G A A C T   C C T G G G G G G A   C C G T
C A G T C T   T C C T C T T C C C   C C C A A A A C C C   A A G G A C A C C C
T C A T G A T C T C   C C G G A C C C C T   G A G G T C A C A T   G C G T G G T
G G T   G G A C G T G A G C   C A C G A A G A C C   C T G A G G T C A A   G T T
C A A C T G G   T A C G T G G A C G   G C G T G G A G G T   G C A T A A T G C C
   A A G A C A A A G C   C G C G G G A G G A   G C A G T A C A A C   A G C A C G
T A C C   G T G T G G T C A G   C G T C C T C A C C   G T C C T G C A C C   A G
G A C T G G C T   G A A T G G C A A G   G A G T A C A A G T   G C A A G G T C T
C   C A A C A A A G C C   C T C C C A G C C C   C C A T C G A G A A   A A C C A
T C T C C   A A A G C C A A A G   G G C A G C C C C G   A G A A C C A C A G   G
T G T A C A C C C   T G C C C C C A T C   C C G G G A A G A G   A T G A C C A A
G A   A C C A G G T C A G   C C T G A C C T G C   C T G G T C A A A G   G C T T
C T A T C C   C A G C G A C A T C   G C C G T G G A G T   G G G A G A G C A A
T G G G C A G C C G   G A G A A C A A C T   A C A A G A C C A C   G C C T C C C
G T G   C T G G A C T C C G   A C G G C T C C T T   C T T C C T C T A C   A G C
A A G C T C A   C C G T G G A C A A   G A G C A G G T G G   C A G C A G G G G A
   A C G T C T T C T C   A T G C T C C G T G   A T G C A T G A G G   C T C T G C
A C A A   C C A C T A C A C G   C A G A A G A G C C   T C T C C C T G T C   T C
C G G G T A A A

```

抗体 508.20.33b の重鎖可変領域核酸配列 (配列番号 39)

```

G A A   G T T C A G C T G G   T G G A G T C T G G   C G G T G G C C T G   G T G
C A G C C A G   G G G G C T C A C T   C C G T T T G T C C   T G T G C A G C T T
   C T G G C T T C A C   C T T C T C T A G T   A C T G C T A T T C   A C T G G G
T G C G   T C A G G C C C C G   G G T A A G G G C C   T G G A A T G G G T   T G
C T A G G A T T   T C T C C T G C T A   A C G G T A A T A C   T A A C T A T G C
C   G A T A G C G T C A   A G G G C C G T T T   C A C T A T A A G C   G C A G A
C A C A T   C C A A A A A C A C   A G C C T A C C T A   C A A A T G A A C A   G
C T T A A G A G C   T G A G G A C A C T   G C C G T C T A T T   A T T G T G C T

```

CG TTGGATCGGG TCCCGGGAGC TGTACATTAT GGAC
TACTGG GGTCAAGGAA CCTTGGTCAC CGTCTCCTCG

抗体508.20.33bの全長軽鎖核酸配列(配列番号40)

GA TATCCAGATG ACCCAGTCCC CGAGCTCCCT GTCC
GCCTCT GTGGGCGATA GGGTCACCAT CACCTGCCGT
GCCAGTCAAG ATGTGTCCAC TGCTGTAGCC TGGTATC
AAC AGAAACCAGG AAAAGCTCCG AAGCTTCTGA TTT
ACTCGGC ATCCTTCTCT TACTCTGGAG TCCCTTCTCG
CTTCTCTGGT AGCGGTTTCCG GGACGGGATTT CACTCT
GACC ATCAGCAGTC TGCAGCCGGA AGACTTTCGCA AC
TTATTACT GTCAGCAAGC CTATCCGGCC CTACACACG
T TCGGACAGGG TACCAAGGTG GAGATCAAAC GAACT
GTGGC TGCACCATCT GTCTTTCATCT TCCCGCCATC T
GATGAGCAG TTGAAATCTG GAACTGCTTC TGTGTGT
GC CTGCTGAATA ACTTCTATCC CAGAGAGGCC AAAG
TACAGT GGAAGGTGGA TAACGCCCTC CAATCGGGTA
ACTCCCAGGA GAGTGTCAACA GAGCAGGACA GCAAGGA
CAG CACCTACAGC CTCAGCAGCA CCTTGACGCT GAG
CAAAGCA GACTACGAGA AACACAAAGT CTACGCCCTGC
GAAGTCACCC ATCAGGGCCT GAGCTCGCCC GTCACA
AAGA GCTTCAACAG GGGAGAGTGT

10

20

抗体508.20.33bの軽鎖可変領域核酸配列(配列番号41)

GA TATCCAGATG ACCCAGTCCC CGAGCTCCCT GTCC
GCCTCT GTGGGCGATA GGGTCACCAT CACCTGCCGT
GCCAGTCAAG ATGTGTCCAC TGCTGTAGCC TGGTATC
AAC AGAAACCAGG AAAAGCTCCG AAGCTTCTGA TTT
ACTCGGC ATCCTTCTCT TACTCTGGAG TCCCTTCTCG
CTTCTCTGGT AGCGGTTTCCG GGACGGGATTT CACTCT
GACC ATCAGCAGTC TGCAGCCGGA AGACTTTCGCA AC
TTATTACT GTCAGCAAGC CTATCCGGCC CTACACACG
T TCGGACAGGG TACCAAGGTG GAGATCAAAC GA

30

40

【0168】

更なる実施態様において、そのような核酸を含む1つ又は複数のベクター(例えば、発現ベクター)が提供される。更なる実施態様において、そのような核酸を含む宿主細胞が提供される。一実施態様において、宿主細胞は以下を含む(例えば、以下で形質転換される): (1) 抗体のVLを含むアミノ酸配列、及び抗体のVHを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含むベクター、又は(2) 抗体のVLを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第一ベクター、及び抗体のVHを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第二ベクター。一実施態様において、宿主細胞は、真核生物、例えばチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、またはリンパ系細胞(例えば、Y0、NS0、Sp20細胞)である。一実施態様において、抗PCSK9抗体を作る方法が提供され、その方法は、上記のように、抗体の発現に適した条件下で、抗体をコードする核酸を含む宿主細胞を培養することを含み、及び必要に応じて、宿主細胞(または宿主細胞培養培地)から抗体を回収することを含む。

【0169】

抗PCSK9抗体の組換え生産のために、例えば上述したように、抗体をコードする核酸が単離され、宿主細胞内でのさらなるクローニング及び/又は発現のために1つ又は複数のベクターに挿入される。このような核酸は、容易に単離され、従来の手順を用いて(例えば、抗体の重鎖と軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合できるオリゴヌクレオチドプローブを使用することによって)配列決定することができる。

50

【0170】

抗体をコードするベクターのクローニング又は発現に適切な宿主細胞は、本明細書に記載の原核細胞又は真核細胞を含む。例えば、特に、グリコシル化及びFcエフェクター機能が必要ない場合には、抗体は、細菌で産生することができる。細菌における抗体断片及びポリペプチドの発現については、例えば、米国特許第5,648,237号、第5,789,199号及び第5,840,523号を参照。(また、大腸菌における抗体の発現を説明している、Charlton, Methods in Molecular Biology, Vol. 248(B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254も参照。)発現の後、抗体は可溶性画分において細菌の細胞ペーストから単離され得、更に精製することができる。

【0171】

原核生物に加えて、糸状菌又は酵母菌のような真核微生物は、菌類や酵母菌株を含むポリペプチドをコードするベクターのための、適切なクローニング宿主又は発現宿主であり、そのグリコシル化経路が、「ヒト化」されており、部分的または完全なヒトのグリコシル化パターンを有する抗体の生成をもたらす。Gerngross, Nat. Biotech. 22:1409-1414(2004)、及びLiら、Nat. Biotech. 24:210-215(2006)を参照。

【0172】

グリコシル化抗体の発現に適した宿主細胞はまた、多細胞生物(無脊椎動物と脊椎動物)から派生している。無脊椎動物細胞の例としては、植物及び昆虫細胞が挙げられる。多数のバキュロウイルス株が同定され、これらは特にSpodoptera frugiperda細胞のトランスフェクションのために、昆虫細胞と組み合わせて使用することができる。

【0173】

植物細胞培養を宿主として利用することができる。例えば、米国特許第5959177号、第6040498号、第6420548号、第7125978号及び第6417429号(トランスジェニック植物における抗体産生に関するPLANT BODIESTM技術を記載)を参照。

【0174】

脊椎動物細胞もまた宿主として用いることができる。例えば、懸濁液中で増殖するように適合されている哺乳動物細胞株は有用であり得る。有用な哺乳動物宿主細胞株の他の例は、SV40(COS-7)で形質転換されたサル腎臓CV1株、ヒト胚腎臓株(Grahamら、J. Gen Virol. 36:59(1977)に記載された293細胞又は293細胞、ベビーハムスター腎臓細胞(BHK)、マウスのセルトリ細胞(Mather, Biol. Reprod. 23:243-251(1980)に記載されるTM4細胞)、サル腎臓細胞(CV1)、アフリカミドリザル腎臓細胞(VERO-76)、ヒト子宮頸癌細胞(HeLa)、イヌ腎臓細胞(MDCK; バッファローラット肝臓細胞(BRL 3A)、ヒト肺細胞(W138); ヒト肝臓細胞(HePG2)、マウス乳腺腫瘍(MMT060562)、例えばMatherら、Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68(1982)に記載されるTRI細胞、MRC5細胞、及びFS4細胞である。他の有用な哺乳動物宿主細胞株は、DHFRCCHO細胞(Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216(1980))を含むチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、及びY0、NS0及びSp2/0などの骨髓腫細胞株を含む。抗体産生に適した特定の哺乳動物宿主細胞系の総説については、例えば、Yazaki及びWu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248(B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), 頁255-268(2003)を参照。

【0175】

C. アッセイ

本明細書で提供される抗PCSK9抗体は、同定され、当技術分野で公知の様々なアッセイによってその物理的/化学的性質及び/又は生物学的活性についてスクリーニングされ、または特徴づけることができる。

【0176】

1. 結合アッセイとその他のアッセイ

一態様では、本発明の抗PCSK9抗体は、例えば、ELISA、ウェスタンブロット

10

20

30

40

50

法等の既知の方法により、そのPCSK9結合活性について試験される。多数のタイプの競合結合アッセイを、抗PCSK9抗体が、例えば他の、固相の直接的又は間接的ラジオイムノアッセイ(RIA)、固相の直接的又は間接的酵素イムノアッセイ(EIA)、サンドイッチ競合アッセイ(例えばStahliら、1983, *Methods in Enzymology* 9:242-253を参照);固相直接ビオチン-アビジンEIA(例えばKirklandら、1986, *J. Immunol.* 137:3614-3619を参照);固相直接標識アッセイ、固相直接標識サンドイッチアッセイ(例えばHarlow and Lane, 1988, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Pressを参照);固相直接標識RIA(例えば, Morel et al., 1988, *Molec. Immunol.* 25:7-15を参照);固相直接ビオチン-アビジンEIA(例えば, Cheung,ら、1990, *Virology* 176:546-552を参照);及び直接標識RIA(Moldenhauer et al., 1990, *Scand. J. Immunol.* 32:77-82)と競合するかどうかを決定するために使用することができる。典型的には、そのようなアッセイは、固体表面に結合した精製抗原、又は非標識化試験抗原結合タンパク質及び標識化参照抗原結合タンパク質のこれらのいずれかを有する細胞の使用を含む。競合的阻害は、試験抗原結合タンパク質の存在下で、固体表面又は細胞に結合した標識の量を決定することによって測定される。通常、試験抗原結合タンパク質は、過剰に存在する。競合アッセイによって同定された抗原結合タンパク質(競合する抗原結合性タンパク質)は、参照抗原結合タンパク質と同じエピトープ結合する抗原結合タンパク質、及び参照抗原結合タンパク質が結合したエピトープに対して、立体障害が生じるように、十分に近接する隣接エピトープに結合する抗原結合タンパク質を含む。競合的結合を決定するための方法に関する更なる詳細は、本明細書の実施例に提供される。通常は、競合する抗原結合タンパク質が過剰に存在する場合には、共通の抗原に対する参照抗原結合性タンパク質の特異的結合を、少なくとも40-45%、45-50%、50-55%、55-60%、60-65%、65-70%、70-75%又は75%又はそれ以上阻害(例えば低減)する。ある実施態様において、結合は、少なくとも80-85%、85-90%、90-95%、95-97%、又は97%又はそれ以上阻害される。

【0177】

本発明の一態様において、競合アッセイは、抗PCSK9抗体の508.20.04a、508.20.04b、508.20.06、508.20.28a、508.20.28b、508.20.33a、508.20.33b又は508.20.84と、PCSK9に対する結合について競合する抗体を同定するために用いられ得る。ある実施態様において、そのような競合する抗体は抗PCSK9抗体の508.20.04a、508.20.04b、508.20.06、508.20.28a、508.20.28b、508.20.33a、508.20.33b及び/又は508.20.84により結合される同一エピトープ(例えば、線状又は立体構造的エピトープ)に対して結合する。抗体が結合するエピトープをマッピングするための詳細な典型的な方法が、Morris(1996) "Epitope Mapping Protocols," in *Methods in Molecular Biology* vol. 66(Humana Press, Totowa, NJ)に提供されている。

【0178】

典型的な競合アッセイにおいて、固定化PCSK9は、PCSK9に結合する第一の標識された抗体(例えば、抗PCSK9抗体の508.20.04a、508.20.04b、508.20.06、508.20.28a、508.20.28b、508.20.33a、508.20.33b又は508.20.84)、及びPCSK9への結合について第一の抗体と競合する能力について試験された第二の未標識抗体を含む溶液中でインキュベートされる。第二抗体はハイブリドーマ上清中に存在してもよい。コントロールとして、固定化PCSK9が、第二の未標識の抗体でなく、第一の標識された抗体を含む溶液中でインキュベートされる。第一の抗体のPCSK9への結合を許容する条件下でインキュベートした後、過剰の未結合の抗体が除去され、固定化されたPCSK9に結合した標識の量が測定される。もし、固定化PCSK9に結合した標識の量が、コントロールサンプルと比較して試験サンプル中で実質的に減少している場合、それは、第二抗体が、PCSK9への結合に対して、第一の抗体と競合していることを示している。Harlow and

Lane(1988) Antibodies: A Laboratory Manual ch.14(Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)を参照。

【0179】

2. 活性のアッセイ

一態様において、アッセイは、生物学的活性を有するそれらの抗PCSK9抗体を同定するために与えられる。抗PCSK9抗体の生物学的活性は、例えば、PCSK9の1つ又は複数の生物学的活性を遮断する、拮抗する、抑制する、干渉する、調節する及び／又は減少させることを含み得る。インビボ及び／又はインビトロでこのような生物学的活性を有する抗体が提供される。

【0180】

10

ある実施態様において、抗PCSK9抗体は、ヒトPCSK9に結合し、LDLRとの相互作用を防止する。ある実施態様において、抗PCSK9抗体は、ヒトPCSK9に特異的に結合し、及び／又はヒトPCSK9のLDLRに対する結合を少なくとも約20%－40%、40－60%、60－80%、80－85%又はそれ以上（例えば、インビトロでの競合結合アッセイにおいて結合を測定することにより）実質的に阻害する。ある実施態様において、本発明は、PCSK9に特異的に結合し、本明細書に開示されるHepG2細胞におけるLDLRダウンレギュレーションアッセイを用いてインビトロで測定されるとき、LDLRにおけるPCSK9媒介性作用を拮抗する単離された抗PCSK9抗体を提供する。

【0181】

20

D. イムノコンジュゲート

本発明はまた、化学療法剤又は薬物、成長抑制剤、毒素（例えば、タンパク質毒素、細菌、真菌、植物、または動物起源の酵素活性毒素、又はそれらの断片）、又は放射性同位元素など、1つ又は複数の細胞傷害性薬物にコンジュゲートした本明細書中の抗PCSK9抗体を含むイムノコンジュゲートを提供する。

【0182】

一実施態様において、イムノコンジュゲートは、抗体－薬物コンジュゲート（ADC）であって、そこでは抗体は、限定されないが、メイタンシノイド（米国特許第5208020号、第5416064号及び欧州特許EP0 425235 B1を参照）；モノメチルアウリスタチン薬物部分DE及びDF（MMAE及びMMAF）（米国特許第5635483号及び5780588号及び7498298号を参照）などのアウリスタチン；ドラスタチン、カリケアマイシン又はその誘導体（米国特許第5712374号、5714586号、5739116号、5767285号、5770701号、5770710号、5773001号、及び5877296号を参照；Hinmanら、Cancer Res. 53:3336-3342(1993)；及びLodeら、Cancer Res. 58:2925-2928(1998)）；ダウノマイシン又はドキソルビシンなどのアントラサイクリン（Kratzら、Current Med. Chem. 13:477-523(2006)；Jeffreyら、Bioorganic & Med. Chem. Letters 16:358-362(2006)；Torgov et al., Bioconj. Chem. 16:717-721(2005)；Nagyら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:829-834(2000)；Dubowchikら、Bioorg. & Med. Chem. Letters 12:1529-1532(2002)；Kingら、J. Med. Chem. 45:4336-4343(2002)；及び米国特許第6, 630, 579号を参照）；メトトレキサート、ビンデシン；ドセタキセル、パクリタキセル、ラロタキセル、テセタキセル、及びオルタタキセルなどのタキサン；トリコテセン；及びCC1065を含む1つ又は複数の薬物とコンジュゲートしている。

30

40

【0183】

その他の実施態様において、イムノコンジュゲートは、酵素的に活性な毒素又はその断片にコンジュゲートした、本明細書に記載の抗体を含み、限定されないが、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、（緑膿菌からの）外毒素A鎖、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデクシン（modeccin）A鎖、アルファーサルシン、アレウリテス・フォーディ（Aleurites fordii）タンパク質、ジアンチン（dianthin）タンパク質、フィトラカ・アメリカナ（Phytolacca americana

50

na) タンパク質 (P A P I、P A P I I、及び P A P - S)、モモルディカ・チャランチア (momordica charantia) インヒビター、クルシン (curc i n)、クロチン (c r o t i n)、サパオナリア・オフィシナリス (sapaonar i a o f i c i n a l i s) インヒビター、ゲロニン (g e l o n i n)、ミトゲリン (m i t o g e l l i n)、レストリクトシン (r e s t r i c t o c i n)、フェノマイシン (p h e n o m y c i n)、エノマイシン (e n o m y c i n) 及びトリコテセン (t r i c o t h e c e n e) が含まれる。

【0184】

その他の実施態様では、イムノコンジュゲートは、放射性コンジュゲートを形成するために放射性原子にコンジュゲートした本明細書に記載されるような抗体を含む。様々な放射性同位体が放射性コンジュゲートの生産のために入手可能である。例としては、 $A t^{211}$ 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 $R e^{186}$ 、 $R e^{188}$ 、 $S m^{153}$ 、 $B i^{212}$ 、 P^{32} 、 $P b^{212}$ 及び $L u$ の放射性同位体を含む。検出のために放射性複合体を使用するとき、それはシンチグラフィ試験のための放射性原子、例えば $T c^{99m}$ 又は I^{123} 、又は核磁気共鳴 (NMR) 画像化 (磁気共鳴画像化 MRI としても知られている) のためのスピン標識、例えば再びヨウ素-123、ヨウ素-131、インジウム-111、フッ素-19、炭素-13、窒素-15、酸素-17、ガドリニウム、マンガン又は鉄を含んでよい。

【0185】

抗体と細胞障害剤のコンジュゲートは、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えば N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ) プロピオナート (S P D P)、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル) シクロヘキサン-1-カルボキシラート (S M C C)、イミノチオラン (I T)、イミドエステル類の二官能性誘導体 (例えばジメチルアジピミデート H C L)、活性エステル類 (例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル)、アルデヒド類 (例えば、グルタルアルデヒド)、ビスアジド化合物 (例えば、ビス (p-アジドベンゾイル) ヘキサンジアミン)、ビス-ジアゾニウム誘導体 (例えば、ビス- (p-ジアゾニウムベンゾイル) エチレンジアミン)、ジイソシアネート (例えば、トリエン-2, 6-ジイソシアネート)、及び二活性フッ素化合物 (例えば、1, 5-ジフルオロ-2, 4-ジニトロベンゼン) を使用して作製することができる。Vitetta et al., Science 238:1098(1987) に記載されるように、例えば、リシンイムノトキシンを調製することができる。カーボン-14-標識 1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレントリアミン五酢酸 (M X - D T P A) は、放射性ヌクレオチドの抗体への抱合のためのキレート剤の例である。国際公開第 94/11026 号を参照。リンカーは、細胞中に細胞毒性薬物の放出を容易にする「切断可能なリンカー」であり得る。例えば、酸に不安定なリンカー、ペプチダーゼ過敏性リンカー、光解離性リンカー、ジメチルリンカー又はジスルフィド含有リンカー (Chari ら、Cancer Res. 52:127-131(1992); 米国特許第 5, 208, 020 号) が使用され得る。

