

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2017年10月12日 (12.10.2017)



(10) 国际公布号
WO 2017/174017 A1

- (51) 国际专利分类号:
C07K 16/40 (2006.01) A61P 9/10 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01) A61P 7/02 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) G01N 33/577 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2017/079655
- (22) 国际申请日: 2017年4月7日 (07.04.2017)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201610213460.1 2016年4月7日 (07.04.2016) CN
- (71) 申请人: 迈博斯(香港)科技有限公司 (MAB-SCIENCE (HONG KONG) LIMITED) [CN/CN]; 中国香港特别行政区金钟红棉路8号东昌大厦402室, Hong Kong 999077 (CN)。
- (72) 发明人: 王少雄 (WANG, Shao Xiong); 中国香港特别行政区金钟红棉路8号东昌大厦402室, Hong Kong 999077 (CN)。
- (74) 代理人: 上海专利商标事务所有限公司 (SHANGHAI PATENT & TRADEMARK LAW OFFICE, LLC); 中国上海市桂平路435号, Shanghai 200233 (CN)。
- (81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。
- (84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

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

(54) Title: PROPROTEIN CONVERTASE SUBTILISIN KEXIN TYPE 9 BINDING PROTEIN AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 前蛋白转化酶枯草溶菌素 kexin 9 型的结合蛋白及其应用

(57) Abstract: A proprotein convertase subtilisin kexin type 9 (PCSK9) binding protein with a unique complementarity-determining region and specific binding activity, and application thereof. The binding protein can specifically bind to PCSK9 to effectively suppress a function of PCSK9 and reduce the level of plasma LDL-cholesterol. The binding protein can be used to treat diseases related to a PCSK9 function or affected by the PCSK9 function.

(57) 摘要: 一种含有独特的互补决定区的特异性结合前蛋白转化酶枯草溶菌素 kexin 9 型(PCSK9)的结合蛋白, 其能与 PCSK9 特异性结合并有效抑制 PCSK9 的功能、降低血浆中 LDL 胆固醇水平, 可以应用于治疗与 PCSK9 功能相关或者是受到 PCSK9 功能影响的疾病。



WO 2017/174017 A1

前蛋白转化酶枯草溶菌素 kexin 9 型的结合蛋白及其应用

技术领域

本发明属于免疫学领域，更具体地，本发明涉及前蛋白转化酶枯草溶菌素
5 kexin 9 型(Proprotein convertase subtilisin kexin type 9, PCSK9)的结合蛋白及其应
用。

背景技术

心血管疾病是导致人类死亡的头号杀手。低密度脂蛋白胆固醇(Low-density
10 lipoprotein cholesterol, LDL-C)已被证实是导致心血管疾病的主要因素之一。
LDL-C 的这种作用是相对独立且可以有效控制的，在过去 20 年中，他汀(statins)
类降脂药的使用成功地减少了心血管疾病的发病率。

但是他汀类药物治疗的方法却不总是有效的，还存在着一种另外的降血脂疗
法的需求。一部分病人，尤其是家族性高胆固醇血症(familial hypercholesterolaemia
15 FH)患者，往往对于他汀类的药物很不敏感。即使使用了最高剂量的他汀类药物，
这些患者也很难达到一个较低的 LDL-C 水平。此外，他汀类药物还存在着一些诸
如引起肌痛及横纹肌溶解等副作用，导致一些病人不能使用或者只能很小剂量使
用他汀类药物来控制血脂水平。前蛋白转化酶枯草杆菌蛋白酶 kexin9 型(PCSK9)抑
制剂正是一种这样的全新药物类型，提供了一个全新的控制血液中 LDL-C 浓度的
20 选择。

PCSK9 是一种丝氨酸蛋白酶，参与调解低密度脂蛋白受体(Low-density
lipoprotein receptor, LDLR)的水平。体外实验证实，在 HepG2 细胞中加入 PCSK9
之后，细胞表面的 LDLR 水平降低。小鼠实验显示，PCSK9 蛋白水平的提高能降
低肝脏中 LDLR 的蛋白水平，同时，相对于正常小鼠，在 PCSK9 敲除小鼠中 LDLR
25 水平有所提高。业已显示 PCSK9 与 LDLR 直接结合，并与 LDLR 同时被吞噬，
在整个内吞途径中 PCSK9 与 LDLR 共发生免疫荧光。目前没有 PCSK9 降解胞外
LDLR 的直接证据，其降低胞外 LDLR 蛋白水平的机制尚不明确。

研究已证实 PCSK9 在调控 LDL 产生中起作用。PCSK9 的表达或上调与增加
的 LDL 胆固醇的血浆水平有关，PCSK9 表达的抑制或缺乏与 LDL 胆固醇血浆水
30 平低有关。

因此，制备抑制或拮抗 PCSK9 活性和 PCSK9 在各种治疗状况下所发挥的相

应作用的、基于治疗的 PCSK9 拮抗剂尤其是特异性结合 PCSK9 的单克隆抗体非常重要。目前在研的 PCSK9 抑制剂大概包括小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA)、反义寡核苷酸 (antisense oligonucleotides, ASOs)、单克隆抗体以及一些应用新技术产生的特异性结合融合蛋白, 如 adnectin 技术产生的融合蛋白。目前正在研究的 PCSK9 抑制剂主要是 siRNA 类药物 RG7652 (Alnylam Pharmaceuticals/The Medicines Company), Adnectin 技术融合蛋白 BMS-962476 (BMS), ASO 类药物 ALN-PCS02 (Idera Pharmaceuticals), 抗体类药物如 Bococizumab (Pfizer/Rinat)、LGT-209 (Novartis) 等。

但是, 动物试验或临床研究中发现, 一些 PCSK9 单克隆抗体类抑制剂, 还存在着特异性、亲和力不够理想或存在副作用的问题, 因此, 本领域需要进一步优化及制备新的抗 PCSK9 抗体。

发明内容

本发明的目的在于提供前蛋白转化酶枯草溶菌素 kexin 9 型 (PCSK9) 的结合蛋白及其应用。

在本发明的第一方面, 提供特异性结合 PCSK9 的结合蛋白, 该结合蛋白具有轻链可变区和重链可变区, 且,

其重链可变区的