【0186】

本明細書において、イムノコンジュゲート又は A D C は、限定されないが、市販の (例えば Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, U. S. A からの)、B M P S、E M C S、G M B S、H B V S、L C - S M C C、M B S M P B H、S B A P、S I A、S I A B、S M C C、S M P B、S M P H、スルホ- E M C S、スルホ- G M B S、スルホ- K M U S、スルホ- M B S、スルホ- S I A B、スルホ- S M P B、及びスルホ- S M P B、S V S B (スクシンイミジル (4-ビニルスルホン) ベンゾエート) を含むクロスリンカー試薬を用いて調製されるコンジュゲートを特に熟考する。

【0187】

E. 診断及び検出のための方法及び組成物

ある実施態様において、本明細書で提供される抗 P C S K 9 抗体のいずれかは、生物学的サンプル中の P C S K 9 の存在を検出するのに有用である。本明細書で使用する「検出

」という用語は、定量的または定性的検出を包含する。ある実施態様において、生物学的サンプルは、血液、血清又は生物起源の液体サンプルである。所定の実施態様において、生物学的サンプルは細胞又は組織を含む。

【0188】

一実施態様において、診断又は検出の方法に使用される抗PCSK9抗体が提供される。更なる態様において、生物学的サンプル中のPCSK9の存在を検出する方法が提供される。ある実施態様において、方法は生物学的サンプル中のPCSK9タンパク質の存在を決定することを含む。ある実施態様において、PCSK9はヒトPCSK9である。ある実施態様において、本方法は、抗PCSK9抗体のPCSK9への結合を許容する条件下で、本明細書に記載のように抗PCSK9抗体と生物学的サンプルを接触させること、及び複合体が抗PCSK9抗体とPCSK9との間に形成されているかどうかを検出することを含む。そのような方法は、インビトロ又はインビボ法であり得る。一実施態様において、例えばPCSK9又はLDL-コレステロールが患者の選択のためのバイオマーカーであるときなど、抗PCSK9抗体が抗PCSK9抗体による治療にふさわしい被検体を選択するために使用される。

【0189】

本発明の抗体を用いて診断され得る疾患の例には、（「血清コレステロール関連疾患」を含む）コレステロール関連疾患を含み、例えば、血清総コレステロールの上昇、LDLの上昇、トリグリセリドの上昇、超低密度リポタンパク質（VLDL）の上昇、及び／又はHDLの低下によって明らかにすることができる、高コレステロール血症、心臓病、メタボリックシンドローム、糖尿病、冠動脈心疾患、脳卒中、心血管疾患、アルツハイマー病、及び一般的な脂質代謝異常の任意の1つ又は複数が含まれる。一態様において、本発明は、高コレステロール血症、及び／又は脂質異常症、アテローム性動脈硬化症、心血管疾患（CVD）又は冠状動脈性心臓病の少なくとも1つの症状を治療または予防するための方法を、抗PCSK9抗体の有効量を個体に投与することを含み提供する。ある実施態様において、本発明は、被験体において、高コレステロール血症、及び／又は脂質異常症、アテローム性動脈硬化症、CVD又は冠状動脈性心臓病の少なくとも1つの症状の治療又は予防における使用のための抗PCSK9抗体の有効量を提供する。本発明は、被験体において、高コレステロール血症、及び／又は脂質異常症、アテローム性動脈硬化症、CVD又は冠状動脈性心臓病の少なくとも1つの症状の治療又は予防のための医薬の製造において、細胞外又は循環するPCSK9と拮抗する抗PCSK9抗体の有効量の使用を更に提供する。

ある実施態様において、標識された抗PCSK9抗体が提供される。標識は、限定されるものではないが、（例えば、蛍光標識、発色団標識、高電子密度標識、化学発光標識、放射性標識など）直接検出される標識又は部分、並びに、例えば、酵素反応又は分子間相互作用を介して間接的に検出される酵素又はリガンドのような部分が含まれる。このような標識の例には、ラジオアイソトープ³²P、¹⁴C、¹²⁵I、³H、及び¹³¹I、フルオロフォア、例えば希土類キレート又はフルオレセイン及びその誘導体、ローダミン及びその誘導体、ダンシル、ウンベリフェロン、ルシェフェラーゼ、例えばホタルルシェフェラーゼ及び細菌ルシェフェラーゼ（米国特許第4737456号）、ルシェフェリン、2, 3-ジヒドロフタルジネジオン、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）、アルカリフォスファターゼ、β-ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、糖オキシダーゼ、例えばグルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、及びグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘテロサイクリックオキシダーゼ、例えばウリカーゼ及びキサンチンオキシダーゼ、色素前駆体、例えばHRP、ラクトペルオキシダーゼ、又はマイクロペルオキシダーゼ、ビオチン／アビジン、スピンラベル、バクテリオファージラベル、安定な遊離ラジカルなどを酸化する過酸化水素を利用する酵素とカップリングさせたもの、などが含まれる。

【0190】

F. 薬学的処方物

本発明はまた、抗 P C S K 9 抗体、及び抗 P C S K 9 抗体をコードする配列を含んでなるポリヌクレオチドを含む薬学的製剤を含む組成物を包含する。ある実施態様において、組成物は、P C S K 9 に結合する1つ又は複数の抗体、及び／又は P C S K 9 に結合する1つ又は複数の抗体をコードする配列を含む1つ又は複数のポリヌクレオチドを含む。これらの組成物は、適切な担体、例えば、当技術分野で周知である、緩衝液を含む薬学的に許容される賦形剤などを更に含み得る。

【0191】

本明細書に記載の抗 P C S K 9 抗体の薬学的製剤は、所望の程度の純度を有するその抗体と任意の薬学的に許容される担体(Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed.: Williams and Wilkins PA, USA(1980))とを、凍結乾燥製剤または水性溶液の形態で混合することによって調製される。薬学的に許容される担体は、使用される投薬量及び濃度でレシピエントに毒性でなく、そしてこれには、限定しないが、リン酸塩、クエン酸塩及び他の有機酸のような緩衝液；アスコルビン酸及びメチオニンを含む抗酸化剤；防腐剤（例えば、オクタデシルジメチオルベンジルアンモニウムクロライド；ヘキサメトニウムクロライド；塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、フェノール、ブチルまたはベンジルアルコール；アルキルパラベン、例えば、メチルまたはプロピルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；及びm-クレゾール）；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；タンパク質、例えば、血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリン；親水性ポリマー、例えば、ポリビニルピロリドン；アミノ酸、例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニンまたはリジン；マンノサッカライド、ジサッカライド、及びグルコース、マンノースまたはデキストリンを含む他の炭水化物；キレート剤、例えば、EDTA；糖、例えば、スクロース、マンニトール、トレハロースまたはソルビトール；塩形成対イオン、例えば、ナトリウム、金属錯体（例えば、Zn-タンパク質錯体）；及び／又はポリエチレングリコール（PEG）等の非イオン性界面活性剤が挙げられる。本明細書における典型的な薬学的に許容される担体は、介在性薬物分散剤、例えば、水溶性の中性活性ヒアルロニダーゼ糖タンパク質（sHASEGP）、例えば、rHuPH20（HYLENEX（登録商標））、Baxter International, Inc.）などのヒト可溶性PH-20ヒアルロニダーゼ糖タンパク質を更に含む。所定の典型的なsHASEGP及び使用法は、rHuPH20を含み、米国特許出願公開第2005/0260186号及び第2006/0104968に開示されている。一態様において、sHASEGPは、コンドロイチナーゼなどの1つ又は複数の追加のグルコサミノグリカンと組み合わせられる。

【0192】

典型的な凍結乾燥抗体製剤は、米国特許第6267958号に記載されている。水性の抗体製剤は、米国特許第6171586号及び国際公開第2006/044908号に記載されているものが含まれ、後者の製剤はヒスチジン-酢酸緩衝液を含む。

【0193】

本明細書の製剤はまた、治療を受けている特定の徴候のために必要な1を超える活性成分、好ましくは、互いに悪影響を及ぼさない相補的活性を持つものが含まれる場合がある。例えば、スタチンを更に提供することが望まれ得る。このような活性成分は、意図した目的のために有効な量で組み合わせられ適切に存在する。

【0194】

活性成分は、例えば、コアセルベーション技術又は界面重合法によって、例えばそれぞれヒドロキシメチルセルロース又はゼラチン-マイクロカプセル及びポリ（メチルメタクリレート（methy lmet hacy late））マイクロカプセル）、コロイド薬物送達系（例えばリポソーム、アルブミンミクロスフィア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル）又はマクロ・エマルジョンなどの調製されたマイクロカプセルに封入されてもよい。このような技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed.(1980)に開示される。

【0195】

徐放性調製物が調製されてもよい。徐放性製剤の好適な例は、抗体を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリクスを含み、そのマトリックスが成形品、例えばフィルムまたはマイクロカプセルの形をしている。

【0196】

インビボ投与に使用される製剤は、一般的に無菌である。無菌性は、例えば、滅菌濾過膜を通して濾過することにより、達成することができる。

【0197】

一態様において、本発明は、約100から約225mg/mLの抗PCSK9抗体、約180から約220mMのアルギニンコハク酸、約0.01%から約0.03%のポリソルベート、及び約5.2から約5.8のpHを含む組成物を提供する。ある実施態様において、組成物は、皮下投与に適している。ある実施態様において、組成物の粘度は、25℃で約25cP未満、25℃で約20cP未満、25℃で約15cP未満、25℃で約12cP未満、又は25℃で約10cP未満である。ある実施態様において、組成物は、2〜8℃で、少なくとも1ヶ月間、少なくとも2ヶ月間、少なくとも3ヶ月間、少なくとも4ヶ月間、少なくとも5カ月間、又は少なくとも6ヶ月間安定である。幾つかの実施態様において、組成物は、0.5-mL、1-mL、1.25-mL、1.5-mL、1.75-mL、2-mL、2.25-mL、又は2.5-mLのプレフィルドシリンジである。ある実施態様において、組成物中の抗体は、約110、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、205、210、215、220、及び225mg/mLのいずれかであり、これらの濃度のいずれかの間の濃度を含む。ある実施態様において、組成物中のコハク酸アルギニンは、約180、185、190、200、210及び220mMのいずれかであり、これらの濃度のいずれかの間の濃度を含む。ある実施態様において、組成物中のポリソルベート（例えば、ポリソルベート20、ポリソルベート80）は、約0.01%、0.015%、0.02%、0.025%、及び0.03%のいずれかであり、これらの濃度のいずれかの間の濃度を含む。ある実施態様において、組成物は、5.0、5.2、5.4、5.5、5.6、5.8、5.9、6.0、6.1及び6.2のいずれのpHを有しており、これらの値のいずれかの間のpHを含む。ある実施態様において、組成物中の抗PCSK9抗体は、約150mg/mLであり、組成物中のアルギニンコハク酸は、約200mMであり、組成物中のポリソルベート20は、約0.02%であり、pHは約5.5である。

【0198】

一態様において、本発明は、約150から約225mgの抗PCSK9抗体/mL、約10から約30mMのヒスチジンアセテート、約150から約170mMのアルギニンアセテート、約0.01%から約0.03%のポリソルベート、及び約5.8から約6.2のpHの組成物を提供する。ある実施態様において、組成物は、皮下投与に適している。ある実施態様において、組成物の粘度は、25℃で約25cP未満、25℃で約20cP未満、25℃で約15cP未満、25℃で約12cP未満、25℃で約10cP未満である。ある実施態様において、組成物は、2〜8℃で、少なくとも1ヶ月間、少なくとも2ヶ月間、少なくとも3ヶ月間、少なくとも4ヶ月間、少なくとも5カ月間、又は少なくとも6ヶ月間安定である。幾つかの実施態様において、組成物は、0.5-mL、1-mL、1.25-mL、1.5-mL、1.75-mL、2-mL、2.25-mL、または2.5-mLのプレフィルドシリンジである。ある実施態様において、組成物中の抗体は、約150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、205、210、215、220、及び225mg/mLのいずれかであり、これらの濃度のいずれかの間の濃度を含む。ある実施態様において、組成物中のヒスチジンアセテートは、約10、15、20、25、及び30mMのいずれかであり、これらの濃度の間の濃度を含む。ある実施態様において、組成物中のアルギニンアセテートは約150、155、160、165、及び170mMのいずれかであり、これらの濃度のい

ずれかの間の濃度を含む。ある実施態様において、組成物中のポリソルベート（例えば、ポリソルベート 20、ポリソルベート 80）は、約 0.01%、0.015%、0.02%、0.025%、及び 0.03% のいずれかであり、これらの濃度のいずれかの間の濃度を含む。ある実施態様において、組成物は、5.8、5.9、6.0、6.1 及び 6.2 のいずれかの pH を有しており、これらの値のいずれかの間の pH を含む。ある実施態様において、組成物中の抗 PCSK9 抗体は約 200 mg/mL であり、組成物中のヒスチジンアセテートは約 20 mM であり、組成物中のアルギニンアセテートは約 160 mM であり、及び組成物中のポリソルベート 20 は約 0.02% であり、pH は約 6.0 である。

【0199】

また、本明細書で提供されるのは、本明細書に記載の組成物中の抗 PCSK9 抗体を含む、200 mg から 1200 mg の範囲で個体に固定用量の抗体を送達するための、皮下投与デバイスである。一回の投与に用いる完全用量は、1 つ又は複数のデバイスであってもよい。ある実施態様において、デバイス中の抗体の濃度は、約 200 mg/mL である。ある実施態様において、デバイスは、プレフィルドシリンジ（例えば、0.5 mL シリンジ、1 mL シリンジ、1.25 mL シリンジ、1.5 mL シリンジ、1.75 mL シリンジ、2 mL シリンジ、2.25 mL シリンジ、又は 2.5 mL のシリンジ）又は高用量、シングルユース、皮下注入デバイス（例えば、送達するための 1-10 mL、2-8 mL、3-6 mL、4-5 mL、又は 4、5、6、7、8、9、又は 10 mL）である。

【0200】

G. 治療的方法及び組成物

本明細書で提供される抗 PCSK9 抗体のいずれかを、治療方法で使用する事ができる。

【0201】

一態様では、医薬として使用するための抗 PCSK9 抗体が提供される。別の態様において、コレステロール関連疾患と関連した状態の治療に使用のための抗 PCSK9 抗体が提供される。ある実施態様において、LDL コレステロールの上昇したレベルと関連する状態の治療に使用のための抗 PCSK9 抗体が提供される。ある実施態様において、治療の方法に使用される抗 PCSK9 抗体が提供される。ある実施態様において、本発明は、個体に抗 PCSK9 抗体の有効量を投与することを含む、LDL コレステロールの上昇したレベルと関連する状態を有する個体を治療する方法に使用される抗 PCSK9 抗体を提供する。ある実施態様において、本明細書に記載される方法及び使用は、例えばスタチンなど、少なくとも 1 つのさらなる治療薬の有効量を個体に投与することを更に含む。ある実施態様において、本発明は、被検体において LDL コレステロールのレベルを減少させることに使用のための抗 PCSK9 抗体を提供する。更なる実施態様において、本発明は、被検体において血清 LDL コレステロールのレベルを下げることに使用のための抗 PCSK9 抗体を提供する。ある実施態様において、本発明は、被検体において LDL R の利用可能性を増やすことに使用のための抗 PCSK9 抗体を提供する。ある実施態様において、本発明は、被検体において LDL R に対する PCSK9 の結合を阻害することにより使用のための抗 PCSK9 抗体を提供する。ある実施態様において、本発明は、LDL コレステロールのレベルを減少させるために個体に抗 PCSK9 抗体の有効量を投与することを含む、個体において LDL コレステロールのレベルを減少させる方法に使用のための抗 PCSK9 抗体を提供する。ある実施態様において、本発明は、血清 LDL コレステロールのレベルを下げるために個体に抗 PCSK9 抗体の有効量を投与することを含む、個体において血清 LDL コレステロールのレベルを下げる方法に使用のための抗 PCSK9 抗体を提供する。ある実施態様において、本発明は、LDL R の利用可能性を増やすために個体に抗 PCSK9 抗体の有効量を投与することを含む、個体において LDL R の利用可能性を増やす方法に使用のための抗 PCSK9 抗体を提供する。ある実施態様において、本発明は、LDL R に対する PCSK9 の結合を阻害するために個体に抗 PCSK9

抗体の有効量を投与することを含む、個体においてLDLRに対するPCSK9の結合を阻害する方法に使用のための抗PCSK9抗体を提供する。上記実施態様のいずれかに記載の「個体」又は「被検体」は、好ましくはヒトである。

【0202】

更なる態様にて、本発明は、医薬の製造又は調製における抗PCSK9抗体の使用を提供する。一実施態様において、本医薬はコレステロール関連疾患の治療のためのものである。ある実施態様において、コレステロール関連疾患は、高コレステロール血症である。別の実施態様において、本医薬は、高コレステロール血症を有する個体に、医薬の有効量を投与することを含む、高コレステロール血症を治療する方法で使用するのためのものである。

10

【0203】

ある実施態様において、治療される疾患は、PCSK9の活性を除去し、阻害し、又は低減することにより、改善し、寛解し、抑制又は予防することができる任意の疾患又は病態である。ある実施態様において、スタチンの使用を通じて一般的に立ち向かうことが可能な（治療可能又は予防可能な）疾患又は障害もまた治療することができる。ある実施態様において、コレステロール合成又はLDLR発現の増加から利益を得ることが可能である障害又は疾患はまた、本発明の抗PCSK9抗体により治療することができる。ある実施態様において、本発明の抗PCSK9抗体及び治療方法により治療可能な個体は、LDLアフェレーシス療法の治療に適応される個体、PCSK9活性化変異（機能変異の獲得、「GOF」）を持つ個体、ヘテロ接合体家族性高コレステロール血症（heFH）を有する個体、スタチン不耐症又はスタチンで制御されない一次性高コレステロール血症を持つ個体、及び予防可能に治療され得る高コレステロール血症を発症するリスクにある個体を包含する。他の適応症は、2型糖尿病、胆汁うっ滞性肝疾患（原発性胆汁性肝硬変）、ネフローゼ症候群、甲状腺機能低下症、肥満などの二次的原因と関連する脂質異常症、及びアテローム性動脈硬化症及び循環器疾患の予防と治療を包含する。ある実施態様において、本明細書に記載の抗PCSK9抗体及び治療方法によって治療可能な個体には、90から250mg/dLのLDL-Cレベル及び冠動脈性心疾患（CHD）又は実施例12に詳細に記載されているのと同等のCHDリスクを有する個体を含む。

20

【0204】

ある実施態様において、本明細書に記載の方法は、冠動脈性心臓病に罹患している個体へ抗PCSK9抗体を投与することを含む。ある実施態様において、冠動脈性心疾患を有する個体は、心筋梗塞の病歴を有していることが確認されている。ある実施態様において、冠動脈性心疾患を有する個体は、過去に冠動脈血管再生手術（例えば、経皮的冠動脈インターベンション又は冠動脈バイパス移植）を受けた個体を指す。ある実施態様において、冠動脈性心臓病を有する個体は、 $\geq 50\%$ の直径狭窄（例えば、侵襲的冠動脈造影検査又は心臓コンピュータ断層撮影冠動脈造影検査などの冠動脈造影検査により決定される）の少なくとも一つの冠動脈アテローム性動脈硬化病変を有する個体を指す。

30

【0205】

ある実施態様において、本明細書に記載の方法は、少なくとも一つのCHDリスク相当の個体に、抗PCSK9抗体を投与することを含む。特定の実施形態において、CHDリスク相当の個体は、例えば、末梢動脈疾患（例えば、足関節／上腕血圧指数 < 0.85 、経皮的又は外科的末梢動脈血管再生術の既往、血管造影上の末梢動脈疾患の既往、又は $\geq 50\%$ 直径狭窄に起因する下肢の非外傷性切断の既往）、頸動脈疾患（例えば、 $\geq 50\%$ 直径狭窄の頸動脈アテローム性動脈硬化症の病変、又は皮膚又は外科的頸動脈血行再生術の既往）、虚血性脳卒中の既往、又は腹部大動脈瘤などの臨床上的アテローム硬化性疾患の形態を1つ又は複数有する個体である。ある実施態様において、CHDリスク相当の個体は、I型糖尿病を持つ個体である。ある実施態様において、CHDリスク相当の個体は、臓器障害（例えば、網膜症、神経障害、又は微量アルブミン尿を含む腎症）を合併したI型糖尿病を持つ個体である。ある実施態様において、CHDリスク相当の個体は、中度から重度の慢性腎疾患を有する個体である。

40

50

【0206】

特定の実施形態において、方法は、本明細書に記載される以下の危険因子の一つ又は複数を有する個体に、抗PCSK9抗体を投与することを含む：年齢（男性45歳以上、又は女性55歳以上）、喫煙（1ヶ月以内）、高血圧（収縮期血圧が ≥ 140 mmHg、拡張期血圧が ≥ 90 mmHg、又は降圧剤を服用）、低HDLコレステロール（ 40 mg/dL）、又は、早期CHDの家族歴。

【0207】

一実施態様において、本明細書に記載される方法及び使用は、例えばスタチンなど、少なくとも1つのさらなる治療薬の有効量を個体に投与することを更に含む。ある実施態様において、本発明は、アテローム性動脈硬化症及び／又は循環器疾患を予防及び／又は治療するためである。ある実施態様において、更なる治療薬は、心血管系イベントの再発のリスクを低減する方法で使用のためである。ある実施態様において、更なる治療薬は、被験体のHDLコレステロールのレベルを上昇させるためのものである。

10

【0208】

更なる態様において、本発明は、例えば、上記の治療法のいずれかに使用される、本明細書で提供される抗PCSK9抗体のいずれかを含む薬学的製剤を提供する。一実施態様において、薬学的製剤は、本明細書で提供される抗PCSK9抗体のいずれか、及び薬学的に許容される担体を含む。その他の実施態様において、薬学的製剤は、本明細書で提供される抗PCSK9抗体のいずれかと、スタチンなど少なくとも1つの更なる治療剤を含む。

20

【0209】

本発明の抗体は、治療において、単独で、または他の薬剤と組み合わせて使用することができる。例えば、本発明の抗体は少なくとも1つの更なる治療剤と同時に投与され得る。ある実施態様において、そうした更なる治療薬はLDLRのレベルを上昇させる。ある実施態様において、更なる治療薬は、スタチン、例えば、アトルバスタチン、フルバスタチン、ロバスタチン、メバスタチン、ピタバスタチン、プラバスタチン、ロスバスタチン、シンバスタチン、又はそれらの任意の組み合わせ、例えば、Vytorin（登録商標）、ADVICOR（登録商標）又はSIMCOR（登録商標）などのLDLコレステロールを下げる薬剤である。所定の実施態様において、更なる治療薬は、HDLコレステロール上昇薬である。

30

【0210】

上記のこうした併用療法は、併用投与（2つ以上の治療剤が、同一または別々の製剤に含まれている）、及び、本発明の抗PCSK9抗体の投与が、追加の治療剤及び／又はアジュバントの投与の前、同時、及び／又はその後起きうる分離投与を包含する。

【0211】

本発明の抗体（及び任意の追加の治療剤）は、任意の適切な手段によって投与することができ、経口、肺内、及び鼻腔内、及び局所治療が所望される場合、病巣内投与が含まれる。非経口注入には、筋肉内、静脈内、動脈内、腹腔内、又は皮下投与が含まれる。投薬は、その投与が短期間か又は長期であるかどうかにより部分的に依存し、任意の適切な経路、例えば、静脈内または皮下注射などの注射により行うことができる。限定されないが、様々な時間点にわたる、単一または複数回投与、ボラス投与、パルス注入を含む様々な投与スケジュールが本明細書で考えられている。

40

【0212】

本発明の抗PCSK9抗体は良好な医療行為に合致した方法で処方され、投与され、投薬される。この観点において考慮すべき要因は、治療すべき特定の障害、治療すべき特定の哺乳類、個々の患者の臨床状態、障害の原因、薬剤送達部位、投与方法、投与日程及び医療従事者が知る他の要因を包含する。抗体は、必要ではないが任意で、問題となる障害の予防又は治療のために、現在使用中の一又は複数の薬剤とともに処方される。そのような他の薬剤の有効量は製剤中に存在する抗体の量、障害又は治療の種類及び上記した他の要因に依存する。これらは一般的には本明細書に記載されるのと同じ用量及び投与経路にお

50

いて、又は、本明細書に記載された用量の1%から99%で、又は経験的に／臨床的に妥当であると決定された任意の用量及び任意の経路により使用される。

【0213】

疾患の予防又は治療のためには、本発明の抗体の適切な用量（単独で使用されるか、又は、1つ又は複数の更なる治療的薬剤との組み合わせられる場合）は治療すべき疾患の種類、抗体の種類、疾患の重症度及び経過、抗体を予防又は治療目的のいずれにおいて投与するか、以前の治療、患者の臨床的履歴及び抗体に対する応答性、及び担当医の判断に依存する。抗体は、患者に対して、単回、又は一連の治療にわたって適切に投与される。疾患の種類及び重症度に応じて、例えば一回以上の別個の投与によるか、連続注入によるかに関わらず、抗体約 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ から $15\text{mg}/\text{kg}$ （例えば $0.1\text{mg}/\text{kg}$ から $10\text{mg}/\text{kg}$ ）が患者への投与のための初期候補用量となり得る。1つの典型的な一日当たり用量は上記した要因に応じて約 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ から $100\text{mg}/\text{kg}$ 又はそれ以上の範囲である。数日間以上に渡る反復投与の場合には、状態に応じて、治療は疾患症状の望まれる抑制が起こるまで持続するであろう。1つの例示される抗体用量は約 $0.05\text{mg}/\text{kg}$ から約 $10\text{mg}/\text{kg}$ の範囲である。従って、約 $0.5\text{mg}/\text{kg}$ 、 $2.0\text{mg}/\text{kg}$ 、 $4.0\text{mg}/\text{kg}$ 又は $10\text{mg}/\text{kg}$ の1つ又は複数の用量（又はこれらのいずれかの組み合わせ）を患者に投与してよい。このような用量は断続的に、例えば毎週又は3週毎（例えば患者が約2から約20、例えば抗体の約6投与量を受けるように）投与してよい。初期の高負荷用量の後、1つ又は複数の低用量を投与してよい。

【0214】

ある実施態様において、均一に固定した投薬計画が、個体に抗PCSK9抗体を投与することに用いられる。疾患の種類や重症度に応じて、典型的な均一固定用量は、抗PCSK9抗体の10から1200mgの範囲であり得る。抗体の1つの例示的な用量は、約10mgから約1000mgの範囲であろう。抗体の別の例示的な用量は、約600mgから約100mgの範囲であろう。抗体の別の例示的な用量は、約800mgから約200mgの範囲であろう。抗体の別の例示的な用量は、約400mgから約350mgの範囲であろう。抗体の別の例示的な用量は、約800mgから約750mgの範囲であろう。ある実施態様において、150mg、200mg、220mg、300mg、380mg、400mg、500mg、600mg、700mg、760mg、800mg、1000mg、1140mg、又は1200mgの抗PCSK9抗体が、個体に投与される。ある実施態様において、抗PCSK9抗体の固定用量は、2週間ごと、4週間ごと、6週間ごと、8週間ごと、10週間ごと、又は12週間ごとに投与される。ある実施態様において、抗PCSK9抗体の固定用量は、2週間ごと、4週間ごと、6週間ごと、8週間ごと、10週間ごと、又は12週間ごとに一回を超えない頻度で投与される。ある実施態様において、抗PCSK9抗体の固定用量は1ヶ月ごと、1.5ヶ月ごと、2ヶ月ごと、2.5ヶ月ごと、又は3ヶ月ごとに投与される。ある実施態様において、抗PCSK9抗体の固定用量は1ヶ月ごと、1.5ヶ月ごと、2ヶ月ごと、2.5ヶ月ごと、又は3ヶ月ごとに一回を超えない頻度で投与される。ある実施態様において、抗PCSK9抗体は皮下に投与される。しかしながら、他の用量用法も使用してよい。この治療法の進行は従来の手法及び試験により容易にモニタリングされる。

【0215】

ある実施態様において、投与されるべき、均一で、固定された、皮下投与量は、5mL、4.5mL、4mL、3.8mL、3.5mL、3mL、2.5mL、2mL、1.9mL、1.5mL、又は1mL以下の体積で提供される。ある実施態様において、均一で、固定された、皮下投与量は、4mL以下の総体積で800mgである。ある実施態様において、均一で、固定された、皮下投与量は、3.8mL以下の総体積で760mgである。ある実施態様において、均一で、固定された、皮下投与量は、3mL以下の総体積で600mgである。ある実施態様において、均一で、固定された、皮下投与量は、2mL以下の総体積で400mgである。ある実施態様において、均一で、固定された、皮下投与量は、1.9mL以下の総体積で380mgである。

【0216】

ある実施態様において、本明細書に記載の方法により治療される個体におけるLDLコレステロールレベルは、ベースラインから、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、又は少なくとも約60%低下する。幾つかの実施態様において、記載される方法により治療される個体におけるLDLコレステロールレベルは、ベースラインから少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、又は少なくとも約60%低下し、最後の投与後の少なくとも2週間、少なくとも1ヶ月、少なくとも2ヶ月又は3ヶ月間にわたって低下したレベルで維持される。幾つかの実施態様において、記載される方法により治療される個体におけるLDLコレステロールレベルは、初回投与の約1週間、約10日間、又は約2週間以内にベースラインから少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、又は少なくとも約60%低下する。幾つかの実施態様において、記載される方法により治療される個体におけるLDLコレステロールレベルは、初回投与の約1週間、約10日間、又は約2週間以内にベースラインから少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、又は少なくとも約60%低下し、最後の投与後の少なくとも2週間、少なくとも1ヶ月、少なくとも2ヶ月又は3ヶ月間にわたって低下したレベルで維持される。ある実施態様において、記載される方法により治療される個体におけるLDLコレステロールレベルは、少なくとも約45%低下し、少なくとも約6週間、少なくとも約7週間、又は少なくとも約1.5ヶ月間にわたって低下したレベルで維持される。ある実施態様において、記載される方法により治療される個体におけるLDLコレステロールレベルは、初回投与から約1週間以内に少なくとも約45%低下し、少なくとも約6週間、少なくとも約7週間、又は少なくとも約1.5ヶ月間にわたって低下したレベルで維持される。ある実施態様において、記載される方法により治療される個体におけるLDLコレステロールレベルは、初回投与から約10日以内に、少なくとも約50%低下し、少なくとも約4週間又は少なくとも約1ヶ月間にわたって低下したレベルで維持される。ある実施態様において、記載される方法により治療される個体におけるLDLコレステロールレベルは、初回投与から約10日以内に、少なくとも約50%低下し、少なくとも約4週間又は少なくとも約1ヶ月間にわたって低下したレベルで維持される。ある実施態様において、記載される方法により治療される個体におけるLDLコレステロールレベルは、初回投与から約10日以内に、少なくとも約50%低下し、少なくとも約8週間又は少なくとも約2ヶ月間にわたって低下したレベルで維持される。ある実施態様において、記載される方法により治療される個体におけるLDLコレステロールレベルは、初回投与の約2週間以内に少なくとも約55%低下され、少なくとも約2週間にわたって低下したレベルで維持される。本明細書で使用する場合、個々の「ベースライン」レベル（LDLコレステロールレベルなどのベースラインレベル）は、個々に本明細書に記載の抗PCSK9抗体の投与前のレベルを指す。ある実施態様において、ベースラインは、抗PCSK9抗体の投与前に得られた平均値又は2つ以上の測定値の平均であってもよい。

【0217】

ある実施態様において、本明細書に記載の方法により治療される個体におけるLDLコレステロールレベルは、ベースラインから、少なくとも約60mg/dL、少なくとも約70mg/dL、少なくとも約75mg/dL、少なくとも約80mg/dL、又は少なくとも約90mg/dL低下した。幾つかの実施態様において、記載される方法により治療される個体におけるLDLコレステロールレベルは、ベースラインから、少なくとも約60mg/dL、少なくとも約70mg/dL、少なくとも約75mg/dL、少なくとも約80mg/dL、又は少なくとも約90mg/dL低下し、最後の投与後、少なくとも2週間、少なくとも1ヶ月、少なくとも2ヶ月、又は3ヶ月間にわたって低下したレベ

ルで維持される。幾つかの実施態様において、記載される方法により治療される個体におけるLDLコレステロールレベルは、初回投与の約1週間、約10日間、又は約2週間以内に、ベースラインから少なくとも約60mg/dL、少なくとも約70mg/dL、少なくとも約75mg/dL、少なくとも約80mg/dL、又は少なくとも約90mg/dL低下する。幾つかの実施態様において、記載される方法により治療される個体におけるLDLコレステロールレベルは、初回投与の約1週間、約10日間、又は約2週間以内に、ベースラインから少なくとも約60mg/dL、少なくとも約70mg/dL、少なくとも約75mg/dL、少なくとも約80mg/dL、又は少なくとも約90mg/dL低下し、最後の投与後、少なくとも2週間、少なくとも1ヶ月、少なくとも2ヶ月、又は3ヶ月間にわたって低下したレベルで維持される。幾つかの実施態様において、記載される方法により治療される個体におけるLDLコレステロールレベルは、ベースラインから少なくとも約60mg/dL又は約70mg/dL低下し、少なくとも約6週間、少なくとも約7週間又は少なくとも約1.5ヶ月間にわたって低下したレベルで維持された。幾つかの実施態様において、記載される方法により治療される個体におけるLDLコレステロールレベルは、初回投与から約1週間以内に、ベースラインから少なくとも約60mg/dL又は約70mg/dL低下し、少なくとも約6週間、少なくとも約7週間又は少なくとも約1.5ヶ月間にわたって低下したレベルで維持された。ある実施態様において、記載される方法により治療される個体におけるLDLコレステロールレベルは、少なくとも約80mg/dL低下し、少なくとも約4週間又は少なくとも約1ヶ月間にわたって低下したレベルで維持される。ある実施態様において、記載される方法により治療される個体におけるLDLコレステロールレベルは、初回投与から約10日以内に、少なくとも約80mg/dL低下し、少なくとも約4週間又は少なくとも約1ヶ月間にわたって低下したレベルで維持される。ある実施態様において、記載される方法により治療される個体におけるLDLコレステロールレベルは、少なくとも約90mg/dL低下し、少なくとも約2週間にわたって低下したレベルで維持される。ある実施態様において、記載される方法により治療される個体におけるLDLコレステロールレベルは、初回投与の約2週間以内に、少なくとも約90mg/dL低下し、少なくとも約2週間にわたって低下したレベルで維持される。

【0218】

ある実施態様において、LDLコレステロールレベルの低下は、投薬の間、一定の範囲内に維持される。ある実施態様において、抗PCSK9抗体の用量を投与すると、LDLコレステロールレベルは、ベースラインから少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、又は少なくとも約60%の最下点まで低下し、次の抗PCSK9抗体投与前に、ベースラインより約40%、45%、50%、55%、又は60%下のレベルを超えてで、増加しない。ある実施態様において、抗PCSK9抗体の用量を投与すると、LDLコレステロールレベルは、ベースラインから少なくとも約45%の最下点まで低下し、次の抗PCSK9抗体投与前、ベースラインより約40%又は45%下のレベルを超えて増加しない。ある実施態様において、抗PCSK9抗体の用量を投与すると、LDLコレステロールレベルは、ベースラインから少なくとも約50%の最下点まで低下し、次の抗PCSK9抗体投与前、ベースラインより約40%、45%又は50%下のレベルを超えて増加しない。ある実施態様において、抗PCSK9抗体の用量を投与すると、LDLコレステロールレベルは、ベースラインから少なくとも約55%の最下点まで低下し、次の抗PCSK9抗体投与前、ベースラインより約40%、45%、50%、又は55%下のレベルを超えて増加しない。ある実施態様において、抗PCSK9抗体の用量を投与すると、LDLコレステロールレベルは、ベースラインから少なくとも約60%の最下点まで低下し、次の抗PCSK9抗体投与前、ベースラインより約40%、45%、50%、55%、又は60%下のレベルを超えて増加しない。

【0219】

ある実施態様において、LDLコレステロールレベルの低下は、投薬の間、一定の範囲内に維持される。ある実施態様において、抗PCSK9抗体の用量を投与すると、LDL

コレステロールレベルは、ベースラインより少なくとも約60mg/dL、少なくとも約70mg/dL、少なくとも約75mg/dL、少なくとも約80mg/dL、又は少なくとも約90mg/dL下、の最下点まで低下し、次の抗PCSK9抗体投与前、ベースラインより約55mg/dL、60mg/dL、65mg/dL、70mg/dL、75mg/dL、80mg/dL又は90mg/dL下のレベルを超えて増加しない。ある実施態様において、抗PCSK9抗体の用量を投与すると、LDLコレステロールレベルは、ベースラインより少なくとも約60mg/dL下の最下点まで低下し、次の抗PCSK9抗体投与前、ベースラインより約55mg/dL又は60mg/dL下のレベルを超えて増加しない。ある実施態様において、抗PCSK9抗体の用量を投与すると、LDLコレステロールレベルは、ベースラインより少なくとも約70mg/dL下の最下点まで低下し、次の抗PCSK9抗体投与前、ベースラインより約55mg/dL、60mg/dL、65mg/dL、又は70mg/dL下のレベルを超えて増加しない。ある実施態様において、抗PCSK9抗体の用量を投与すると、LDLコレステロールレベルは、ベースラインより少なくとも約75mg/dL下の最下点まで低下し、次の抗PCSK9抗体投与前、ベースラインより約55mg/dL、60mg/dL、65mg/dL、70mg/dL、又は75mg/dL下のレベルを超えて増加しない。ある実施態様において、抗PCSK9抗体の用量を投与すると、LDLコレステロールレベルは、ベースラインより少なくとも約80mg/dL下の最下点まで低下し、次の抗PCSK9抗体投与前、ベースラインより約55mg/dL、60mg/dL、65mg/dL、70mg/dL、75mg/dL、又は80mg/dL下のレベルを超えて増加しない。ある実施態様において、抗PCSK9抗体の用量を投与すると、LDLコレステロールレベルは、ベースラインより少なくとも約90mg/dL下の最下点まで低下し、次の抗PCSK9抗体投与前、ベースラインより約55mg/dL、60mg/dL、65mg/dL、70mg/dL、75mg/dL、80mg/dL又は90mg/dL下のレベルを超えて増加しない。

10

20

【0220】

一実施態様において、抗PCSK9抗体は8週間ごとに800mgの用量で被検体に投与され、被検体におけるLDLコレステロールのレベルは、10日以内にベースラインよりも少なくとも50%低下し、次の投与前、ベースラインより40%又は45%下のレベルを超えて増加しない。一実施態様において、抗PCSK9抗体は8週間ごとに760mgの用量で被検体に投与され、被検体におけるLDLコレステロールのレベルは、14日以内にベースラインよりも少なくとも45%低下し、次の投与前、ベースラインより35%又は40%下のレベルを超えて増加しない。一実施態様において、抗PCSK9抗体は4週間ごとに400mgの用量で被検体に投与され、被検体におけるLDLコレステロールのレベルは、10日以内にベースラインよりも少なくとも50%低下し、次の投与前、ベースラインより45%又は50%下のレベルを超えて増加しない。一実施態様において、抗PCSK9抗体は4週間ごとに380mgの用量で被検体に投与され、被検体におけるLDLコレステロールのレベルは、10日以内にベースラインよりも少なくとも50%低下し、次の投与前、ベースラインより45%又は50%下のレベルを超えて増加しない。

30

40

【0221】

ある実施態様において、抗PCSK9抗体を受けた被検体は、LDL-Cレベルについてモニターされ、そのレベルが、25又は15mg/dL未満に低下する場合には、投与される抗体の総量を初期用量投与の約50%又は25%に減少させて、同じ注射の頻度を維持したり、投与される抗体の総量を維持しながらも、2倍又は4倍（例えば、4週間に一回から8週間又は16週間に一回）に、又はそれらの組み合わせによって頻度を減少させたりすることにより（例えば、用量を減らし、投与頻度を変更することにより）、その後、それらの用量は、初期投与量の約50%又は25%にまで調整される。ある実施態様において、抗PCSK9抗体を800mgの初期用量で8週間ごとに被検体に投与する。被検体はモニターされ、被検体のLDL-cレベルが25又は15mg/dL未満に低下

50

した場合、その後、被検体は8週間ごとに400mg、16週間ごとに400mg、8週間ごとに380mg、16週間ごとに380mg、8週間ごとに200mg、4週間ごとに200mg、8週間ごとに190mg、4週間ごとに190mg、16週間又は4ヶ月ごとに760mg、又は、24週間又は6ヶ月ごとに760mg、16週間又は4ヶ月ごとに800mg、又は、24週間又は6ヶ月ごとに800mgの投与量に切り替えられる。一実施態様において、抗PCSK9抗体は、800mgの初期用量で8週間ごとに被検体に投与され、被検体はモニターされ、被検体のLDL-cレベルが25mg/dL未満に低下した場合、被検体は8週間ごとに200mgの投与量に切り替えられる。一実施態様において、抗PCSK9抗体を8週間ごとに初期用量800mgで被検体に投与され、被検体はモニターされ、被検体のLDL-cレベルが15mg/dL未満に低下した場合、被検体は、8週間ごとに200mgの投与量に切り替えられる。ある実施態様において、抗PCSK9抗体を760mgの初期用量で8週間ごとに被検体に投与する。被検体はモニターされ、被検体のLDL-cレベルが25又は15mg/dL未満に低下した場合、被検体は8週間ごとに380mg、16週間ごとに380mg、4週間ごとに200mg、8週間ごとに200mg、8週間ごとに190mg、4週間ごとに190mg、16週間又は4ヶ月ごとに760mg、又は760mgごとに24週間又は6ヶ月の投与量に切り替えられる。一実施態様において、抗PCSK9抗体は、760mgの初期用量で8週間ごとに被検体に投与され、被検体はモニターされ、被検体のLDL-cレベルが25mg/dL未満に低下した場合、被検体は8週間ごとに190mg又は200mgの投与量に切り替えられる。一実施態様において、抗PCSK9抗体は、760mgの初期用量で8週間ごとに被検体に投与され、被検体はモニターされ、被検体のLDL-cレベルが15mg/dL未満に低下した場合、被検体は8週間ごとに190mg又は200mgの投与量に切り替えられる。ある実施態様において、抗PCSK9抗体を400mgの初期用量で4週間ごとに被検体に投与する。被検体はモニターされ、被検体のLDL-cレベルが25又は15mg/dL未満に低下した場合、被検体は4週間ごとに200mg、8週間ごとに200mg、4週間ごとに100mg、8週間ごとに400mg、16週間又は3ヶ月ごとに400mg、2週間ごとに50mg、又は2週間ごとに25mgの投与量に切り替えられる。一実施態様において、抗PCSK9抗体は、400mgの初期用量で4週間ごとに被検体に投与され、被検体はモニターされ、被検体のLDL-cレベルが25mg/dL未満に低下した場合、被検体は4週間ごとに100mgの投与量に切り替えられる。一実施態様において、抗PCSK9抗体は、400mgの初期用量で4週間ごとに被検体に投与され、被検体はモニターされ、被検体のLDL-cレベルが15mg/dL未満に低下した場合、被検体は4週間ごとに100mgの投与量に切り替えられる。一実施態様において、抗PCSK9抗体は、400mgの初期用量で4週間ごとに被検体に投与され、被検体はモニターされ、被検体のLDL-cレベルが25mg/dL未満に低下した場合、被検体は8週間ごとに200mgの投与量に切り替えられる。一実施態様において、抗PCSK9抗体は、400mgの初期用量で4週間ごとに被検体に投与され、被検体はモニターされ、被検体のLDL-cレベルが15mg/dL未満に低下した場合、被検体は8週間ごとに200mgの投与量に切り替えられる。一実施態様において、抗PCSK9抗体は、400mgの初期用量で4週間ごとに被検体に投与され、被検体はモニターされ、被検体のLDL-cレベルが25mg/dL未満に低下した場合、被検体は2週間ごとに50mgの投与量に切り替えられる。一実施態様において、抗PCSK9抗体は、400mgの初期用量で4週間ごとに被検体に投与され、被検体はモニターされ、被検体のLDL-cレベルが15mg/dL未満に低下した場合、被検体は2週間ごとに50mgの投与量に切り替えられる。一実施態様において、抗PCSK9抗体は、400mgの初期用量で4週間ごとに被検体に投与され、被検体はモニターされ、被検体のLDL-cレベルが25mg/dL未満に低下した場合、被検体は2週間ごとに25mgの投与量に切り替えられる。一実施態様において、抗PCSK9抗体は、400mgの初期用量で4週間ごとに被検体に投与され、被検体はモニターされ、被検体のLDL-cレベルが15mg/dL未満に低下した場合、被検体は2週間ごとに25mgの投与量に切り

10

20

30

40

50

替えられる。ある実施態様において、抗PCSK9抗体を380mgの初期用量で4週間ごとに被検体に投与する。被検体はモニターされ、被検体のLDL-cレベルが25又は15mg/dL未満に低下した場合、被検体は4週間ごとに200mg、8週間ごとに200mg、4週間ごとに190mg、4週間ごとに100mg、4週間ごとに90mg、8週間ごとに100mg、16週間又は3ヶ月ごとに400mg、2週間ごとに50mg、又は2週間ごとに25mgの投与量に切り替えられる。一実施態様において、抗PCSK9抗体は、380mgの初期用量で4週間ごとに被検体に投与され、被検体はモニターされ、被検体のLDL-cレベルが25mg/dL未満に低下した場合、被検体は4週間ごとに100mgの投与量に切り替えられる。一実施態様において、抗PCSK9抗体は、380mgの初期用量で4週間ごとに被検体に投与され、被検体はモニターされ、被検体のLDL-cレベルが15mg/dL未満に低下した場合、被検体は4週間ごとに100mgの投与量に切り替えられる。一実施態様において、抗PCSK9抗体は、380mgの初期用量で4週間ごとに被検体に投与され、被検体はモニターされ、被検体のLDL-cレベルが25mg/dL未満に低下した場合、被検体は8週間ごとに200mgの投与量に切り替えられる。一実施態様において、抗PCSK9抗体は、380mgの初期用量で4週間ごとに被検体に投与され、被検体はモニターされ、被検体のLDL-cレベルが15mg/dL未満に低下した場合、被検体は8週間ごとに200mgの投与量に切り替えられる。一実施態様において、抗PCSK9抗体は、380mgの初期用量で4週間ごとに被検体に投与され、被検体はモニターされ、被検体のLDL-cレベルが25mg/dL未満に低下した場合、被検体は2週間ごとに50mgの投与量に切り替えられる。一実施態様において、抗PCSK9抗体は、380mgの初期用量で4週間ごとに被検体に投与され、被検体はモニターされ、被検体のLDL-cレベルが15mg/dL未満に低下した場合、被検体は4週間ごとに50mgの投与量に切り替えられる。一実施態様において、抗PCSK9抗体は、380mgの初期用量で4週間ごとに被検体に投与され、被検体はモニターされ、被検体のLDL-cレベルが25mg/dL未満に低下した場合、被検体は2週間ごとに25mgの投与量に切り替えられる。一実施態様において、抗PCSK9抗体は、380mgの初期用量で4週間ごとに被検体に投与され、被検体はモニターされ、被検体のLDL-cレベルが15mg/dL未満に低下した場合、被検体は2週間ごとに25mgの投与量に切り替えられる。

【0222】

上記の製剤または治療方法のいずれかが、抗PCSK9抗体の代わりか又は抗PCSK9抗体に加えて、本発明のイムノコンジュゲートを用いて行うことができることが理解される。

【0223】

H. 製造品及びキット

本発明の他の実施態様において、上述した障害の治療、予防、及び／又は診断に有用な材料を含む製造品又はキットが提供される。ある実施態様において、製造品又はキットは、本明細書に記載の複数の抗PCSK9抗体又は組成物を含む容器を含む。ある実施態様において、製造品又はキットは、容器と容器上ないしは容器に付随するラベルないしはパッケージ挿入物を具備する。好適な容器は、例としてボトル、バイアル、シリンジ、IV輸液バッグ等を含む。容器はガラス又はプラスチックなどの様々な物質から形成されうる。容器は、疾患の治療、予防、及び／又は診断に有効である、それ自体か、又はその他の組成物と併用される化合物を収容し、無菌のアクセスポートを有し得る（例えば、容器は皮下注射針による穴あきストッパーを有する静脈内溶液バッグ又はバイアルであってよい

10

20

30

40

50

）。組成物中の少なくとも一の活性剤は本発明の抗PCSK9抗体である。ラベルまたはパッケージ挿入物は、組成物が特定の症状の治療のために使用されることを示している。更に、製造品又はキットは、(a) 組成物が本発明の抗PCSK9抗体を包含する組成物を含む第一の容器；及び(b) 組成物が更なる細胞障害性又はその他の治療的薬剤を包含する組成物を含む第二の容器を含み得る。ある実施態様において、第二の容器は第二の治療薬を含み、ここで第二の治療薬は「スタチン」クラスのコレステロール低下薬である。ある実施態様において、スタチンは、アトルバスタチン（例えば、LIPITOR（登録商標）又はTorvast）、ロバスタチン（例えば、MEVACOR（登録商標）、ALTOCORTM、又はALTOPREV（登録商標））、メバスタチン（ピタバスタチン（例えば、LIVALO（登録商標）又はPITAVA（登録商標））、プラバスタチン（例えば、Pravachol（登録商標）、Selektine（登録商標）、Lipostat（登録商標））、ロスバスタチン（例えば、クレストール（登録商標））、シンバスタチン（例えば、Zocor（登録商標）、Lipex（登録商標））、又はそれらの任意の組み合わせ、例えば、Vytorin（登録商標）、ADVICOR（登録商標）又はSIMCOR（登録商標）である、及び／又は包含する。

10

【0224】

本発明の本実施態様における製造品又はキットは、組成物が特定の疾患を治療することに用いることができることを示すパッケージ挿入物をさらに含んでもよい。別法として、または加えて、製造品は、薬学的に許容されるバッファー、例えば注射用静菌水（BWWI）、リン酸緩衝化塩水、リンガー溶液及びデキストロス溶液を含む第二（または第三）の容器をさらに含んでもよい。これは、他のバッファー、希釈剤、フィルター、針、及びシリンジを含む、商業的及びユーザーの立場から望まれる他の物質のさらに含んでもよい。

20

【0225】

上記の製造品又はキットのいずれかは、抗PCSK9抗体の代わりか又はそれに加えて、本発明のイムノコンジュゲートを含み得ることが理解される。

【実施例】

【0226】

以下は本発明の方法及び組成物の例である。上記提供される一般的な説明を前提として、他の様々な実施態様が実施され得ることが理解される。

30

【0227】

実施例1：抗PCSK9抗体の生成

残基番号付けは、Kabat(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD(1991).)に従う。

【0228】

抗PCSK9抗体を同定するためのライブラリー選別とスクリーニング

社内で生成されたビオチン化ヒトPCSK9を、ライブラリー選別のための抗原として用いた。ファージライブラリーは溶液相におけるビオチン化PCSK9に対して5ラウンドを選別した。選別の第一ラウンドにおいて、20 µg/mLのビオチン化PCSK9が、ファージブロッキング緩衝液PBST（リン酸緩衝化生理食塩水（PBS）及び1%（w/v）のウシ血清アルブミン（BSA）及び0.05%（v/v）のTween（登録商標）20）で予めブロックされた、抗体ファージライブラリーのVHとVLドメイン（例えばLeeら、J. Immunol. Meth. 284:119-132, 2004を参照）とVH/VL(LIANG ET AL., JMB. 366: 815-829, 2007を参照）へと添加され、室温で一晩インキュベートされた。翌日、120 µlのPBST/BSA事前吸収DYNABEADS（登録商標）MyOneTM ストレプトアビジンT1（Invitrogen, Carlsbad, CA）を各ライブラリーに加え、室温で1時間インキュベートした。次いで、ビーズをPBT（0.05%のTween（登録商標）20を含むPBS）で3回洗浄し、結合したファージを30分間1 mLの50 mMのHCl及び500 mMのNaClで溶出させ、1 Mのトリス

40

50

塩基液 (pH 7.5) を 400 μ L で中和した。回収されたファージを、大腸菌 X L-1 Blue 細胞中で増幅した。その後の選択ラウンドの間に、ビオチン化 PC SK 9 を持つ抗体ファージのインキュベーションを 2~3 時間に短縮し、ファージ結合した抗原は、ニュートラアビジンコーティング (カタログ # 89890, 10 μ g/ml, Fisher Scientific, Waltham, MA) 又はストレプトアビジンでコーティング (カタログ # 21125, 10 μ g/ml, Fisher Scientific, Waltham, MA) された Nunc 96 ウェルマキシソープTM イムノプレートで 30 分間捕捉した。プレートの洗浄のストリンジェンシーを徐々に増加した。

【0229】

10

5 ラウンドのパンニング (panning) の後、有意な濃縮が観察された。96 クローンが VH 及び VH / VL ライブラリー選別からそれぞれ採取され、それらがヒト PC SK 9 に結合したかどうかを決定した。これらのクロンの可変領域は、固有のシーケンスクロンを同定するために PCR 配列決定した。バックグラウンドより少なくとも 5 倍ヒト PC SK 9 に結合する固有のファージ抗体が選択され、インビトロでの細胞アッセイにおける評価のために完全長 IgG に再編成 (reformatted) された。

【0230】

目的のクロンは、個々のクロンの VL 及び VH 領域をそれぞれ L PG 3 及び L PG 4 ベクターにクローニングし、哺乳動物 CHO 細胞で一過性に発現させ、プロテイン A カラムで精製することにより、IgG に再編成された。

20

【0231】

VH ライブラリーに由来するクロンの親和性向上のためのライブラリー構築

全て CDR-L 3 の位置に終止コドン (TAA) を含み、かつ M13 バクテリオファージの表面に一価の Fab を表示する、ファージミド pW0703 (ファージミド pV0350-2b (Lee ら、J. Mol. Biol. 340, 1073-1093(2004)) に由来する) が、親和性成熟のために VH ライブラリーから目的のクロンの重鎖可変ドメイン (VH) を移植するためのライブラリーテンプレートとしての機能を果たした。ハード及びソフトの両方のランダム化戦略が、親和性成熟のために使用された。ハードランダム化のために、3 つの軽鎖 CDR の選択された位置を含む一つの軽鎖ライブラリーが、天然のヒト抗体を模倣するように設計されたアミノ酸を用いて無作為化され、その設計された DNA の縮退は、Lee らの (J. Mol. Biol. 340, 1073-1093(2004)) に記載されている。ソフトランダム化のために、CDR-L 3 の 91-96、CDR-H1 の 30-33, 35、CDR-H2 の 50, 52, 53-54, 56, 及び 58、CDR-H3 の 95-100, 100A, 及び 100C が標的とされ; CDR ループの 3 つの異なる組み合わせ、H1 / L3, H2 / L3, 及び H3 / L3 がランダム化のために選択された。ソフトランダム化条件を獲得するために、選択された位置で約 50 % の突然変異率を導入し、変異原性 DNA が、野生型ヌクレオチドを好む塩基の 70-10-10-10 混合物で合成された (Gallop ら、J. Journal of Medicinal Chemistry 37:1233-1251(1994))。

30

【0232】

親和性の向上をもたらすためのファージ選別戦略

40

親和性向上選択のために、ファージライブラリーは、ストリンジェンシーを増加させた 5 ラウンドの溶液選別を受けた。溶液選別の第一ラウンドにおいて、1 % BSA 及び 0.05 % Tween 20 中で 30. D. /ml のファージインプットが、1 % のスーパーブロック (登録商標) (Pierce Biotechnology) と 0.05 % の Tween 20 を含有する 100 μ l の緩衝液中で、100 nM のビオチン化 PC SK 9 と共に室温で 2 時間インキュベートされた。混合物は 1 % のスーパーブロック (登録商標) で 10 X に更に希釈され、100 μ l /ウェルをニュートラアビジンでコーティングされたウェル (10 μ g/ml) に室温で 30 分間穏やかに振盪しながら適用した。ウェルを PBS-0.05 % Tween (登録商標) 20 で 10 回洗浄した。バックグラウンド結合を決定するために、ファージを含むコントロールウェルをニュートラアビジンで

50

コーティングされたプレート上に捕獲した。結合ファージを50 mM HCl、500 mM KClの150 μ l/ウェルで溶出し、続いて1 MのTris (pH 8)の50 μ l/ウェルにより中和し、滴定し、次のラウンドのために増殖された。溶液選別の更なる4回のラウンドが、選別ストリンジェンシーの増加と合わせて実行された。最初の2～3ラウンドは、ビオチン化標的タンパク質濃度を100 nMから1 nMに減少させることによる会合速度 (on-rate) 選択のためであり、最後の2回のラウンドは、室温で弱い結合剤を競合するため、過剰量の非ビオチン化標的タンパク質 (300から1000倍以上)を加えることによる解離速度 (off-rate) 選択のためのものであった。

【0233】

ハイスループット親和性スクリーニングELISA (単一スポットコンペティション)コロニーが第5ラウンドのスクリーニングから採取された。コロニーを96ウェルプレート (Falcon) 中で1E10/ml KO7と50 μ g/mlのカルベニシリンを含む2YT培地の150 μ l/ウェルで、37℃で一晩増殖させた。同じプレートから、XL-1に感染した親のファージのコロニーをコントロールとして取り上げた。96ウェルNuncマキシソープTMプレートを一晩4℃でPBS中の100 μ l/ウェルのニュートラアビジン (10 μ g/ml)でコーティングした。プレートは1時間、PBS中で0.05%のTween (登録商標) 20及び150 μ lの1%のBSAでブロックした。

【0234】

35 μ lのファージ上清が、15 nMのPCSK9の有無によらず、35 μ lのELISA (酵素結合免疫吸着測定法) 緩衝液 (0.5%のBSA、0.05%のTween (登録商標) 20を含むPBS) で希釈され、Fプレート (NUNC) 中で、室温で1時間インキュベートさせた。3 μ g/mlのビオチン化PCSK9を35 μ lがその後各ウェルに添加され、室温で15分間インキュベートした。混合物の95 μ lをニュートラアビジンでコーティングしたプレートに並べて移した。プレートを穏やかに15分間振とうし、プレートにビオチン化PCSK9が結合したファージの捕捉を可能にした。プレートをPBS-0.05%のTween (登録商標) 20で10回洗浄した。結合は、ELISA緩衝液 (1:2500) 中で西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 結合抗M13抗体を添加し、室温で30分間インキュベートすることにより定量した。プレートをPBS-0.05% Tween (登録商標) 20で10回洗浄した。次に、3, 3', 5, 5' -テトラメチルベンジジン (TMB) ペルオキシダーゼ基質及びペルオキシダーゼ溶液B (H₂O₂) (Kirkegaard-Perry Laboratories (Gait her sburg, MD)) の1:1の比の100 μ l/ウェルをウェルに添加し、室温で5分間インキュベートした。反応を各ウェルに100 μ lの0.1 Mリン酸 (H₃PO₄) を添加することによって停止させ、室温で5分間インキュベートさせた。各ウェルの黄色のO.D. (光学密度) を450 nmで標準ELISAプレートリーダーを用いて測定した。O.D. 減少 (%) は次式により算出した：

$$OD_{450nm} \text{ 減少 (\%)} = [(\text{競争相手を含むウェルの } OD_{450nm}) / (\text{競争相手を含まないウェルの } OD_{450nm})] * 100$$

【0235】

親ファージのウェル (100%) のOD_{450nm} 減少 (%) と比較して、50%未満のOD_{450nm} 減少 (%) を有するクローンが配列解析用に選択された。ファージ調製のために、親のクローン (クローン508.20b) との比較によりPCSK9に対する結合親和性 (ファージIC₅₀) を決定するために、ユニークなクローンが選択された。次いで、最も親和性が向上されたクローン (508.20.04b、508.20.06、508.20.28b、508.20.33b及び508.20.84) は、抗体産生及び更なるピアコア (BIAcore) 結合動態解析及び他のインビトロ又はインビボアッセイのためヒトIgG₁に再編成された。図1及び図2を参照。

【0236】

実施例2：ピアコアによる抗PCSK9抗体の特性評価

10

20

30

40

50

抗PCSK9抗体の結合親和性は、ピアコアTM－3000装置を使用して表面プラズモン共鳴（SRP）で測定した。抗PCSK9ヒト抗体は、CM5バイオセンサーチップ上にコーティングされたマウス抗ヒトFc抗体（カタログ# BR-1008-39, GE Healthcare, Piscataway, NJ）によって捕捉され、約200応答単位（RU）を達成した。動態測定のため、ヒト、マウス、アカゲザル及びカニクイザルPCSK9の2倍連続希釈（500nMから、245nM）を、25℃で30μl／分の流量でPBT緩衝液（0.05%のTween（登録商標）20を含むPBS）中に注入した。会合速度（ k_{on} ）及び解離速度（ k_{off} ）は単純な一対一のラングミュア結合モデルを用いて計算した（BIAcore評価用ソフトウェアのバージョン3.2）。平衡解離定数（ K_D ）は k_{off} / k_{on} の比として算出した。図3を参照。

10

【0237】

実施例3：LDLR－PCSK9結合アッセイ

競合結合ELISAを、LDLRに対するヒトPCSK9結合の遮断における抗PCSK9抗体の活性を調べるために行った。簡潔には、可溶性ヒトLDLR細胞外ドメイン（R&D Systems, Minneapolis, MN）を1μg/mL、4℃で一晩384ウェルマキシソーププレート（NALGENE（登録商標）NUNCTM International, Rochester, NY）上に塗布した。その後、抗PCSK9抗体とコントロール抗体を異なる濃度で事前に混合したビオチン化ヒトPCSK9の0.25μg/mLがプレートに加えられ、室温で2時間インキュベートした。コーティングされたLDLRへのPCSK9の結合が、ストレプトアビジン－HRP（GE Healthcare）a及び基質の3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン（TMBE-1000, Moss, Inc., Pasadena, MD）を添加することによって検出された。結合結果（OD）を、抗体濃度に対してプロットし、IC50値はKaleidagraphソフトウェアを使用して生成された。図4を参照。

20

【0238】

実施例4：抗体は、HepG2細胞でLDLRダウンレギュレーションを防ぐ

HepG2細胞を、48ウェルプレートに 1×10^5 で播種した。翌日、培地を、10%のリボタンパク質欠乏血清（LPDS, Frederick, Maryland）に変更した。翌日、15μg/mLのPCSK9プラス／マイナス抗PCSK9抗体を37℃で4時間細胞に添加した。細胞をPBSで洗浄し、2.5mMのEDTAを用いて剥離した。細胞を、15分間、1:20の抗LDLR（Progen Biotechnik, Heidelberg, Germany）とインキュベートし、PBSで洗浄し、そして15分間インビトロジェンからの1:200ヤギ抗マウスAlexaFluor（登録商標）488（Carlsbad, CA）でインキュベートした。細胞を洗浄し、PBS＋10μg/mLのヨウ化プロピジウムに再懸濁した。次いで、サンプルをデュアルレーザーフローサイトメーターで分析した（FACScanTM, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ）。データは、5つ全ての抗PCSK9抗体（508.20.04b、508.20.06、508.20.28b、508.20.33b及び508.20.84）は、LDLRのダウンレギュレーションを防ぐ示唆している。図5を参照。

30

40

【0239】

実施例5：マウス肝臓におけるLDLRのダウンレギュレーション

正常なC57／BL6マウス（Charles River, Wilmington, MA）がI.V.注射による3、30、又は60μgのPCSK9により処置された。製造業者の指示に従ってカルジオケム（Gibbstown, NJ）からのプロテオエクストラクトネイティブ膜タンパク質抽出キット（ProteoExtract（登録商標）Native Membrane Protein Extraction Kit）を使用し、各マウスからの肝臓を、PCSK9のIV投与後、15分、1時間又は4時間で回収し、タンパク質が抽出された。コントロールとして、5匹のマウスがビヒクルだけで処置され、各肝臓の溶解物の8μgを分析のためにプールした。溶解物を8%ト

50

リスーグリシゲル上でSDS-PAGE (Invitrogen, Carlsbad, CA) によって分析した。タンパク質はiBlot (登録商標) (Invitrogen) を用いてニトロセルロース膜に移した。膜を1時間、5%脱脂乳でブロッキングした後、4℃で一晩、5%脱脂乳中で1:500抗LDLR (Abcam, Cambridge, MA) と共にインキュベートした。翌日、膜を、TBS-Tで3回洗浄し、1時間1:5000抗ウサギHRP (GE Healthcare, Piscataway, NJ) と共にインキュベートし、TBS-Tで3回洗浄した。タンパク質はECL-プラス (GE Healthcare) を使用して可視化し、XARフィルム (Kodak (登録商標), Rochester, NY) に暴露した。一晩の曝露後、膜を、TBS-Tで洗浄し、1時間、1:500抗トランスフェリン受容体抗体 (Invitrogen) と共にインキュベートし、TBS-Tで洗浄し、1時間1:5000抗マウスHRP (GE Healthcare) と共にインキュベートし、TBS-Tで洗浄し、ECL-Plusで可視化した。抗LDLR抗体を用いたウエスタンブロットは、マウス肝臓において1時間の30 µgのPCSK9がLDLRレベルを有意にダウンレギュレートしたことを示している。図6を参照。

10

【0240】

実施例6: 抗体は、肝LDLRダウンレギュレーションを防ぐ

正常なC17/BL6 (Charles River) マウスに、30 µgのPCSK9による処置の24時間前に1時間、ビヒクル又は5 mg/kgの抗PCSK9抗体を投与した。各マウスからの肝臓を製造業者の指示に従ってプロテオエクストラクト (登録商標) ネイティブ膜タンパク質抽出キット (Calbiochem) を用いて回収した。溶解物を8%ビスートリスゲル上でSDS-PAGEによって分析した。タンパク質はiBlot (登録商標) (Invitrogen) を用いてニトロセルロース膜に移した。膜を1時間、5%脱脂乳でブロッキングした後、4℃で一晩、5%脱脂乳中で1:500抗LDLR (Abcam) と共にインキュベートした。翌日、膜を、TBS-Tで3回洗浄し、1時間1:5000抗ウサギHRP (GE Healthcare) と共にインキュベートし、TBS-Tで3回洗浄した。タンパク質はECL-Plus (GE Healthcare) を使用して可視化し、XARフィルム (Kodak (登録商標)) に暴露した。抗LDLR抗体によるウエスタンブロットは、すべての5つの抗PCSK9抗体 (508.20.84、508.20.33b、508.2004b、508.20.28b、508.20.06) が、マウスの肝臓でLDLRダウンレギュレーションを防いだことを示している。図7を参照。

20

30

【0241】

実施例7: 抗PCSK9抗体の薬物動態

マウスPK試験サンプル中の抗PCSK9抗体濃度は、抗ヒトIgGのFc ELISAを用いて測定した。簡潔には、ロバ抗ヒトIgG Fc (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) をアッセイプレートコーティングに使用し、ヤギ抗ヒトIgGのFc HRPコンジュゲート (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) を検出抗体として用いた。アッセイは、0.31-20 ng/mLの測定範囲を持つマウス血清マトリクスの10%まで、抗PCSK9抗体を測定することができた。図8及び図9を参照。

40

【0242】

カニクイザルのPK研究サンプルの血清抗PCSK9抗体濃度を、捕獲抗体として組換えヒトPCSK9 (Genentech, Inc., South San Francisco, CA) を、そして検出抗体としてヤギ抗ヒトIgG (H+L) HRPを用いる抗PCSK9抗体ELISAにより決定した。アッセイは、0.313-50 ng/mLの測定範囲を持つカニクイザル血清マトリクスの2%まで、抗PCSK9抗体を測定することができた。図10及び図11を参照。

【0243】

実施例8: 抗体は、マウスにおける血清コレステロールレベルを下げる

50

8週齢の雄性C57BL/6Jマウスはジャクソン研究所から市販で購入した。マウスは、実験開始前まで保持室で一週間箱におかれていた。全てのマウスは麻酔下で事前に採血し、INFINITYTM コレステロール試薬 (Fisher Diagnostics, Middletown, VA) を使用して、マウスからの総コレステロールを測定した。マウスは、平均的なコレステロールレベルと同じレベル持つ6つのグループに無作為化された。全てマウスは、コントロール抗体または抗PCSK9抗体のいずれかを10mg/kg体重の単回投与を受けた。マウスは3日、7日、10日、及び15日に採血され血清総コレステロールレベルがINFINITYTM コレステロール試薬 (Fisher Diagnostics, Middletown, VA) を使用して測定された。

【0244】

全抗PCSK9抗体 (508.20.04b、508.20.06、508.20.28b、508.20.33b、508.20.84) が10mg/kgの単回用量を投与されると、総コレステロールレベルの減少を示した。抗PCSK9抗体の投与は、コントロール抗体を受けるマウスに比較したとき、3日めに於いて及び最大10日まで総コレステロールレベルの著しい減少を生じた。図12を参照。

【0245】

実施例9：スタチンの有効性の増強

この実験は、抗PCSK9抗体とスタチンの併用は、抗PCSK9抗体単独またはスタチン単独の治療法に比べて総コレステロールレベルの大きな減少をもたらすことを実証している。例えば図13を参照。8週齢の雄性C57BL/6Jマウスはジャクソン研究所から購入した。マウスは、2つの異なるグループに分類された。非スタチンマウスは、コントロールの食餌を受けたが、一方スタチンのグループは抗体投与前2週間、食餌に0.2%のロバスタチンを受けた。全てのマウスは事前に採血され、マウスは等しい平均コレステロールレベルに基づいて無作為化した。マウスは3日に採血され、血清総コレステロールレベルがINFINITYTM コレステロール試薬 (Fisher Diagnostics, Middletown, VA) を使用してアッセイされた。

【0246】

抗PCSK9抗体は著しくコレステロールを下げる効果を示した。スタチン単独の治療では、非スタチン群に比べて、総コレステロール値の適度の減少をもたらした。スタチンプラス抗PCSK9抗体の組み合わせは、抗PCSK9単独に比べて、総コレステロール値の更なる低下をもたらした。図13を参照。

【0247】

実施例10：抗PCSK9抗体のFab断片に結合したPCSK9のX線結晶構造タンパク質の精製と結晶化

10L大腸菌発現からの凍結細胞ペーストの210gを、1Lの溶解緩衝液 (PBS/25mM EDTA/1mM PMSF) で解凍した。細胞をTissue mixerにより破壊し (30秒)、得られたスラリーをマイクロフルイダーに2回通過させた。不溶物を遠心分離によりペレット化した。明白なライセート (一度に250mL) を5mL/分で、プロテインGカラム (カタログ番号17-0618-05、GE Healthcare) にロードした。次いで、カラムを溶解緩衝液100mLで洗浄し、150mLの溶出緩衝液 (0.58g% 酢酸) で抗PCSK9抗体の結合したFab断片を溶出した。25mLの画分を溶出中に収集した。抗PCSK9抗体のFab断片を含む画分をSDS-PAGE解析後にプールした。

【0248】

5mLのプレバックSHPHカラム (GE Healthcare, カatalog# 17-1152-01) が50mLのバッファーA (20mM MES pH5.5) で平衡化された。前の工程からのプール画分を3mL/分でカラムにロードした。カラムをバッファーAでベースラインまで洗浄した。結合したFab断片は、20カラム体積中で0%から100%のバッファーB (20mM MES pH 5.5, 1M NaCl) の勾配を用いてバッファーBで溶出した。2mLの画分を溶出中に収集した。(SDS-PAGE

10

20

30

40

50

G Eを用いて決定された) タンパク質を含む画分を、プールし、5 mLまで濃縮し、サイジング緩衝液(20 mM H e p e s 7. 2, 150 mM N a C l)で事前平衡化した320 mLのS75ゲル濾過カラムにロードした。2 mLの画分を集めながら、サイジング緩衝液は220分間1. 5 mL/分で連続的に流された。ピーク画分(A280)を、S D S - P A G Eを用いて分析した。

【0249】

ヒスチジン(H i s) 8 C末端タグを含有するヒトP C S K 9相補デオキシリボ核酸(c D N A)(配列番号32)を、標準的な分子生物学技術を用いて、サイトメガロウイルス(C M V)プロモーターと共に哺乳動物発現ベクター(p R K 5)に挿入した。タンパク質は、チャイニーズハムスター卵巣(C H O)細胞の一過性トランスフェクションによって発現され、ニッケル-ニトリロアガロースカラム(Q i a g e n)でのアフィニティークロマトグラフィーを用いて条件培地から精製され、その後セファクリル(登録商標)S-200カラム(G E H e a l t h c a r e)でゲル濾過した。精製タンパク質の正確な質量は、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動(S D S - P A G E)によって確認し、アミノ酸配列の精度はN末端配列決定により確認した。

【0250】

抗P C S K 9抗体の精製F a b断片及び6. 8 mgのP C S K 9タンパク質を、F a b断片の2倍モル過剰で混合し、4℃で1時間インキュベートし、その後5 mLまで濃縮した。濃縮された混合物を、次いで、サイジング緩衝液で予め平衡化したスーパーデックス200サイズ排除カラム(カタログ番号17-1071-01、G E H e a l t h c a r e)にロードした。2 mLの画分を集めながら、サイジング緩衝液は220分間1. 5 mL/分で連続的に流された。P C S K 9及び抗P C S K 9抗体のF a b断片の両方を含むピーク画分(A280)(S D S - P A G E)をプールし、20ミリグラム/mLまで濃縮した。濃縮された複合体を結晶化試験を設定するために用いた。初期結晶は、タンパク質と、シッティングドロップを使用してp H 7で1. 3 Mのリン酸カリウム/ナトリウムを含むリザーバーの間での1:1混合物から形成された。結晶は、ハンギングドロップ中でタンパク質:リザーバー比を変えることにより最適化した。選択された結晶は、25%グリセロールを補充した母液で処理され液体窒素に貯蔵した。

【0251】

P C S K 9: 抗P C S K 9抗体F a b断片の複合体の構造決定

約3. 5 Åの分解能まで伸びた回折データは、シンクロトロンビームラインS S R L 7-1で収集され、積分され、空間群I 2 2 2にスケールされた。近似位相は、P C S K 9の以前に報告された構造(Hamptonら、PNAS 104:14609-9(2007)、p d b 受託コード 2 Q T W)及び抗体のF v断片の以前に報告された構造(Eigenbrotら、J Mol Biol 229:969-95(1993)、p d b 受託コード 1 F V C)を用いて、分子置換法により得られた。抗P C S K 9抗体のF a b断片の定常領域は、部分的な精密化が位相を改善した後、以前に報告された相同構造の一部を用いて(Eigenbrotら supra, p d b a c c e s s i o n c o d e 1 F V D)剛体として配置した。最終の精密化構造は結晶学的R値が25%及び30%である。データ収集と精密化の統計値を以下の表1に示す。

表1

データ収集

空間群 I 2 2 2

格子定数 (Å)

a = 92. 283、b = 142. 523、
c = 253. 983

V_M (Å³/ダルトン)

2. 8

分解能 (Å)

40-3. 5 (3. 63-3. 50)

R s y m^a, b

0. 184 (0. 807)

測定された反射数

157526

独立な反射数

21579

完全性 (%)^b

100 (100)

10

20

30

40

50

$I / \sigma I^b$	1 1 (2 . 6)
ウィルソン B ($\text{\AA}^2$)	5 8
<u>精密化</u>	
分解能	($\text{\AA}$) 4 0 – 3 . 5
反射数	2 0 6 4 4
($F > 0 \sigma (F)$)	
最終の R^c 、 $R_{F R E E}$	0 . 2 4 7 , 0 . 2 9 5
複合体／非対称単位	1
タンパク質残基	9 9 4
溶媒分子	0
原子数	7 4 6 3
平均 B - f a c t o r ($\text{\AA}^2$)	8 6
R m s d 結合 ($\text{\AA}$)	0 . 0 0 7
R m s d 角度 ($^\circ$)	1 . 1
R m s d 結合した B ($\text{\AA}^2$)	2 . 4 / 1 . 9
T L S グループの数	4
ラマチャンドラン (%)	8 1 . 5 / 1 6 . 8 / 0 . 6 / 1 . 1

10

^a $R_{sym} = \sum ||I| - \langle I \rangle| / \sum \langle I \rangle$ 、ここで、 I は単一観測の強度、 $\langle I \rangle$ は対称による等価な観測の平均強度

20

^b 括弧内、最高分解能のシェル。

^c $R = \sum |F_o - F_c| / \sum |F_o|$ 、ここで、 F_o 及び F_c は、それぞれ観測された、及び計算される構造因子振幅。 $R_{F R E E}$ は、精密化から隔離された反射を R として計算される。

【0252】

X線構造からのPCSK9上のエピトープの決定

4 $\text{\AA}$ の基準を、分子解析プログラムPyMOLを用いて適用した。抗PCSK9抗体のFab断片の任意の部分の4 $\text{\AA}$ 以内PCSK9残基をエピトープとして決定した。解析に基づき、エピトープは、次の残基の1つ又は複数を含む：ヒトPCSK9のR194、E195、D238、A239、A341、Q342、E366、D367、I369、S376、T377、C378、F379、S381及びH391。

30

【0253】

実施例11：ヒト臨床試験、単回及び複数回投与の漸増用量

高血清で低密度リポタンパク質コレステロール(LDL-c)の濃度を有する健康なボランティアに、単回投与及び反復投与(4週間ごと)で皮下(SC)注射によって投与された試験薬(配列番号35を伴う重鎖、及び配列番号36を伴う軽鎖を有するヒトIgGに再編成されたYW508.20.33b)の安全性及び忍容性を主に評価するため、無作為化二重盲検、プラセボ対照、単回投与及び反復投与試験を行った。高血清LDL-c濃度(130~220mg/dL未満)の80例の健康成人ボランティア(男女)を、それぞれ8例の被検体を含む10のコホートに無作為化した。各コホートの被検体は、試験薬投与群又はプラセボ投与群(1つのコホートにつき、6例の活性剤及び2例のプラセボ剤の被検体)のいずれかに無作為に割り付けた。

40

【0254】

図14及び表2に示すようにコホートに投与した。通常は、シリンジを使用して、全ての用量を腹部又は太ももに皮下投与した。薬物製品は、200mMのアルギニンコハク酸、0.02%のポリソルベート20、pH5.5で、150mg/mLの抗体として製剤化された。複数回投与コホートの場合は、試験薬は、4週連続で1週間に一回投与した。スタチンコホート(H及びI)は、最初に、少なくとも7日間にわたって1日一回アトルバスタチン20mgを経口投与し、その後、安全性及び忍容性の評価を行った。20mgの用量で良好な耐容性があった場合、1日目の試験薬開始に先立って、投与量は1日あた

50

り 40 mg まで増量し、21 日以上継続した。コホート H 及び I の被検体は、35 日目を含め、当日までアトルバスタチン（毎日 40 mg の経口投与）を継続した。試験中の任意の時点で、直接法の LDL-c 値が 25 mg/dL を下回った全ての被検体は、治療を中止した。

表 2 試験薬の用量コホートの概要

コホート	用量 (mg)	投与総量	フォローアップ期間 ^a	アトルバスタチン
A	10	1	8 週間	なし
B	40	1	8 週間	なし
C	150	1	12 週間	なし
D	300	1	12 週間	なし
E	600	1	16 週間	なし
F	40	4	16 週間	なし
G	150	4	16 週間	なし
H	40	4	16 週間	あり
I	150	4	16 週間	あり
J	800	1	16 週間	なし

a = 試験薬の初回投与と最終試験来院との間の時間。

【0255】

被検体は、試験薬の投与開始後 8 週間から 16 週間、頻繁に安全性、PK 及び PD の評価についてフォローされた。以下のデータを評価した。：安全性転帰（有害事象、血液学的異常、臨床化学検査及び尿検査、並びに抗治療抗体の発生率、薬物動態（PK）プロフィール（最高血中濃度、見かけの血清総クリアランス（CL/F）、見かけの分布容積（V/F）、総曝露量（AUC）、最高血中濃度到達時間、半減期、並びに用量比例性（AUC に基づく）を含める）、薬力学的転帰（単回投与コホートの 15 日目及び複数回投与コホートの 36 日目での LDL-c における、ベースラインからの減少率並びに絶対的減少）、並びに、総コレステロール、LDL-c、HDL-c、非 HDL-c、トリグリセリド、脂質粒子サブフラクションにおける、ベースラインからの経時的な減少率並びに絶対的減少。

【0256】

試験の初期の結果からは、薬物関連で、臨床的に有意な有害事象のパターンは確認されていない。重篤又は重度の有害事象、有害事象のための中止、用量制限毒性は認められなかった。試験の用量について、最大許容用量は定義されていない。中程度の有害事象が 2 例報告されている：頭痛 1 例（10-mg の単回投与コホートで試験薬を投与された被検体）及び橈骨骨折 1 例（試験 600-mg 単回投与コホートで試験薬を投与された被検体）。試験薬治療被検体 5 例は、全て複数回投与コホートであり、アトルバスタチンを併用投与されていたが、LDL-c 値が、プロトコルが指定した閾値の 25 mg/dL を下回ったため、試験薬治療を中止した。これらの被検体には関連する有害事象は認められなかった。

【0257】

図 15（左のパネル）に示すように、10 mg から 600 mg までの試験薬に対する暴露において用量依存的な増加があった。PK において、スタチン投与群と非処理群との間に差は認められなかった（図 15、右のパネル）。Km が 5.94 ug/mL のとき、試験薬の飽和クリアランスがあった。

【0258】

図16～19並びに表3及び4に示すように、試験薬は、単独及びスタチンとの併用で、健康なボランティアにおいて臨床的に重要なLDL-cの削減をもたらした。薬力学的(PD)データはLDL-cの用量依存的な減少を見せ、10mgの単回投与コホートを除く全てのコホートにおいて、統計的に有意であった。LDL-cは、最高用量群(単回投与コホートにおける300～800mg)では、160～170mg/dLの平均ベースラインLDL-cから、80～90mg/dL減少した。LDL-c値における同様の減少は、アトルバスタチン(コホートH及びI)と非スタチンコホート(コホートF及びG)との間で見られた(図18及び19並びに表3及び4参照)。コホートI及びG(10日目)、並びにF及びH(36日目)との間の差は統計的に有意ではない。図16及び図17に示すように、 ≥ 300 mgの用量で、LDL-cの効果が最大のように見えるが、効果の持続時間は延長する。データは、毎月又はそれより少ない頻度での投与をサポートしている。

表3 単回投与及び反復投与コホートにおける、LDL-c値のベースラインからの絶対変化

	LDLの変化量の平均（標準偏差）（mg / dL）		
群	活性剤	プラセボ	P値 ^a
単回投与（15日目）			
A（10mg）	－18（21）	－5.6（15）	0.22
B（40mg）	－45（32）		0.03
C（150mg）	－61（17）		<0.001
D（300mg）	－88（28）		<0.001
E（600mg）	－82（22）		<0.001
J（800mg）	－91（14）		<0.001
複数回投与（36日目）			
F（40mg×4）	－50（28）	－9.7（13）	0.016
G（150mg×4）	－71（26）		0.001
H（A ^b ＋40mg×4）	－38（10）	－5（14）	0.009
I（A ^b ＋150mg×4）	N／A ^c	－15（21）	N／A ^c

a = コホートI及びG(10日目)とF及びH(36日目)との間の差は統計的に有意ではない。b = Aは、アトルバスタチン c = コホートI(150mg×4+アトルバスタチン)の複数の被検体は、プロトコルの閾値の25mg/dLを下回るLDL値のため、10日後に中止された。

表4 単回投与及び反復投与コホートにおける、ベースラインからのLDL-c値の変化率

		LDLにおける平均変化率 (%)	
群	活性剤	プラセボ	P 値
単回投与 (15日目)			
A (10mg)	-9.4 (11)	-3.7 (10)	0.3
B (40mg)	-23 (12)		0.008
C (150mg)	-37 (11)		<0.001
D (300mg)	-53 (10)		<0.001
E (600mg)	-51 (18)		<0.001
J (800mg)	-58 (4)		<0.001
複数回投与 (36日目)			
F (40mg×4)	-34 (19)	-6.2 (8)	0.016
G (150mg×4)	-49 (10)		0.001
H (A ^a +40mg×4)	-48 (17)	-5.7 (16)	0.005
I (A ^a +150mg×4) (10日目)	-65 (13)	-12 (24)	0.014

a = Aは、アトルバスタチン

10

20

30

【0259】

実施例12：冠動脈性心疾患（CHD）患者、又はCHDのリスクが高い患者におけるヒト臨床試験

試験薬（配列番号35を有する軽鎖、並びに配列番号36を有する重鎖を持つヒトIgG1に再フォーマットされたYW508.20.33b）のランダム化プラセボ対照二重盲検試験は、LDL-c値が90～250mg/dLの患者、並びに冠動脈性心疾患（CHD）又はCHDリスク相当の患者のいずれかにおいて、スタチンの標準治療（SOC）に加えて試験薬の安全性と有効性を評価するために実施される。以下の表5に示すように、血清LDL-C濃度が90～250mg/dLの患者（成人男性および女性）約224例及びCHD又はCHDリスク相当の患者のいずれかを、5つの試験群いずれかにランダム化し、試験薬又はプラセボを投与する。シリンジを使用して、全ての用量を皮下投与する。薬物製品は、200mMのアルギニンコハク酸、0.02%のポリソルベート20、pH5.5で、150mg/mLの抗体として製剤化される。

表5 試験薬の用量コホートの概要

群	試験薬の用量レジメン		予定患者数	
	用量 (mg)	頻度 (週)	活性剤	プラセボ
A	400	4	56	—
B	200	8	14	—
C	400	8	28	—
D	800	8	56	—
E	800	12	14	—
F	プラセボ	—	—	56
(A-F) 計	—	—	168	56

10

【0260】

本試験では、スクリーニングのための連続した期間（04週間）、導入期間（06週間、必要に応じて）、治療期間（24週間、1日目～169日目）、及びフォローアップ期間（12週間）が含まれる。フォローアップ期間最終日（253日目）での試験完了の来院は、試験薬の最終投与（141日目）の16週間後に発生する。スタチンへの忍容性がない場合を除き、全ての患者が、治療の割り当てに関係なく、スタチンを含むSOC治療を受ける。全ての患者は治療期間及びフォローアップ期間を通して、導入期間中及び登録時に受けていた同じ用量で、SOCスタチン療法を継続する。他の処方及び市販薬の（OTC）脂質修飾療法が許可されていない。スクリーニングの時点で安定した用量のSOCスタチン療法を受けており（又はスタチンなし及び2種類以上のスタチンに忍容性なしと診断された）、脂質修飾治療を少なくとも4週間（又はフィブラートの場合は6週間）受けていなかった患者は、導入期間を必要としない。

20

【0261】

患者は、169日目でのLDL-cの濃度のベースラインからの絶対変化に基づく有効性を決定するため、モニターされる。さらに、患者は、その群の最下点での各群のLDL-c濃度のベースラインからの絶対変化；169日目までの、連続したLDL-cの測定値の間での、週数で加重した、各群のLDL-cの変化の経時的な平均値（ベースラインからの変化率及び絶対変化）；169日目での各群の最下点でのLDL-c濃度のベースラインからの変化率（%）；他のすべての指定された時点でのLDL-c濃度のベースラインからの変化率及び絶対変化；並びに、169日目及び各群の最下点での総コレステロール、非HDL-c、及びアポリポタンパク質Bにおける、ベースラインからの変化率及び絶対変化を含む有効性の副次的評価項目を決定するため、モニターされる。最終的に、患者はまた、発生率、性質、及び有害事象の重篤度；発生率及びバイタルサインの変化の性質、身体所見、並びに試験薬投与中及び投与後の臨床検査結果；並びに試験薬に対する抗治療抗体の発生率を含む安全性についてモニターされる。

30

40

【0262】

低LDL-c値の安全性は、盲検、探索試験において定期的に評価する。2回連続でLDL-c値が15mg/dLの患者は、試験薬の投与は控える。これは有害事象とは見なさない。このような患者は、盲検法で、LDL-c $\geq$ 50mg/dLに増加するまで、代わりにプラセボを投与し、その後、これらの患者は、最も低い用量（8週間ごとに200mg）に切り替える。活性薬剤又はプラセボの全ての用量は、試験薬の投与スケジュールに従って投与される。すなわち、1日目、29日目（ $\pm$ 2日）、57日目（ $\pm$ 2日）、85日目（ $\pm$ 2日）、113日目（ $\pm$ 4日）、及び141日目（ $\pm$ 4日）のみである。

【0263】

50

有効性の主要評価項目は169日目でのLDL-cのベースラインからの変化量である。ベースラインLDL-cは試験薬の初回投与前に収集され、最後の2つの測定値の平均として定義される。試験薬投与の間及び試験薬とプラセボの投与量のそれぞれとの間の治療の比較は、2つの共変量、すなわち、ベースラインLDL-cの濃度($<120\text{ mg/dL}$ 、 $\geq 120\text{ mg/dL}$)及び糖尿病状態(はい、いいえ)を調整した線形回帰モデルを通して実施される共分散の分析(ANCOVA)に基づく。信頼区間、並びにANCOVAモデルからの最小二乗推定値は、試験結果の解釈を助けるために使用される。

【0264】

適格基準は、欧州心臓病学会(ESC)/欧州動脈硬化学会(EAS)及び全米コレステロール教育プログラム成人治療パネルIII(NCEP ATP III)脂質低下のガイドラインリスクカテゴリに基づいて、心血管及びCHDリスクの高い患者の母集団を定義する。本試験は、これらのガイドラインに従って、治療標的がLDL-c値 70 mg/dL であるが、SOCのスタチン療法にもかかわらず、スタチンに忍容性がないか、又はSOCが不十分であるかのいずれかのため、この目標を達成できなかった患者を有資格者として登録することを目的とする。これらの患者は、更なる安全かつ効果的なLDL-c低下治療を必要としている。

【0265】

CHDとは心筋梗塞の病歴が確認されていること、すなわち、過去に冠動脈血管再生手術(経皮的冠動脈インターベンション又は冠動脈バイパス移植)を受けたか、又は過去に冠動脈造影検査(侵襲的冠動脈造影検査又は心臓コンピュータ断層撮影冠動脈造影検査)で少なくとも一つの $\geq 50\%$ 直径狭窄の冠動脈アテローム性動脈硬化病変を示したことを指す。

【0266】

CHDリスク相当の条件は、以下の少なくともいずれか1つである。

1. 臨床的アテローム性動脈硬化症の1つ又は複数の形態：

a. 末梢動脈疾患(足関節/上腕血圧指数 0.85 の診断歴、経皮的又は外科的末梢動脈血管再生術の既往、末梢動脈疾患による下肢の非外傷性切断の既往、又は血管造影での $\geq 50\%$ 直径狭窄の既往)、

b. 頸動脈疾患(画像での $\geq 50\%$ 直径狭窄を有する頸動脈アテローム性動脈硬化病変の診断歴、又は皮膚又は外科頸動脈血行再生手術の既往、

c. 試験責任医師の意見において、心臓由来の塞栓症(例えば、心房細動、弁膜症、又は左室壁血栓)に起因していない、CT又はMRI脳画像による虚血性脳卒中の診断歴、又は、

d. 外科的修復又は血管内修復に伴う腹部大動脈瘤の既往。

2. 2型糖尿病。

3. 標的臓器障害(試験責任医師によって診断された、網膜症、神経障害、又は微量アルブミン尿を含む腎症)を合併した1型糖尿病。

4. 中等度から重度の慢性腎臓病(スクリーニング検査を含め、常にMDRD式を使用して、少なくとも3ヶ月に及ぶ、少なくとも3回にわたる測定で、推算糸球体濾過量が $1560\text{ mL/分/1.73 m}^2$ を示した)、又は

5. 下記の二つ以上のCHDの危険因子、及びCHDイベントの20%の10年絶対リスク(全米コレステロール教育プログラム成人治療パネルIIIガイドライン改訂版のフラミンガムリスクスコアによって決定される)又は最初の致命的なアテローム性動脈硬化症のイベントの10年リスク $\geq 10\%$ (系統的冠動脈リスク評価によって決定される)のいずれか：

a. 年齢 男性 ≥ 45 歳、又は女性 ≥ 55 歳、

b. 現在の喫煙(1ヶ月以内)、

c. 高血圧(スクリーニング時に収縮期血圧が 140 mmHg 、拡張期血圧が 90 mmHg 、又は高血圧症を治療するための降圧薬を服用していること。)

d. 低HDLコレステロール(40 mg/dL)、又は

e. 早期CHDの家族歴（一親等者が男性は55歳、女性は65歳で、心筋梗塞又は冠動脈血管再生手術歴あり）

【0267】

標準治療のスタチン治療は、以下の条件のいずれかを治療が満たすことを指す。（1）高用量のシンバスタチン（40mgを毎日）、アトルバスタチン（40～80mgを毎日）、又はロスバスタチン（20～40mgを毎日）、（2）低用量のシンバスタチン、アトルバスタチン、又はロスバスタチン及びそのスタチン又は他のスタチンに対する任意の用量、高用量に対して忍容性ありとの診断、（3）他のスタチン（任意の用量）及びシンバスタチン、アトルバスタチン、又はロスバスタチン（任意の用量）に対して忍容性ありとの診断、又は（4）スタチンなし、及び少なくとも2つのスタチン（任意のスタチン、任意の用量）に対して忍容性ありとの診断。

10

【0268】

糖尿病の状態は、患者の医療記録又は病歴、又は検査結果のスクリーニングに従い、次のいずれかの有無に基づいて決定する：（1） $HbA_{1c} > 6.5\%$ 、（2）空腹時血漿グルコース $\geq 126\text{mg/dL}$ （ 7.0mmol/L ）、（3）経口ブドウ糖負荷試験中（試験は、世界保健機関によって記載されるように、水に溶解した無水グルコース75gに相当するものを含むグルコース負荷を用いて行われるべきである）、2時間より前の血漿グルコース $\geq 200\text{mg/dL}$ （ 11.1mmol/L ）、又は、（4）現在、糖尿病を診断するための経口又は注射療法。

【0269】

20

実施例13：安定した、高濃度の抗体配合剤の開発

pH5.5で、200mMのアルギニンコハク酸、0.02%（w/v）のポリソルベート20において150mg/mL抗体で製剤化した抗PCSK9抗体の製剤（配列番号35を有する軽鎖、並びに配列番号36を有する重鎖を持つヒトIgG1に再フォーマットされたYW508.20.33b）を使用して、初期の臨床試験（実施例11及び12を参照のこと）を行った。しかし、毎月又はそれより少ない頻度で送達されうる、更に高い用量の皮下投与を容易にするため、更にタンパク質濃度が高く（ $\geq 200\text{mg/mL}$ ）、安定性が向上した製剤が望まれた。

【0270】

抗PCSK9製剤の粘度

30

200mMのコハク酸アルギニン、0.02%のPS20（w/v）、pH5.5の抗PCSK9製剤の粘度は、様々なタンパク質濃度で評価した。粘度はレオメーター（アントンパール社のPhysica MCR501）を使用して、各タンパク質濃度で、1000 1/sの剪断速度で、5、15、25及び40℃で測定した。

【0271】

粘度は、薬剤溶液の皮下投与の重要なパラメーターである。シリンジを使用した皮下投与に望ましい粘度限界は、周囲温度で、10cP未満である。200mMのアルギニンコハク酸、0.02%のPS20（w/v）、pH5.5の100～300mg/mLでの抗PCSK9の粘度は、表6に示されている。抗PCSK9については、粘度は、タンパク質濃度及び温度に依存する。タンパク質濃度が増加すると、粘度も増加する。しかし、各濃度で、粘度は温度を上昇させることによって低下させることができる。200mg/mLの上でタンパク質濃度を増加させることによって、抗PCSK9の粘度は指数関数的に増加した（図20）。したがって、200mg/mLでの抗PCSK9を標的濃度として選択した。

40

表6 100mg/mLから300mg/mLまでの抗体濃度に対する抗PCSK9の粘度

温度 (°C)	粘度 (cP) ¹						
	100mg/ mL	150mg/ mL	200mg/ mL	225mg/ mL	250mg/ mL	275mg/ mL	300mg/ mL
5	4.6±0.27	8.0±0.16	18.6±0.17	50.2±0.99	76.9±0.83	306±5.8	603±9.2
15	3.1±0.10	5.2±0.08	11.7±0.15	31.9±0.33	46.7±0.91	179±2.8	357±4.8
25	2.5±0.06	3.8±0.09	8.3±0.13	22.6±0.14	31.0±0.84	115±0.6	225±4.1
40	1.8±0.01	2.7±0.10	5.7±0.26	15.5±0.2	18.8±0.63	74.8±4.3	135±3.2

¹ 200mMアルギニンコハク酸、0.02% PS20、pH5.5

【0272】

攪拌試験

攪拌試験は、200mMのアルギニンコハク酸、pH5.5において、150mg/mLの抗PCSK9の凝集を防止又は最小化するために必要とされる界面活性剤の最小量を評価するために行った。ポリソルベート20 (PS20) は、0.01、0.02、0.04、0.06、0.08、0.1% (w/v) の濃度を達成するように製剤に添加された。全てのサンプルは滅菌濾過し、そして各サンプル0.5mLを、2ccのガラスバイアルに充填した。サンプルは、室温で24時間 (RT)、11cmのサンプル変位を50サイクル/分に設定したGlass-Column社のベンチトップ型シェーカーを用いて攪拌した。対応する構成で適切なサンプルコントロール (攪拌なし) は、シェーカーの同じ近傍に配置した。全てのサンプルは、340~360nmの吸光度 (abs) でのUV測定によるサイズ排除クロマトグラフィー (SEC)、濁度によって分析した。

【0273】

結果を図21に示す。製剤中のPS20がなければ、攪拌していないコントロールバイアルと比較した場合、24時間 (室温) 攪拌したサンプルは、明白な変化がみられた。攪拌したサンプルは濁度の増加を伴う乳白色の外観を呈し、SECのメインピークは6%減少した。≥0.01%のPS20の製剤への追加によって、バイアル内でのコントロール (攪拌なし) と攪拌されたサンプルとの間で、SEC及び濁度測定で差は認められなかった。これらの結果は、0.01%のPS20の使用は、200mg/mLの抗PCSK9の攪拌によって誘導される凝集体の形成を防止するのに十分であったことを示唆している。しかし、0.02%のPS20の濃度は、製品保存中の界面活性剤の潜在的劣化を考慮して目標濃度として選択した。

【0274】

抗PCSK9製剤の酸化電位

抗PCSK9の酸化はトリプシンペプチドマップによって決定し、酸化の部位 (単数又は複数) は、LC-MSにより特徴付けた。抗PCSK9の酸化は、過酸化水素、2,2'-アゾビス (2-アミジノプロパン) 二塩酸塩 (AAPH) のような高温、光、酸化剤によって誘導した。酸化サンプルを調製するための劣化条件を表7にまとめる。これらの酸化された抗PCSK9サンプルはまた、実施例3に記載したように、低密度リボタンパク質受容体ドメインのFc (LDLR_D-Fc) との融合タンパク質に結合するPCSK9を阻害する能力を測定することにより、酸化による可能効力損失を評価した。

【0275】

ペプチドマッピングについては、サンプルを、1Mのジチオトレイトールで還元し、2

10

20

30

40

50

． 9 M のヨードアセトアミドでアルキル化し、そしてバッファは消化の前に交換した。トリプシンは、酵素：タンパク質比が 1：25 の酵素を用いて、37℃で 1.5 時間の消化に使用した。消化は、最終 pH が 2～3 の 10% トリフルオロ酢酸 (TFA) でクエンチした。得られたペプチドの消化混合物は、LTQ Orbitrap XL を用いて、逆相液体クロマトグラフィー／質量分析法 (LC-MS) により分析した。ペプチドマップは、55℃に維持した Phenomenex Jupiter C18 カラムと共に、0.25 mL/分で 160 分間にわたって、0 から 40% のリニアグラデーションを使用した。移動相 A 及び B は、それぞれ 0.1% TFA 水溶液、及び 0.09% TFA アセトニトリル溶液からなる。ペプチドはまた、MS 分析の前に 214 及び 280 nm abs で検出された。LC-MS のデータは、ペプチド及び抗 PCSK9 の各酸化部位を同定するために Mascot 社のソフトウェアによって処理した。Trp 及び Met は、複数の酸化生成物及び／又は酸化状態を作り出すため、サンプル中の酸化量は、「部位ごとの全酸化」又は累積酸化として表した。

【0276】

メチオニン (Met/M) 及びトリプトファン (Trp/W) は、容易にタンパク質薬剤製品に酸化される、2 つの一般的なアミノ酸残基である。W₉₉ 及び M₁₀₈ は、重鎖の相補性決定領域 (CDR) I I I、及び CDR に隣接する 3 つの Trp 残基 (W₃₆、W₁₁₁ 及び W₄₈₆) に位置し、抗 PCSK9 の潜在的な酸化部位である。これらのアミノ酸残基の酸化は、それらが CDR の近くであることにより、薬効が失われる可能性がある。劣化したサンプルのペプチドマッピング分析は、抗 PCSK9 の酸化は主に M₂₅₆、M₃₆₂、M₄₃₂ 及び Fc 部分の M₄₅₅ 残基 (図 22) で発生したことを明らかにした。抗 PCSK9 を光 (室内又は UV) に曝露し、H₂O₂ 及び AAPH などの酸化剤によって劣化した場合、CDR 中又は CDR に隣接する Met 又は Trp の残基部位ごとの酸化の相対量は 3% 未満であり、効力に有意な影響はなかった (図 23)。したがって、抗 PCSK9 は酸化の影響を受けにくく、タンパク質薬剤中での酸化防止剤の使用は必要ではないと考えられている。

表 7 酸化分析についての抗 PCSK9 の劣化条件

劣化モード	曝露条件	予想される劣化
熱	2 週間 @ 40℃	酸化
光源	室内光で 24 時間	光酸化
	120 万ルクス・時間	
酸化剤	1000 ppm の H ₂ O ₂ (24 時間 @ 5℃)	メチオニン酸化
	5 mM の AAPH (24 時間 @ 40℃)	メチオニン+トリプトファンの酸化

【0277】

pH プロフィール及び賦形剤の試験

抗 PCSK9 における、200 mg/mL のタンパク質濃度での製剤 pH 及び賦形剤の効果を評価した。40℃での加速安定性 (表 8 を参照) 並びに 5℃及び 25℃での粘度 (表 9 を参照) について、アルギニンコハク酸、緩衝種としてのヒスチジン塩酸塩又はヒスチジン酢酸、及び可溶化剤としてのアルギニン塩酸塩又はアルギニンアセテートを含む、pH が 5.0 から 6.5 の範囲の製剤を評価した。以下のアッセイを評価に用いた。SEC、イオン交換クロマトグラフィー (IEC)、キャピラリー電気泳動-硫酸ドデシルナトリウム及び効力計 7 つの製剤を評価した。

【0278】

IEC は、Agilent 1100 HPLC で実施し、移動相 A (20 mM の HE

P E S、p Hは7. 9) グラジエント1 %～3 4 %の移動相B (2 0 m MのH E P E S、1 0 0 m MのN a C l、p Hは7. 9) で、0. 9 m L / 分の流速で5 0 分間、D i o n e x 社 P r o P a c T M W C X - 1 0 カラム (4 × 2 5 0 m m) を使用した。カラムは3 5 °Cに維持した。サンプル負荷は4 0 gであり、分離は2 8 0 n m a b sでモニターした。

【0279】

p Hの影響

2 0 0 m g / m Lでの2 0 0 m Mのアルギニンコハク酸、0. 0 2 %のP S 2 0における抗P C S K 9の安定性に対するp Hの影響は、p H 5. 0、5. 5及び6. 0から評価した。S E C、I E C及びC E - S D Sで分析したように、5. 0から6. 0の製剤のp Hを増加させることは、4 0 °Cで1 ヶ月後の抗P C S K 9の安定性を増加させた。p Hは5. 0及び5. 5と比較すると、I E Cによって決定されるようにp H 6. 0での製剤は、より少ない酸性及び塩基性ピークの形成を示した。p H 6. 0の製剤はまた、S E Cにより決定される高分子量種 (H M W S)、S E C及びC E - S D Sの両方によって決定される低分子量種において減少していた。p H 6. 5での製剤については、抗P C S K 9は、2 0 m Mのヒスチジン塩酸塩、1 6 0 m Mのアルギニン塩酸塩及び0. 0 2 %のP S 2 0において、2 0 0 m g / m Lで製剤化された。p H 5. 0から6. 5での、全ての製剤について、4 0 °Cでの抗P C S K 9の劣化速度は、表9に示されており、I E C及びS E Cについてのp H速度プロファイルは、図2 4に示されている。p Hの速度プロファイル及び分解速度に基づいて、目的とするp Hは6. 0を選択した。

表8 様々な製剤における2 0 0 m g / m Lでの抗P C S K 9の粘度

製剤	緩衝液：	安定化剤／賦形剤	p H	粘度 (c P)	
				5 °C	2 5 °C
1	2 0 0 m M アルギニン コハク酸	0. 0 2 % P S 2 0	5. 0	1 8. 2	7. 7
2			5. 5	1 8. 6	8. 3
3			6. 0	1 6. 4	7. 9
4	2 0 m M ヒスチジン塩 酸塩	1 6 0 m M ヒスチジン塩 酸塩、0. 0 2 % P S 2 0	6. 0	1 8. 0	7. 6
5			6. 5	1 7. 5	7. 3
6	2 0 m M ヒスチジンア セテート	1 6 0 m M ヒスチジンア セテート、0. 0 2 % P S 2 0	5. 5	1 6. 4	7. 7
7			6. 0	1 5. 9	7. 6

【0280】

緩衝液の種類による影響

p H 6. 0での2 0 0 m g / m Lの抗P C S K 9の加速安定性に対する緩衝液の種類による影響について、以下の3つの緩衝液系を含有する製剤で評価した。(1) 1 6 0 m Mのアルギニンコハク酸、(2) 2 0 m Mのヒスチジン塩酸塩及び1 6 0 m Mのアルギニン塩酸塩、並びに(3) 2 0 m Mのヒスチジンアセテート及び1 6 0 m Mのアルギニンアセテート。3つ全ての製剤は、0. 0 2 %のP S 2 0を含んでいた。1 ヶ月後4 0 °Cで、抗P C S K 9は、3つの緩衝液系の間で比較可能なC E - S D Sのプロファイルを持っていた(図2 6、上のパネル)。アルギニンコハク酸緩衝液の使用により、高分子量のピーク

のわずかな増加（図 26、中央のパネル）があったが、ヒスチジン塩酸塩／アルギニン塩酸塩及びヒスチジンアセテート／アルギニンアセテート緩衝剤系の間で、SECによる差は認められなかった。IEC分析により、製剤におけるヒスチジン塩酸塩／アルギニン塩酸塩緩衝液系の使用は、ヒスチジンアセテート／アルギニンアセテート緩衝液系及びアルギニンコハク酸緩衝液と比較した（図 26、下パネル）場合、より少ない酸性ピークの形成が認められた。しかし、SEC、IEC及びCE-SDSによって測定された40℃における抗PCSK9の全体的な分解速度は、pH6.0で3つ全ての緩衝液系で同等である（表9）。

表9 様々な製剤における40℃での200mg/mlの抗PCSK9の分解速度

40℃での損失／月 (%)	200mM アルギニン コハク酸			20mM His HCl、160mM ArgHCl		20mM His Ace、160mM ArgAce	
	pH 5.0	pH 5.5	pH 6.0	pH 6.0	pH 6.5	pH 5.5	pH 6.0
SEC メインピーク	3.8	2.7	2.2	2.1	2.9	2.1	2.1
IEC メインピーク	33	22	19	15.9	18	20.9	19
CE-SDS メインピーク	5.1	4.5	3.6	3.8	3.5	4.0	4.3

【0281】

2つの製剤（pH6.0のヒスチジン塩酸塩、pH6.0のヒスチジンアセテート）における抗PCSK9の安定性について、1mLシリンジにおいても評価した。

【0282】

5℃で、両方の製剤は、最長6ヶ月間安定していた（表10及び11）。加速ストレス条件において、酸性変異体及び凝集体の形成は、液体製剤における抗PCSK9の主な分解経路である。IECにより測定した結果、30℃/65%の相対湿度（RH）及び40℃/75%のRHでは、タンパク質は、pH6.0でヒスチジン塩酸塩よりもヒスチジンアセテートにおいて速く劣化する（表11）。同じ貯蔵条件下でのいずれの製剤について、SEC及びCE-SDSの凝集率の差は認められなかった（表12）。5℃で最長6ヶ月間保存した場合、両方のリード製剤について、酸化の増加は認められなかった。30℃/65%RHで6ヶ月後の両方の製剤でのFc部分におけるMet256の酸化のわずかな増加が（～2%）があったが、他のMet及びTrp残基では酸化の増加は認められなかった。効力の損失は、5℃及び30℃/65%RHで、最大6ヶ月間、いずれの製剤で認められなかった。2.25mLシリンジを使用して同様の結果が得られた。

表10 1mLシリンジ内が20mMのヒスチジン塩酸塩、160mMのアルギニン塩酸塩、0.02%のPS20、pH6.0である抗PCSK9の200mg/mLの安定性データ

		I E C				S E C				
温度 °C / % R H	時点 日目 / 月	強度 m g / m L	%酸性	%メインピーク	%塩基性	%HMW S	%メインピーク	%LM W S	C E - S D S %メインピーク	効力 %相対効力
NA	T = 0/0	209	11.6	73.1	15.1	0.7	99.2	0	96.1	114
5	28/1	210	11.9	73.5	14.5	0.6	99.3	0	96.2	101
5	61/2	206	11.7	72.9	15.3	0.6	99.3	0	96.0	100
5	91/3	208	11.6	73.3	15.0	0.6	99.3	0	96.0	101
5	183/6	208	12.4	71.9	15.6	0.7	99.2	0	95.3	103
30/65	28/1	210	15.0	69.5	15.3	0.7	99.1	0.1	95.6	NT
30/65	61/2	206	19.0	64.0	16.9	0.9	98.8	0.2	94.7	91
30/65	91/3	204	21.4	61.9	16.5	1.0	98.5	0.4	94.0	84
30/65	183/6	209	33.9	48.7	17.3	1.4	97.7	0.8	91.2	92
40/75	7/0.25	206	15.0	68.6	16.3	0.8	99.0	0.1	95.5	NT
40/75	14/0.5	206	18.9	64.3	16.7	0.9	98.8	0.2	95.0	NT
40/75	28/1	209	25.9	57.4	16.6	1.1	98.4	0.4	93.6	105

NT = 未試験

表 1 1 1 m L シリンジ内の、p H 6 . 0 の 2 0 m M のヒスチジン塩酸塩、1 6 0 m M のアルギニン塩酸塩、0 . 0 2 % の P S 2 0 における 2 0 0 m g / m L の抗 P C S K 9 についての安定性データ

10

20

			I E C			S E C				
温度 (℃)	時点 日目 ／月	強度 m g／m L	%酸性	%メイ ンピー ク	%塩 基性	%HM W S	%メイ ンピー ク	%LM W S	%メイン ピーク	% R e l a t i v e P o t e n c y
NA	T = 0/0	211	11. 8	72. 7	15. 4	0. 6	99. 3	0	96. 2	100
5	28/1	203	12. 1	72. 8	14. 9	0. 6	99. 4	0	96. 2	106
5	61/2	208	11. 7	72. 8	15. 4	0. 6	99. 3	0	96. 0	97
5	91/3	208	11. 6	72. 9	15. 3	0. 6	99. 3	0	96. 0	92
5	183/6	207	12. 5	71. 6	15. 8	0. 7	99. 2	0	95. 6	98
30/65	28/1	209	16. 8	67. 5	15. 6	0. 7	99. 1	0. 1	95. 6	NT
30/65	61/2	210	21. 6	61. 8	16. 4	0. 9	98. 8	0. 2	94. 7	98
30/65	91/3	205	26. 1	57. 4	16. 3	1. 0	98. 6	0. 3	94. 3	87
30/65	183/6	205	41. 4	42. 5	16. 0	1. 5	97. 6	0. 8	91. 1	91
40/75	7/0. 25	206	17. 0	66. 6	16. 2	0. 8	99. 0	0. 1	95. 4	NT
40/75	14/0. 5	204	22. 5	60. 0	16. 2	0. 9	98. 8	0. 2	94. 5	NT
40/75	28/1	196	31. 8	51. 9	16. 1	1. 1	98. 4	0. 4	93. 5	106

NT = 未試験

表 1 2 加速安定条件での 1 m l シリンジ中の抗 P C S K 9 の劣化速度

月ごとの変化率 (%)		ヒスチジン塩酸塩 ¹	ヒスチジンアセテート ²
I E C	3 0 ° C / 6 5 % RH	4 . 0	5 . 0
	4 0 ° C / 7 5 % RH	1 6 . 7	2 2 . 0
S E C	3 0 ° C / 6 5 % RH	0 . 2	0 . 2
	4 0 ° C / 7 5 % RH	0 . 8	0 . 9
C E - S D S	3 0 ° C / 6 5 % RH	0 . 8	0 . 8
	4 0 ° C / 7 5 % RH	2 . 6	2 . 8

¹ ヒスチジン塩酸塩 = 2 0 m M のヒスチジン塩酸塩中に 2 0 0 m g / m L の抗 P C S K 9 、 1 6 0 m M のアルギニン塩酸塩、 0 . 0 2 % の P S 2 0 、 p H は 6 . 0

² ヒスチジンアセテート = 2 0 m M ヒスチジンアセテート中に 2 0 0 m g / m L の抗 P C

SK9、160mMのアルギニンアセテート、0.02%のPS20、pHは6.0
【0283】

凍結安定性

以下の2つの製剤において、抗PCSK9は、200mg/mLで製剤化した：(1) 20mMのヒスチジン塩酸塩、160mMの、アルギニン塩酸塩0.02%のPS20、pH6；及び(2) 20mMのヒスチジンアセテート、160mMのアルギニンアセテート、0.02%のPS20、pH6.0。各製剤について、薬剤溶液20mLを25-cの316Lステンレス鋼製ミニ缶に充填した。全てミニ缶はその後、安定性分析のため、6ヶ月まで-20℃に置いた。

【0284】

IEC、CE-SDS及び効力で、-20℃で6ヶ月まで、両製剤の間で差は認められなかった。しかし、同じ保存条件(図25を参照)で、ヒスチジンアセテート製剤中の凝集体において、わずか0.5%の増加に対して、ヒスチジン塩酸塩において、凝集体は冷凍保存の6ヶ月後に1.4%増加した。凍結保存条件下でのヒスチジン塩酸塩製剤との凝集の速度が速いため、好適な緩衝剤としてヒスチジンアセテート製剤を選択した。

【0285】

凍結安定性に対するスクロースの影響

冷凍保存中の抗PCSK9の安定化への影響について、スクロースを評価した。LCGC10カートリッジを備えたラボスケールMillipore社タンジェンシャルフローろ過(TFF)システムを使用して、抗PCSK9を、以下の2つのスクロース含有製剤で試験した：(1) 20mMのヒスチジン塩酸塩中200mg/mLの抗PCSK9、130mMのアルギニン塩酸塩、60mMのスクロース、0.02%のPS20(w/v)、pH6.0。及び(2) 20mMのヒスチジンアセテート中の200mg/mLの抗PCSK9、100mMのアルギニンアセテート、60mMのスクロース、0.02%のPS20(w/v)、pH6.0。2つの製剤中の抗PCSK9のサンプルは、最長3ヶ月にわたり-20℃に置き、凝集についてSECによって分析した。

【0286】

スクロース(60mM)の添加は、ヒスチジンアセテート製剤中のaPCSK9の凝集を減少させることに影響を及ぼさなかったが、-20℃で3ヶ月間にわたり、0.7%ヒスチジン塩酸塩製剤中の凝集を遅くするのに役立った。しかし、スクロースの添加はまた、両方の製剤を25℃で7~8cPから11~13cPへ増粘させ、皮下製剤には望ましくなかった。そのため、スクロースは、製剤の安定剤として選択しなかった。

【0287】

以上の結果に基づいて、20mMのヒスチジンアセテート中の200mg/mLの抗PCSK9、160mMのアルギニンアセテート、0.02%のPS20(w/v)からなるpH6.0の液体製剤を選択した。この製剤は、安定性が2~8℃、保存が-20℃で最適であり、pH5.5での最初の製剤と比較した場合、安定性が改善された。

【0288】

実施例14：冠動脈性心疾患(CHD)患者、又はCHDのリスクが高い患者におけるヒト臨床試験

本実施例は第II相臨床試験について説明し、図27~37は、少なくとも50%の患者の12週間目での中間結果を示している。本試験では、試験薬を投与される183例の患者、及びプラセボを投与される64例の患者を含む、248例の患者を登録した。1例の患者が初回投与前に試験を脱落し、13例の患者が試験85日前に投与を中止した。234例の患者が、試験の少なくとも12週間を完了した。

【0289】

試験薬(配列番号35を有する軽鎖、並びに配列番号36を有する重鎖を持つヒトIgG1に再フォーマットされたYW508.20.33b)の約3:1ランダム化二重盲検プラセボ対照試験は、空腹時の血清LDL-c値(直接測定法)が90~250mg/dLの患者、並びに、冠動脈性心疾患(CHD)又はCHDリスク相当の患者のいずれかに

において、スタチンの標準治療（SOC）に加えて試験薬の安全性と有効性を評価するために実施された。追加の適格基準は、重量 $\geq 45\text{ kg}$ （100 lb）；ボディ・マス・インデックスが $18\sim 37\text{ kg/m}^2$ ；年齢が18歳から80歳の間であることが含まれた。LDL-c $> 120\text{ mg/dL}$ 、糖尿病の状態によって層別ランダム化した。

【0290】

第II相臨床試験のための適格基準は、欧州心臓病学会（ESC）／欧州動脈硬化学会（EAS）及び全米コレステロール教育プログラム成人治療パネルIII（NCEP ATP III）脂質低下のガイドラインリスクカテゴリに基づいて、心血管及びCHDリスクの高い患者の母集団を定義した。本試験は、これらのガイドラインに従って、治療標的がLDL-c値 70 mg/dL であるが、安定したSOCのスタチン療法にもかかわらず、スタチンに忍容性がないか、又はSOCが不十分であるかのいずれかのため、この目標を達成できなかった患者を有資格者として登録した。

10

【0291】

簡単に述べると、CHDとは心筋梗塞の病歴が確認されていること、すなわち、過去に冠動脈血管再生手術（経皮的冠動脈インターベンション又は冠動脈バイパス移植）を受けたか、又は過去に冠動脈造影検査（侵襲的冠動脈造影検査又は心臓コンピュータ断層撮影冠動脈造影検査）で少なくとも一つの $\geq 50\%$ 直径狭窄の冠動脈アテローム性動脈硬化病変を示したことを指す。

【0292】

CHDリスク相当の状態を有する患者は、以下の少なくとも一つを有していた。

20

1. 臨床的アテローム性動脈硬化症の1つ又は複数の形態：

a. 末梢動脈疾患（足関節／上腕血圧指数 0.85 の診断歴、経皮的又は外科的末梢動脈血管再生術の既往、末梢動脈疾患による下肢の非外傷性切断の既往、又は血管造影での $\geq 50\%$ 直径狭窄の既往）、

b. 頸動脈疾患（画像での $\geq 50\%$ 直径狭窄を有する頸動脈アテローム性動脈硬化病変の診断歴、又は皮膚又は外科頸動脈血行再生手術の既往、

c. 治験責任医師の意見において、心臓由来の塞栓症（例えば、心房細動、弁膜症、又は左室壁血栓）に起因していない、CT又はMRI脳画像による虚血性脳卒中の診断歴、又は

d. 外科的修復又は血管内修復を伴う腹部大動脈瘤の既往。

30

2. 2型糖尿病。

3. 標的臓器障害（治験責任医師によって診断された、網膜症、神経障害、又は微量アルブミン尿を含む腎症）を合併した1型糖尿病。

4. 中等度から重度の慢性腎臓病（スクリーニング検査を含め、常にMDRD式を使用して、少なくとも3ヶ月に及ぶ、少なくとも3回にわたる測定で、推算糸球体濾過量が $15\sim 60\text{ mL/min/1.73 m}^2$ を示した）、又は

5. 下記の二つ以上のCHDの危険因子、及びCHDイベントの20%の10年絶対リスク（全米コレステロール教育プログラム成人治療パネルIIIガイドライン改訂版のフラミンガムリスクスコアによって決定される）又は最初の致命的なアテローム性動脈硬化症のイベントの10年リスク $\geq 10\%$ （系統的冠動脈リスク評価によって決定される）のいずれか：

40

a. 年齢男性45歳以上、又は女性55歳以上、

b. 現在の喫煙（1ヶ月以内）、

c. 高血圧（スクリーニング時に収縮期血圧が $\geq 140\text{ mmHg}$ 、拡張期血圧が $\geq 90\text{ mmHg}$ 、又は高血圧症を治療するための降圧薬を服用していること。）

d. 低HDLコレステロール（ 40 mg/dL ）、又は

e. 早期CHDの家族歴（一親等者が男性は55歳、女性は65歳で、心筋梗塞又は冠動脈血管再生手術歴あり）

【0293】

糖尿病の状態は、患者の医療記録又は病歴、又は検査結果のスクリーニングに従い、次

50

のいずれかの有無に基づいて決定した：（１） $\text{HbA}_{1c} > 6.5\%$ 、（２）空腹時血漿グルコース $\geq 126 \text{ mg/dL}$ （ 7.0 mmol/L ）、（３）経口ブドウ糖負荷試験中（試験は、世界保健機関によって記載されるように、水に溶解した無水グルコース 75 g に相当するものを含むグルコース負荷を用いて行われるべきである）、２時間より前の血漿グルコース $\geq 200 \text{ mg/dL}$ （ 11.1 mmol/L ）、又は、（４）現在、糖尿病を診断するための経口又は注射療法。

【0294】

除外基準は以下を含んでいた：試験中に冠状動脈、頸動脈又は末梢動脈血管再生手術を計画；３ヶ月以内のプロトコール又はスクリーニングにおいて記載されているような、コントロールされていない臨床的に重要な医学的疾患；後天性又は先天性免疫抑制；角膜移植以外の臓器移植；治験責任医師の判断において、平均余命 < 2 年；空腹時血清トリグリセリドレベル $\geq 400 \text{ mg/dL}$ ；アルコール依存症の既往又は１年のスクリーニングを伴う薬物中毒；３ヶ月のスクリーニングを伴う違法薬物の使用；妊娠又は非常に効果的な避妊法の使用を望んでいないこと；アナフィラキシー又はアナフィラキシー反応の既往。

【0295】

血清 LDL-C 濃度が $90 \sim 250 \text{ mg/dL}$ の患者（成人男性および女性） 248 例及び CHD 又は CHD リスク相当の患者のいずれかを、５つの試験群いずれかにランダム化し、試験薬又はプラセボ（ F 群）を投与した。第一の試験群（ A 群）の患者には、抗 PCSK9 抗体を４週間ごとに 400 mg 投与し；第二の試験群（ B 群）の患者には、抗 PCSK9 抗体を８週間ごとに 200 mg 投与し；第三の試験群（ C 群）の患者には、抗 PCSK9 抗体を８週間ごとに 400 mg 投与し；第四の試験群（ D 群）の患者には、抗 PCSK9 抗体を８週間ごとに 800 mg 投与し；第五の試験群（ E 群）の患者は、抗 PCSK9 抗体を１２週間ごとに 800 mg 投与した。試験薬の用量コホートの概要、試験薬投与レジメン、及び試験群ごとの患者数は、図２７に示した。シリンジを使用して、全ての用量を皮下投与した。薬物製品は、 200 mM のアルギニンコハク酸、 0.02% のポリソルベート 20 、 $\text{pH } 5.5$ で、 150 mg/mL の抗体として製剤化される。

【0296】

下記のとおり、表１３において本試験の患者情報は、群によって差がないことを示している。下記のとおり、表１４において患者のベースライン時の情報は、群によって差がないことを示している。

表１３ 患者背景

（特に記載のない限り、平均値（ SD ））

10

20

30

	400mg/4W	200mg/8W	400mg/8W	800mg/8W	800mg/12W	ﾌﾟﾗｾﾎﾞ	mITT
	(n=57)	(n=23)	(n=30)	(n=50)	(n=23)	(n=64)	(n=247)
年齢 (年)	66 (8.5)	63 (10.0)	63 (8.1)	64 (8.9)	64 (7.2)	63 (7.8)	64 (8.4)
体重 (kg)	89 (15.4)	89 (15.3)	85 (11.7)	83 (17.7)	83 (17.1)	87 (15.1)	86 (15.6)
BMI (kg/m ²)	31 (4.3)	30 (4.5)	30 (4.2)	29 (5.2)	29 (3.7)	30 (5.0)	30 (4.7)
女性 (%)	24 (42%)	8 (35%)	16 (53%)	24 (48%)	10 (44%)	24 (38%)	106 (43%)
ヒスパニック (%)	1 (2%)	1 (4%)	1 (3%)	1 (2%)	1 (4%)	5 (8%)	10 (4%)
人種：白人 (%)	55 (97%)	19 (83%)	27 (90%)	44 (88%)	23 (100%)	59 (92%)	227 (92%)
人種：黒人 (%)	1 (2%)	2 (9%)	2 (7%)	5 (10%)	0	3 (5%)	13 (5%)
人種：アジア人 (%)	0	0	1 (3%)	1 (2%)	0	1 (2%)	3 (1%)
人種：その他 (%)	1 (2%)	1 (4%)	0	0	0	1 (2%)	3 (1%)
人種：ネイティブ (%)	0	1 (4%)	0	0	0	0	1 (0.4%)

10

20

30

表 1 4 ベースライン時の患者情報
(特に記載のない限り、平均値 (SD))

	400mg/4W	200mg/8W	400mg/8W	800mg/8W	800mg/12W	プラセボ	mITT
	(n=57)	(n=23)	(n=30)	(n=50)	(n=23)	(n=64)	(n=247)
前糖尿病性 (% F B G $\geq$ 100mg/dl)	68%	65%	60%	54%	65%	59%	62%
スタチン使用 (%)	88%	78%	73%	76%	74%	89%	82%
LDL-c $\geq$ 120 (%)	46%	48%	60%	54%	52%	45%	50%
LDL-c (mg/dL)	123(31.3)	123(25.3)	133(35.2)	127(31.5)	134(43.8)	122(31.4)	126(32.7)
メジアン LDL-c (mg/dL)	117	117	123	118	123	111	117
トリグリセリド (mg/dL)	156(66.3)	146(60.0)	152(54.3)	173(90.8)	144(37.0)	141(63.1)	153(67.8)
Median Trig. (mg/dL)	142	132	142	149	145	132	142
CHDの家族歴 (% 有)	26(46%)	5(22%)	13(43%)	20(40%)	9(39%)	18(28%)	91(37%)
非喫煙者 (%)	23(40%)	6(26%)	13(43%)	17(34%)	7(30%)	25(39%)	91(37%)

【0297】

図27に示すように、本試験では、スクリーニングのための連続した期間（04週間）、導入期間（06週間、必要に応じて）、治療期間（24週間、1日目～169日目）、及びフォローアップ期間（12週間）が含まれる。フォローアップ期間最終日（253日目）での試験完了の来院は、試験薬の最終投与（141日目）の16週間後に発生する。スタチンへの忍容性がなかった場合を除き、全ての患者が、治療の割り当てに関係なく、スタチンを含む標準治療（SOC）治療を受けた。SOCのスタチン治療は、以下の条件のいずれかを治療が満たすことを指す。（1）高用量のシンバスタチン（40mgを毎日

）、アトルバスタチン（40～80 mgを毎日）、又はロスバスタチン（20～40 mgを毎日）、（2）低用量のシンバスタチン、アトルバスタチン、又はロスバスタチン及びそのスタチン又は他のスタチンに対する任意の用量、高用量に対して忍容性ありとの診断、（3）他のスタチン（任意の用量）及びシンバスタチン、アトルバスタチン、又はロスバスタチン（任意の用量）に対して忍容性ありとの診断、又は（4）スタチンなし、及び少なくとも2つのスタチン（任意のスタチン、任意の用量）に対して忍容性ありとの診断。全ての患者は、治療期間及びフォローアップ期間を通して、患者は導入期間中に、及び登録時に投与されていた同じ用量で、SOCスタチン療法を継続した。他の処方及び市販薬（OTC）による脂質修飾治療（例えば、紅色酵母米、オメガ3脂肪酸サプリメントなど）は許可されていない。スクリーニングの時点で安定した用量のSOCスタチン療法を受けており（又はスタチンなし及び2種類以上のスタチンに忍容性なしと診断された）、脂質修飾治療を少なくとも4週間（又はフィブラートの場合は6週間）受けていなかった患者は、導入期間を必要としなかった。

10

【0298】

活性薬剤又はプラセボの全ての用量は、試験薬の投与スケジュールに従って投与される。すなわち、1日目、29日目（±2日）、57日目（±2日）、85日目（±2日）、113日目（±4日）、及び141日目（±4日）のみである。図28を参照。患者は、169日目でのLDL-cの濃度のベースラインからの絶対変化に基づく有効性を決定するため、モニターされる。さらに、患者は、その群の最下点での各群のLDL-c濃度のベースラインからの絶対変化；169日目までの、連続したLDL-cの測定値の間での、週数で加重した、各群のLDL-cの変化の経時的な平均値（ベースラインからの変化率及び絶対変化）；169日目での各群の最下点でのLDL-c濃度のベースラインからの変化率（%）；他のすべての指定された時点でのLDL-c濃度のベースラインからの変化率及び絶対変化；並びに、169日目及び各群の最下点での総コレステロール、非HDL-c、及びアポリポタンパク質Bにおける、ベースラインからの変化率及び絶対変化を含む有効性の副次的評価項目を決定するため、モニターされる。

20

【0299】

有効性の主要評価項目は169日目でのLDL-cのベースラインからの変化量を含む。ベースラインLDL-cは試験薬の初回投与前に収集され、最後の2つの測定値の平均として定義される。試験薬投与の間及び試験薬とプラセボの投与量のそれぞれとの間の治療の比較は、2つの共変量、すなわち、ベースラインLDL-cの濃度（<120 mg/dL、≥120 mg/dL）及び糖尿病状態（はい、いいえ）を調整した線形回帰モデルを通して実施される共分散の分析（ANCOVA）に基づいた。信頼区間、並びにANCOVAモデルからの最小二乗推定値は、試験結果の解釈を助けるために使用された。有効性の副次的評価項目の測定は、最下点及び全ての時点におけるLDL-cの絶対変化；1週間ごとのLDL-cの変化量の加重平均；169日目、最下点及び全ての来院日でのベースラインからの変化率；169日目及び最下点での総コレステロール、非HDL-c、及びアポリポタンパク質Bにおける、絶対変化及び変化率を含む。

30

【0300】

下記の表15は、治療12週間後の患者の治療状況を示す。

40

表15 治療12週間後の転帰

	400mg/4W	200mg/8W	400mg/8W	800mg/8W	800mg/12W	プラセボ	ITT*
	(n=57)	(n=23)	(n=30)	(n=51)	(n=23)	(n=64)	(n=248)
試験完了	0	0	0	0	0	0	0
試験中止	2 (4%)	0	1 (3%)	3 (6%)	0	1 (2%)	7 (3%)
試験薬の中止	3 (5%)	0	1 (3%)	4 (8%)	0	2 (3%)	10 (4.0%)
有害事象	1 (2%)	0	0	0	0	0	1 (0.4%)
プロトコル違反	2 (4%)	0	0	2 (4%)	0	0	4 (1.6%)
被検体の判断	0	0	1 (3%)	1 (2%)	0	1 (2%)	3 (1.2%)
治験依頼者の判断	0	0	0	1 (2%)	0	0	1 (0.4%)
その他	0	0	0	0	0	1 (2%)	1 (0.4%)

10

【0301】

本試験の中間データを以下の表16及び図28～36に要約する。

表16 ベースラインから最下点までで測定された患者の総コレステロール、非HDL – c、及びアポリポタンパク質B

20

	400mg g/4W (n=57)	200mg /8W (n=23)	400mg g/8W (n=30)	800mg /8W (n=50)	800mg /12W (n=23)	プラセ ボ (n=63)
TC/平均絶対変化 (mg/dL)	-99.9	-73.9	-92.3	-102.0	-92.3	-24.4
プラセボからの減少	74.9	48.7	64.7	75.5	66.2	
95%信頼区間	65.2, 84.6	36.0, 61.5	52.9, 76.4	65.5, 85.5	53.4, 79.0	
TC/平均相対変化 (%)	-49.4	-37.7	-43.6	-48.6	-44.8	-12.4
プラセボからの減少	36.7	25.2	30.8	35.8	32.1	
95%信頼区間	32.6, 40.8	19.8, 30.7	25.7, 35.8	31.6, 40.1	26.6, 37.6	
非-HDLc、平均絶対変化 (mg/dL)	-101.6	-76.2	-96.3	-103.3	-95.0	-24.1
プラセボからの減少	76.7	51.3	68.7	76.9	69.0	
95%信頼区間	66.9, 86.5	38.4, 64.1	56.9, 80.5	66.9, 87.0	56.1, 81.9	
非-HDLc、平均相対変化 (%)	-67.3	-52.1	-60.5	-65.9	-59.8	-16.6
プラセボからの減少	50.3	35.5	43.7	49.1	43.0	
95%信頼区間	45.2, 55.4	28.8, 42.2	37.5, 49.8	43.9, 54.3	36.3, 49.7	
アポリポタンパク質 B、平均絶対変化 (mg/dL)	-64.3	-48.5	-59.1	-65.6	-62.8	-15.8
プラセボからの減少	48.1	32.3	41.4	48.5	46.0	
95%信頼区間	42.0, 54.3	24.2, 40.4	33.9, 48.8	42.2, 54.9	37.8, 54.1	

10

20

30

40

アポリポタンパク質 B、平均相対変化 (%)	- 6 3 . 1	- 4 9 . 2	- 5 5 . 8	- 6 2 . 7	- 5 8 . 3	- 1 5 . 7
プラセボからの減少	4 7 . 0	3 3 . 4	3 9 . 9	4 6 . 8	4 2 . 3	
9 5 %信頼区間	4 2 . 2 , 5 1 . 7	2 7 . 1 , 3 9 . 6	3 4 . 2 , 4 5 . 7	4 1 . 9 , 5 1 . 7	3 6 . 1 , 4 8 . 6	

【 0 3 0 2 】

10

図 2 8 は、平均薬物動態（＋／－標準偏差）（左のパネル）及び、P C S K 9 の合計、例えば、薬剤が結合した P C S K 9 と遊離 P C S K 9 （＋／－標準誤差）の両方の平均（右のパネル）を示している。

【 0 3 0 3 】

図 2 9 は、抗 P C S K 9 抗体又はプラセボを投与された患者で認められた直接法の L D L コレステロールのベースラインからの絶対変化を示す。

図 3 0 は、抗 P C S K 9 抗体又はプラセボを投与された患者で認められた直接法の L D L コレステロールのベースラインからの相対変化を示す。4 週間ごとに抗 P C S K 9 抗体 4 0 0 m g の投与を受けている患者及び 8 週間ごとに抗 P C S K 9 抗体 8 0 0 m g の投与を受けている患者は、直接法の L D L - c で最も高い減少を示した。この効果は、治療 1 週間以内に認められた。1 2 週間ごとに抗 P C S K 9 抗体 8 0 0 m g を投与された患者は、直接法の L D L - c で最も低い減少を示した。

20

【 0 3 0 4 】

図 3 1 は、本試験に参加している患者で認められた総コレステロールのベースラインからの絶対変化を示す。

図 3 2 は、抗 P C S K 9 抗体又はプラセボを投与された患者で認められた総コレステロールのベースラインからの相対変化を示す。4 週間ごとに抗 P C S K 9 抗体 4 0 0 m g の投与を受けている患者及び 8 週間ごとに抗 P C S K 9 抗体 8 0 0 m g の投与を受けている患者は、総コレステロールで最も高い減少を示した。この効果は、治療 1 週間以内に認められた。1 2 週間ごとに抗 P C S K 9 抗体 8 0 0 m g を投与された患者は、総コレステロール値で最も低い減少を示した。

30

【 0 3 0 5 】

図 3 3 は、本試験に参加している患者における非 H D L コレステロールのベースラインからの絶対変化を示す。

図 3 4 は、本試験に参加している患者における非 H D L コレステロールのベースラインからの相対変化を示す。4 週間ごとに抗 P C S K 9 抗体 4 0 0 m g の投与を受けている患者及び 8 週間ごとに抗 P C S K 9 抗体 8 0 0 m g の投与を受けている患者は、非 H D L コレステロールで最も高い減少を示した。この効果は、治療 1 週間以内に認められた。1 2 週間ごとに抗 P C S K 9 抗体 8 0 0 m g の投与を受けている患者は、非 H D L コレステロールで最も高い減少を示した。

40

【 0 3 0 6 】

図 3 5 は、本試験に参加している患者におけるアポリポタンパク質 B のベースラインからの絶対変化を示す。

図 3 6 は、本試験に参加している患者におけるアポリポタンパク質 B のベースラインからの相対変化を示す。4 週間ごとに抗 P C S K 9 抗体 4 0 0 m g の投与を受けている患者及び 8 週間ごとに抗 P C S K 9 抗体 8 0 0 m g の投与を受けている患者は、アポリポタンパク質 B で最も高い減少を示した。この効果は、治療 1 週間以内に認められた。1 2 週間ごとに抗 P C S K 9 抗体 8 0 0 m g の投与を受けている患者は、アポリポタンパク質 B で最も高い減少を示した。

【 0 3 0 7 】

50

試験薬の有効性に関する結論はここに要約する。85日目、最下点でのLDL-c、及びAUCにおける最も高い用量依存的減少が、4週間ごとに400mgの抗PCSK9抗体を投与された患者、及び8週間ごとに800mgの抗PCSK9抗体を投与された患者で認められた。85日目の分析に基づいて、LDL-cの中で最も小さい用量依存的減少は、12週間ごとに800mgの抗PCSK9抗体を投与された患者で認められた。最下点及びAUCの分析に基づいて、LDL-cの中で最も小さい用量依存的減少が、8週間ごとに200mgの抗PCSK9抗体を投与された患者で認められた。この効果は、治療1週間以内に認められた。総コレステロール、非HDL-c、及びアポリポタンパク質Bの用量依存的減少は、85日目及び最下点で認められ、その減少は、治療の1週間以内にも明らかであった。

10

【0308】

最終的に、患者はまた、発生率、性質、及び有害事象の重篤度；発生率及びバイタルサインの変化の性質、身体所見、並びに試験薬投与中及び投与後の臨床検査結果；並びに試験薬に対する抗治療抗体の発生率を含む安全性についてモニターされた。

【0309】

低LDL-c値の安全性は、盲検、探索試験において定期的に評価した。図37Aは、少なくとも一回の来院で抗PCSK9抗体又はプラセボを投与した後、直接法のLDL-c値が15mg/dL以下の患者の割合を示し、図37Bは、少なくとも一回の来院で抗PCSK9抗体又はプラセボを投与された後、直接法のLDL-c値が25mg/dL以下の患者の割合を示している。LDL-c $\leq$ 15mg/dL又はLDL-c $\leq$ 25mg/dLの患者のうち、試験薬を4週間ごとに400mg、又は8週間ごとに800mgのいずれかで投与を受けたものの割合が最も高かった。LDL-c $\leq$ 25mg/dLの患者のうち、試験薬を8週間ごとに200mgで投与を受けたものの割合が最も低かった。2回連続でLDL-c値が15mg/dLの患者は、試験薬の投与は控えた。これは有害事象とは見なさなかった。このような患者は、盲検法で、LDL-c $\geq$ 50mg/dLに増加するまで、代わりにプラセボを投与し、その後、これらの患者は、最も低い用量（8週間ごとに200mg）に切り替えた。

20

【0310】

試験薬の安全性に関する結論はここに要約する。簡単に言えば、抗PCSK9抗体は、37から80歳で、LDL-cのベースラインが高く（90～250mg/dL）、CHD又はCHDリスクと同等と診断され、スタチンの安定した用量を服用していたか、又はスタチン不耐症の患者に対して、忍容性に優れていた。注射部位反応は、試験薬（25%）対プラセボ（9%）を受けた患者の間でより一般的であった。中等度の注射部位反応がわずかに2例（プラセボ1例、試験薬1例）あったが、その他の重篤度は軽度であった。治療により発生したイベントのその他の臨床的に有意な不均衡は、試験薬投与群とプラセボ投与群の患者との間で認められなかった。臨床検査値の異常において、臨床的に意義のある不均衡は認められなかった。安全なシグナルは測定されなかった。死亡例は報告されず、新たな安全性の懸念は認められなかった。安全性の検査結果で検出されたパターンはなかった。

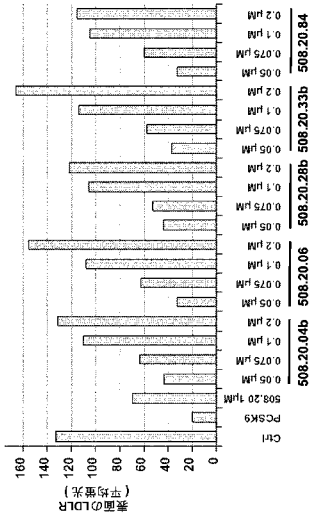
30

【0311】

前述の発明は、理解を明確にする目的のために例示及び実施例によってある程度詳細に説明してきたが、説明や例は、本発明の範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。すべての特許及び本明細書に引用される科学文献の開示は、参照によりその全体が援用される。

40

【図 5】

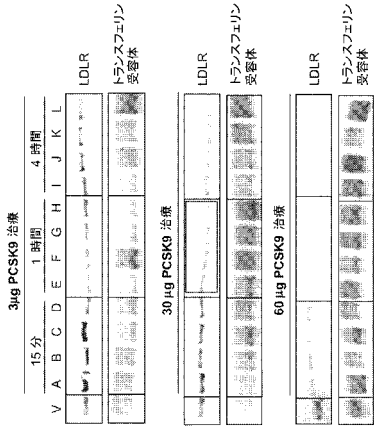


【図 3 C - D】

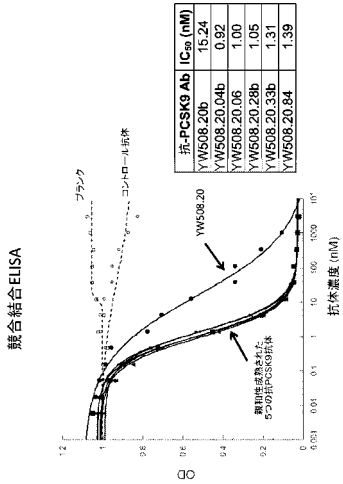
C					
YW508.20.33b	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (pM)		
カニクイザル	2.62E+04	1.63E-06	62.4		
ラット	6.81E+04	1.24E-06	18.2		

D					
YW508.20.33b	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (nM)		
カニクイザル	8.35E+03	3.42E-05	4.09		

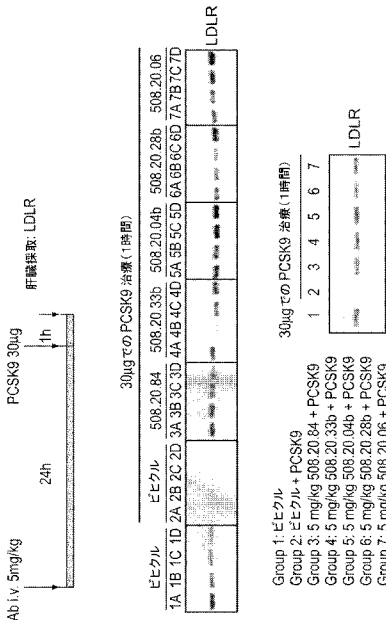
【図 6】



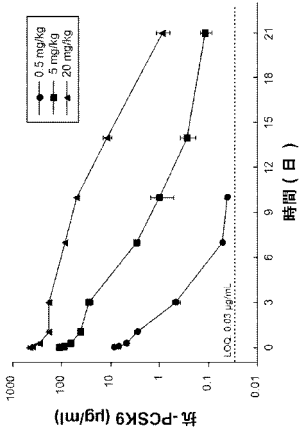
【図 4】



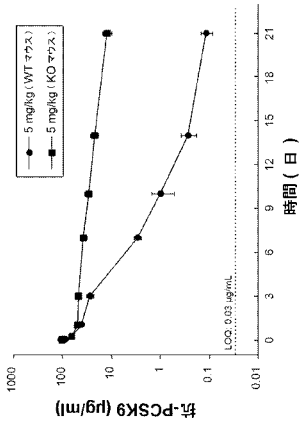
【図 7】



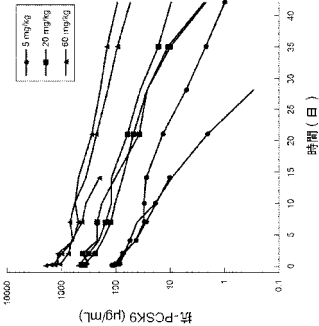
【図 8】



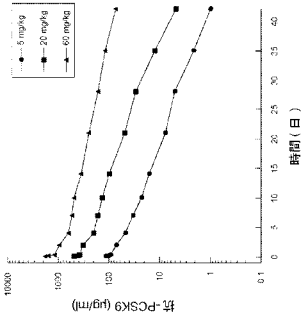
【図 9】



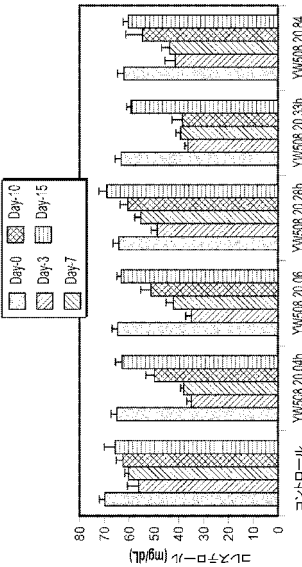
【図 10】



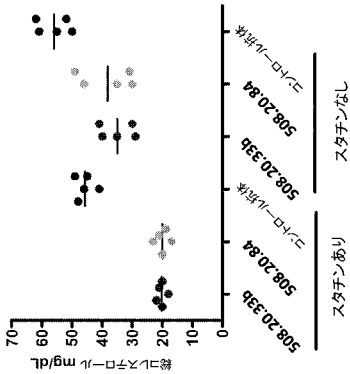
【図 1 1】



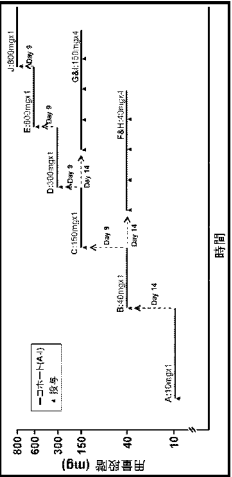
【図 1 2】



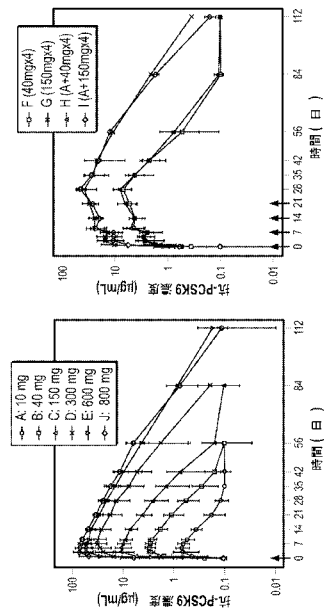
【図 1 3】



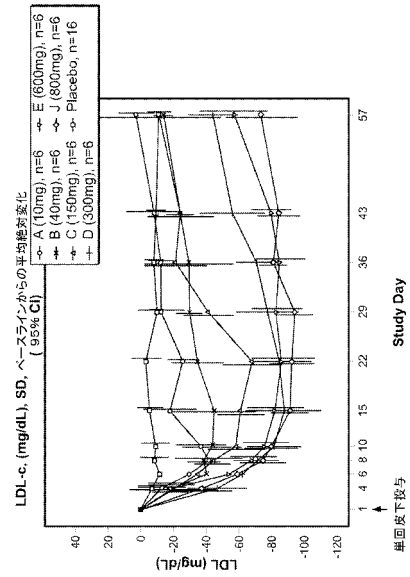
【図 1 4】



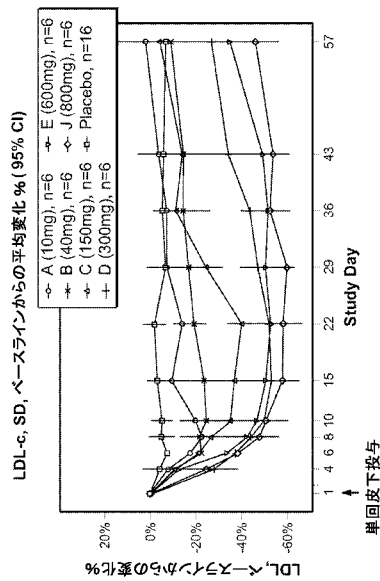
【図 15】



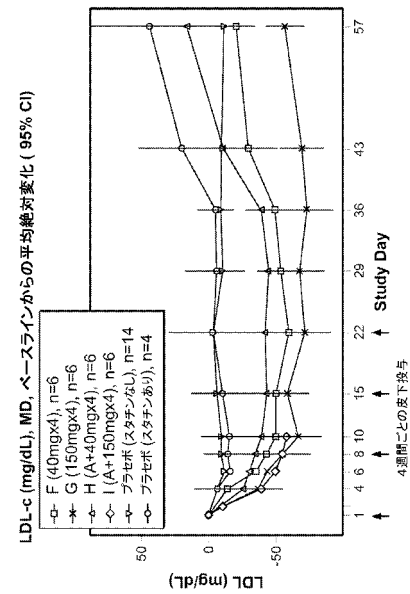
【図 16】



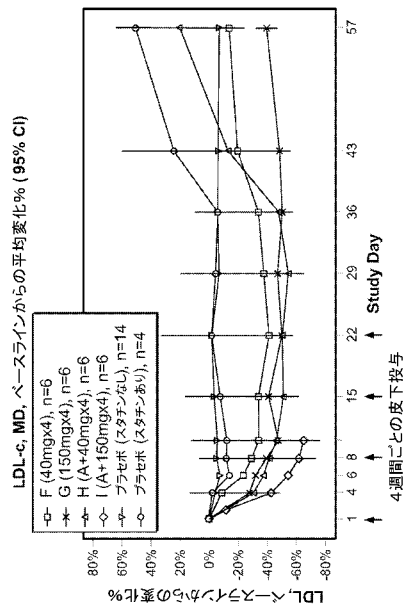
【図 17】



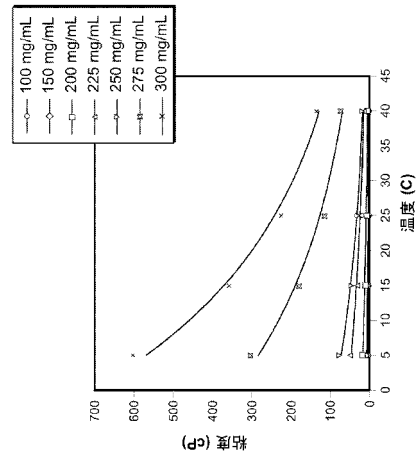
【図 18】



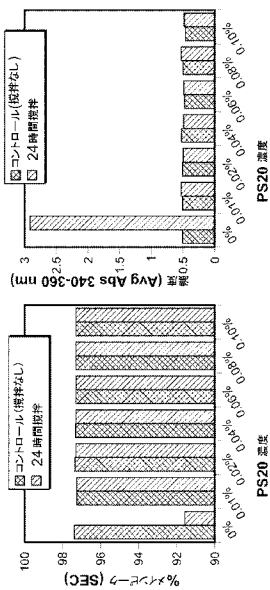
【図 19】



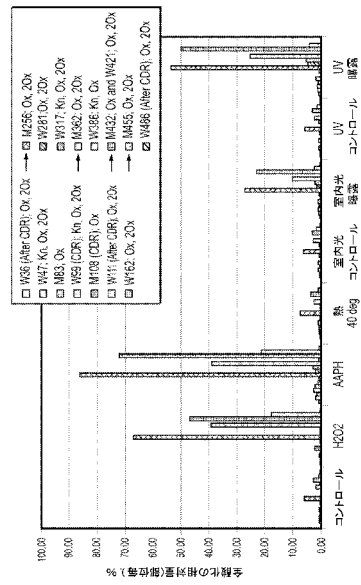
【図 20】



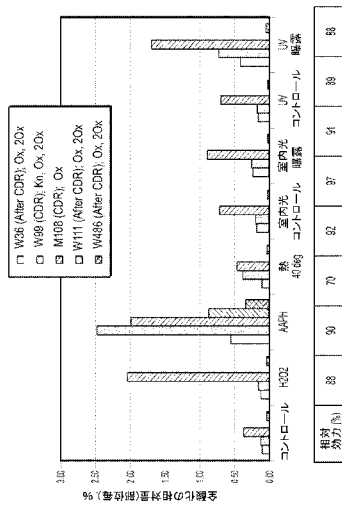
【図 21】



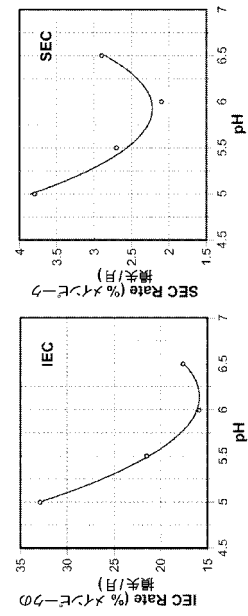
【図 22】



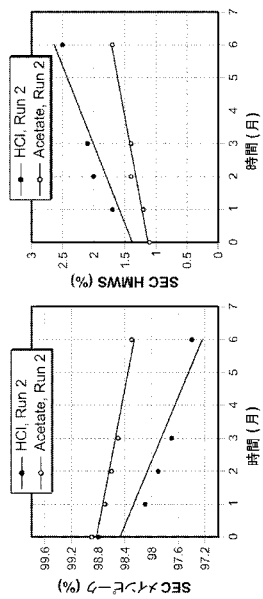
【 図 2 3 】



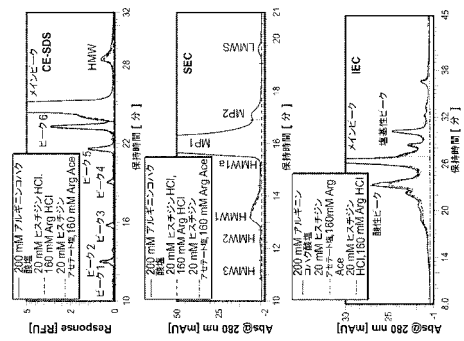
【図 24】



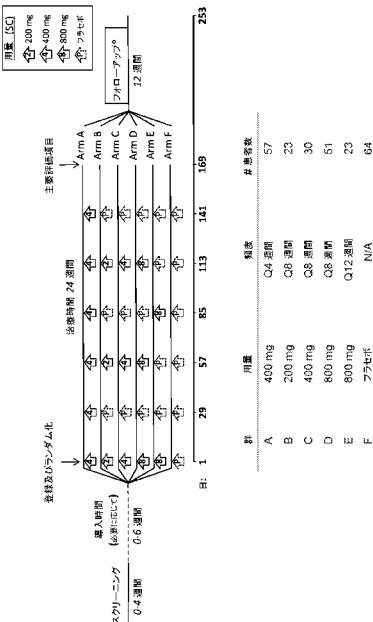
【图 2 5】



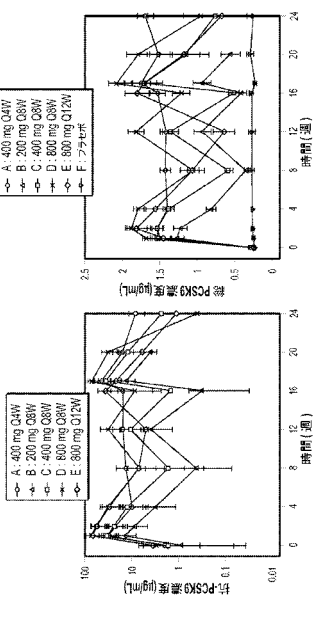
【图 2 6】



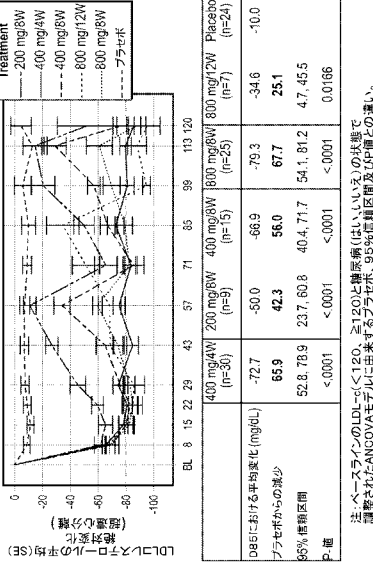
【図 27】



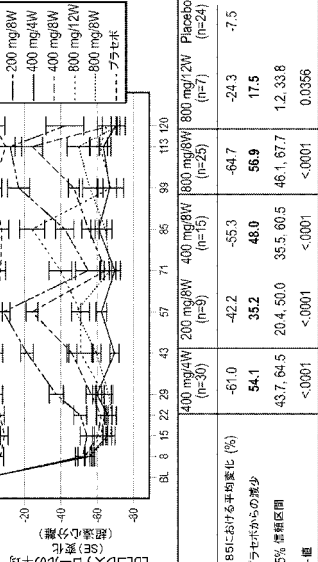
【図 28】



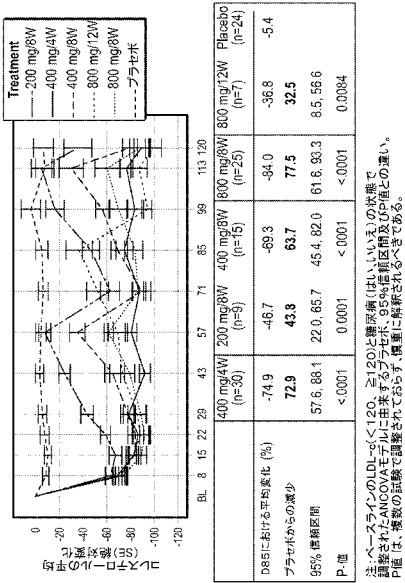
【図 29】



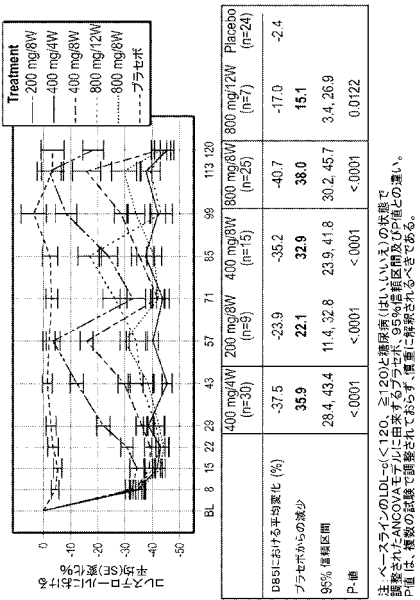
【図 30】



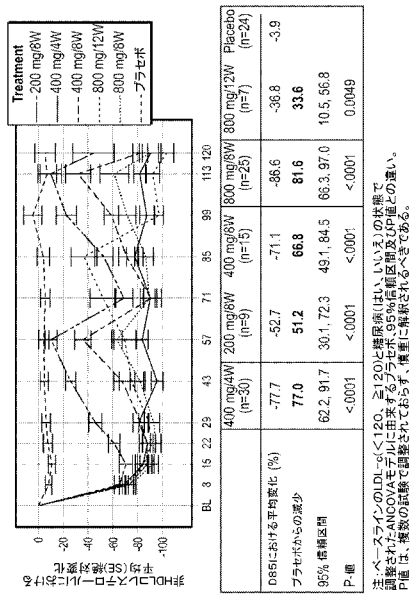
【図 3 1】



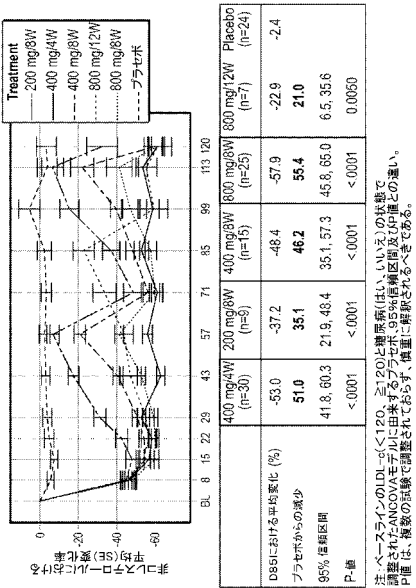
【図 3 2】



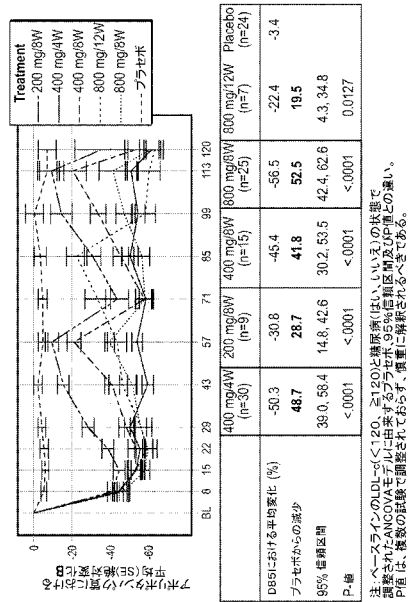
【図 3 3】



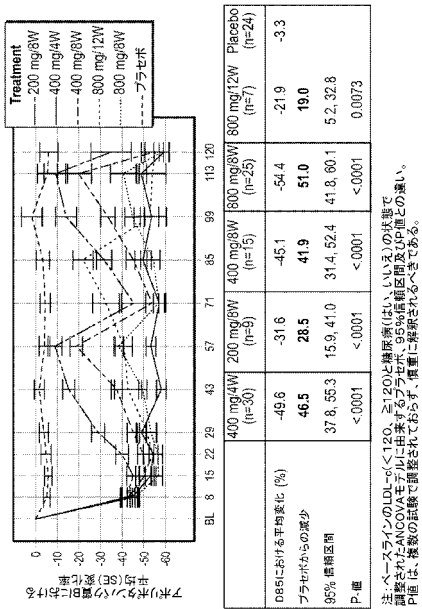
【図 3 4】



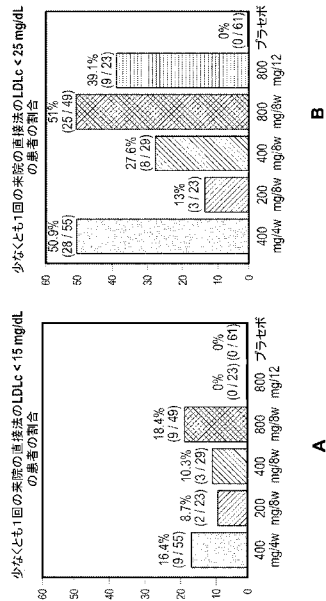
【図 3 5】



【図 3 6】



【図 3 7】



【配列表】

2015530867000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2013/046032

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K16/40 A61K39/395
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K A61K

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)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2011/072263 A1 (IRM LLC; NOVARTIS AG [CH]; RUE SARAH [US]; COHEN STEVEN B [US]; LI JUN) 16 June 2011 (2011-06-16) paragraph [0005] paragraphs [0006] - [0012] paragraphs [0034] - [0036] ----- -/--	1-26, 51-101

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier application or patent but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 September 2013

Date of mailing of the international search report

01/10/2013

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Irion, Andrea

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2013/046032

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	NI YAN G ET AL: "A proprotein convertase subtilisin-like/kexin type 9 (PCSK9) C-terminal domain antibody antigen-binding fragment inhibits PCSK9 internalization and restores low density lipoprotein uptake", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, INC, BETHESDA, MD, USA, vol. 285, no. 17, 23 April 2010 (2010-04-23), pages 12882-12891, XP002619048, ISSN: 1083-351X, DOI: 10.1074/JBC.M110.113035 [retrieved on 2010-02-19] abstract -----	1-101
Y	YAN G NI ET AL: "A PCSK9-binding antibody that structurally mimics the EGF(A) domain of LDL-receptor reduces LDL cholesterol in vivo", JOURNAL OF LIPID RESEARCH, AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, INC, US, vol. 52, no. 1, 1 January 2011 (2011-01-01), pages 78-86, XP002686538, ISSN: 0022-2275, DOI: 10.1194/JLR.M011445 [retrieved on 2010-10-19] abstract -----	1-101
Y	LIWEN ZHANG: "An Anti-PCSK9 Antibody Reduces LDL-Cholesterol On Top Of A Statin And Suppresses Hepatocyte SREBP-Regulated Genes", INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL SCIENCES, 1 January 2012 (2012-01-01), pages 310-327, XP055079135, ISSN: 1449-2288, DOI: 10.7150/ijbs.3524 abstract -----	1-101
X	WO 2009/100297 A1 (MERCK & CO INC [US]; ANGELETTI P IST RICHERCHE BIO [IT]; CONDRA JON H) 13 August 2009 (2009-08-13) pages 67-68; examples 14,15 pages 68-69; example 16 page 69; example 17 page 45, line 36 - page 48, line 8 claims 27-30 -----	1-26, 51-101
Y	----- -/--	27-50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2013/046032

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2011/053759 A1 (MERCK SHARP & DOHME [US]; LUO PETER PEIZHI [US]; NI YAN [US]; WANG KEV) 5 May 2011 (2011-05-05)	1-26, 51-101
Y	page 5, line 9 - page 7, line 21 Examples -----	27-50
X	WO 2011/053783 A2 (MERCK SHARP & DOHME [US]; LUO PETER PEIZHI [US]; NI YAN [US]; WANG KEV) 5 May 2011 (2011-05-05) examples 5-7; table 2 page 81 - page 82; example 20 -----	1-26, 51-101
X	WO 2009/055783 A2 (SCHERING CORP [US]; HEDRICK JOSEPH A [US]; MONSMA FREDERICK JAMES JR []) 30 April 2009 (2009-04-30) page 53 - page 57; example 3 -----	1-26, 51-101
X	WO 2012/054438 A1 (SCHERING CORP [US]; HEDRICK JOSEPH A [US]; PRESTA LEONARD G [US]; HOLL) 26 April 2012 (2012-04-26) page 51 - page 66; example 1 page 66 - page 67; example 2 -----	1-26, 51-101
X	WO 2009/026558 A1 (AMGEN INC [US]; JACKSON SIMON MARK [US]; WALKER NIGEL PELHAM CLINTON []) 26 February 2009 (2009-02-26) paragraphs [0008] - [0011] paragraph [0019] paragraph [0018] paragraph [0446]; table 7.1 -----	1-26, 51-101
Y	CHAN JOYCE C Y ET AL: "A proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 neutralizing antibody reduces serum cholesterol in mice and nonhuman primates", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES - PNAS, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, US, vol. 106, no. 24, 16 June 2009 (2009-06-16), pages 9820-9825, XP002570200, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.0903849106 abstract page 9824, left-hand column, paragraph 4 ----- -/--	1-101

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2013/046032

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2010/029513 A2 (RINAT NEUROSCIENCE CORP [US]; LIANG HONG [US]; ABDICHE YASMINA NOUBIA) 18 March 2010 (2010-03-18) page 68, lines 16-23 page 69; table 4 page 76; table 7 page 77, paragraph 10 - page 78, paragraph 22 page 80, line 19 - page 81, line 14 -----	1-26, 51-101
X	WO 2011/111007 A2 (RINAT NEUROSCIENCE CORP [US]; PFIZER [US]; PONS JAUME [US]; CHABOT JEF) 15 September 2011 (2011-09-15) page 64, lines 10-15 claims 30,31 -----	1-26, 51-101
Y	J. CHAPARRO-RIGGERS ET AL: "Increasing Serum Half-life and Extending Cholesterol Lowering in Vivo by Engineering Antibody with pH-sensitive Binding to PCSK9", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 287, no. 14, 30 March 2012 (2012-03-30), pages 11090-11097, XP055041205, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M111.319764 abstract -----	1-101
Y	LIANG H ET AL: "Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 antagonism reduces low-density lipoprotein cholesterol in statin-treated hypercholesterolemic nonhuman primates", JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS, AMERICAN SOCIETY FOR PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS, US, vol. 340, no. 2, 1 February 2012 (2012-02-01), pages 228-236, XP009166142, ISSN: 0022-3565 abstract -----	1-101
X	WO 2010/077854 A1 (REGENERON PHARMACEUTICALS INC [US]; SLEEMAN MARK W [US]; MARTIN JOEL) 8 July 2010 (2010-07-08) paragraphs [0120] - [0121] claims 17-21 -----	1-26, 51-101
	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2013/046032

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EVAN A. STEIN ET AL: "Effect of a Monoclonal Antibody to PCSK9 on LDL Cholesterol", NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, vol. 366, no. 12, 22 March 2012 (2012-03-22), pages 1108-1118, XP55049842, ISSN: 0028-4793, DOI: 10.1056/NEJMoal105803 abstract -----	1-101
Y	EVAN A STEIN ET AL: "Effect of a monoclonal antibody to PCSK9, REGN727/SAR236553, to reduce low-density lipoprotein cholesterol in patients with heterozygous familial hypercholesterolaemia on stable statin dose with or without ezetimibe therapy: a phase 2 randomised controlled trial", THE LANCET, vol. 380, no. 9836, 26 May 2012 (2012-05-26), pages 29-36, XP55041201, ISSN: 0140-6736, DOI: 10.1016/S0140-6736(12)60771-5 abstract -----	1-101
X,P	WO 2012/088313 A1 (GENENTECH INC [US]; HOFFMANN LA ROCHE [CH]; WU YAN [US]; CHIU CECILIA) 28 June 2012 (2012-06-28) the whole document -----	1-101
Y	WANG W ET AL: "ANTIBODY STRUCTURE, INSTABILITY, AND FORMULATION", JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, AMERICAN PHARMACEUTICAL ASSOCIATION, WASHINGTON, US, vol. 96, no. 1, 1 January 2007 (2007-01-01), pages 1-26, XP009084505, ISSN: 0022-3549, DOI: 10.1002/JPS.20727 the whole document -----	27-50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2013/046032

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2011072263 A1	16-06-2011	AR 079336 A1 AU 2010327924 A1 CA 2781050 A1 CN 102652139 A CR 20120371 A EA 201200861 A1 EP 2510013 A1 JP 2013513620 A KR 20120098873 A MA 33903 B1 PE 13612012 A1 TW 201136605 A US 2011142849 A1 WO 2011072263 A1	18-01-2012 05-07-2012 16-06-2011 29-08-2012 27-08-2012 30-01-2013 17-10-2012 22-04-2013 05-09-2012 02-01-2013 13-10-2012 01-11-2011 16-06-2011 16-06-2011
WO 2009100297 A1	13-08-2009	AR 070316 A1 AU 2009212262 A1 CA 2711794 A1 CN 102066420 A EP 2245071 A1 JP 2011511637 A PA 8815301 A1 TW 200938552 A US 2009246192 A1 US 2012301461 A1 WO 2009100297 A1	31-03-2010 13-08-2009 13-08-2009 18-05-2011 03-11-2010 14-04-2011 17-09-2009 16-09-2009 01-10-2009 29-11-2012 13-08-2009
WO 2011053759 A1	05-05-2011	AU 2010313381 A1 CA 2777698 A1 CN 102596249 A EP 2493505 A1 JP 2013509191 A US 2012231005 A1 WO 2011053759 A1	12-04-2012 05-05-2011 18-07-2012 05-09-2012 14-03-2013 13-09-2012 05-05-2011
WO 2011053783 A2	05-05-2011	AU 2010313324 A1 CA 2777542 A1 CN 102639150 A EP 2493507 A2 JP 2013509194 A US 2012213794 A1 WO 2011053783 A2	12-04-2012 05-05-2011 15-08-2012 05-09-2012 14-03-2013 23-08-2012 05-05-2011
WO 2009055783 A2	30-04-2009	AU 2008316587 A1 CA 2703712 A1 CN 102232088 A EP 2205639 A2 JP 2011501952 A JP 2013091655 A KR 20100091191 A NZ 584902 A SG 188814 A1 US 2011033465 A1 WO 2009055783 A2	30-04-2009 30-04-2009 02-11-2011 14-07-2010 20-01-2011 16-05-2013 18-08-2010 30-03-2012 30-04-2013 10-02-2011 30-04-2009
WO 2012054438 A1	26-04-2012	NONE	
WO 2009026558 A1	26-02-2009	AR 068011 A1	28-10-2009

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2013/046032

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
		AU 2008288791 A1	26-02-2009	
		CA 2696252 A1	26-02-2009	
		CN 101932607 A	29-12-2010	
		CO 6230997 A2	20-12-2010	
		CR 11328 A	12-07-2010	
		EA 201000356 A1	30-08-2010	
		EP 2215124 A1	11-08-2010	
		EP 2615113 A2	17-07-2013	
		EP 2615114 A2	17-07-2013	
		JP 2010536384 A	02-12-2010	
		KR 20100057070 A	28-05-2010	
		NZ 584101 A	28-09-2012	
		PE 10062009 A1	14-08-2009	
		SG 184702 A1	30-10-2012	
		TW 200916481 A	16-04-2009	
		US 2009142352 A1	04-06-2009	
		US 2009326202 A1	31-12-2009	
		US 2011027287 A1	03-02-2011	
		US 2012020975 A1	26-01-2012	
		US 2012020976 A1	26-01-2012	
		US 2012027765 A1	02-02-2012	
		US 2012213797 A1	23-08-2012	
		US 2012251544 A1	04-10-2012	
		US 2013052201 A1	28-02-2013	
		US 2013058944 A1	07-03-2013	
		US 2013079501 A1	28-03-2013	
		US 2013079502 A1	28-03-2013	
		US 2013085265 A1	04-04-2013	
		WO 2009026558 A1	26-02-2009	

WO 2010029513	A2	18-03-2010	AR 073292 A1	28-10-2010
			AU 2009290438 A1	18-03-2010
			CA 2736349 A1	18-03-2010
			CN 102333542 A	25-01-2012
			CO 6351752 A2	20-12-2011
			EP 2344194 A2	20-07-2011
			JP 4898976 B2	21-03-2012
			JP 5119359 B2	16-01-2013
			JP 2012107017 A	07-06-2012
			JP 2012504388 A	23-02-2012
			JP 2013078312 A	02-05-2013
			KR 20110056317 A	26-05-2011
			NZ 591541 A	30-11-2012
			PE 08022011 A1	27-10-2011
			TW 201024321 A	01-07-2010
			US 2010068199 A1	18-03-2010
			US 2012014951 A1	19-01-2012
			US 2012015435 A1	19-01-2012
			WO 2010029513 A2	18-03-2010

WO 2011111007	A2	15-09-2011	AR 080511 A1	11-04-2012
			AU 2011225716 A1	27-09-2012
			CA 2792740 A1	15-09-2011
			CN 102844332 A	26-12-2012
			CO 6592103 A2	02-01-2013
			EP 2545079 A2	16-01-2013
			JP 2013521772 A	13-06-2013
			KR 20120138241 A	24-12-2012

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2013/046032

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		PE 03932013 A1	07-04-2013
		SG 183867 A1	30-10-2012
		US 2011229489 A1	22-09-2011
		WO 2011111007 A2	15-09-2011

WO 2010077854 A1	08-07-2010	AR 077724 A1	21-09-2011
		AU 2009333326 A1	08-07-2010
		CA 2747123 A1	08-07-2010
		CN 102245641 A	16-11-2011
		CR 20110296 A	14-07-2011
		DO P2011000184 A	15-08-2012
		EC SP11011134 A	29-07-2011
		EP 2358756 A1	24-08-2011
		JP 2012511913 A	31-05-2012
		KR 20110094067 A	19-08-2011
		NZ 593155 A	30-11-2012
		NZ 601923 A	28-03-2013
		PA 8854201 A1	27-07-2010
		PE 00142012 A1	07-02-2012
		RU 2011129316 A	20-01-2013
		TW 201036633 A	16-10-2010
		US 2010166768 A1	01-07-2010
		US 2011065902 A1	17-03-2011
		US 2013085266 A1	04-04-2013
		UY 32329 A	30-07-2010
		WO 2010077854 A1	08-07-2010

WO 2012088313 A1	28-06-2012	AU 2011348232 A1	18-07-2013
		CA 2820953 A1	28-06-2012
		CN 103261230 A	21-08-2013
		CO 6721041 A2	31-07-2013
		TW 201307391 A	16-02-2013
		US 2012195910 A1	02-08-2012
		WO 2012088313 A1	28-06-2012

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード (参考)	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/00	1 0 1	4 C 0 8 6	
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 P	21/08		4 C 2 0 6	
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	D	4 H 0 4 5	
A 6 1 K	47/22	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	N		
A 6 1 K	47/18	(2006.01)	A 6 1 K	47/22			
A 6 1 K	47/34	(2006.01)	A 6 1 K	47/18			
A 6 1 P	3/06	(2006.01)	A 6 1 K	47/34			
A 6 1 K	31/40	(2006.01)	A 6 1 P	3/06			
A 6 1 K	31/405	(2006.01)	A 6 1 K	31/40			
A 6 1 K	31/366	(2006.01)	A 6 1 K	31/405			
A 6 1 K	31/47	(2006.01)	A 6 1 K	31/366			
A 6 1 K	31/22	(2006.01)	A 6 1 K	31/47			
A 6 1 K	31/505	(2006.01)	A 6 1 K	31/22			
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 K	31/505			
			A 6 1 P	43/00	1 2 1		

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. UNIX

- (72)発明者 チウ, セシリア プイ チー
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080-4990, サウス サンフランシスコ, ディー
ーエヌエー ウェイ 1
- (72)発明者 キルヒホーファー, ダニエル ケー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080-4990, サウス サンフランシスコ, ディー
ーエヌエー ウェイ 1
- (72)発明者 ピーターソン, アンドリュー
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080-4990, サウス サンフランシスコ, ディー
ーエヌエー ウェイ 1
- (72)発明者 コルマム, ガネーシュ, エー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080-4990, サウス サンフランシスコ, ディー
ーエヌエー ウェイ 1
- (72)発明者 ベルトラン, モニカ コング
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080-4990, サウス サンフランシスコ, ディー
ーエヌエー ウェイ 1
- (72)発明者 モラン, ポール
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080-4990, サウス サンフランシスコ, ディー
ーエヌエー ウェイ 1
- (72)発明者 リー, ウェイ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080-4990, サウス サンフランシスコ, ディー

- ーエヌエー ウェイ 1
 (72)発明者 ラム, ザンジー
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080-4990, サウス サンフランシスコ, ディ
 ーエヌエー ウェイ 1
 (72)発明者 ルイス, リン
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080-4990, サウス サンフランシスコ, ディ
 ーエヌエー ウェイ 1
 (72)発明者 ヒュイ, アダ
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080-4990, サウス サンフランシスコ, ディ
 ーエヌエー ウェイ 1
 (72)発明者 ティングリー, ホイットモア
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080-4990, サウス サンフランシスコ, ディ
 ーエヌエー ウェイ 1
 (72)発明者 デイヴィス, ジョン ダグラス
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080-4990, サウス サンフランシスコ, ディ
 ーエヌエー ウェイ 1
 (72)発明者 ブッダ, ナーゲーシュワル アール.
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080-4990, サウス サンフランシスコ, ディ
 ーエヌエー ウェイ 1

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA53 CA06 DA02 EA02 EA04 HA03
 4B064 AG27 CA10 CA19 CC24 CE02 CE12 DA06 DA13
 4B065 AA90X AB01 AB04 BA02 CA25 CA44 CA46
 4C076 BB16 CC21 CC29 DD51 DD51G DD51Q DD60 DD60G DD60Q EE23
 EE23G EE23Q FF17 FF63 FF68
 4C085 AA13 AA14 CC01 CC08 DD62 EE01 EE05 GG04
 4C086 AA01 AA02 BC05 BC13 BC17 BC28 BC42 MA01 MA02 MA03
 MA04 MA05 MA07 NA05 NA14 ZC33 ZC75
 4C206 AA01 AA02 DB03 DB56 MA01 MA02 MA03 MA04 MA05 MA11
 NA05 NA14 ZC33 ZC75
 4H045 AA11 AA20 AA30 DA76 EA20 EA50 FA74 GA26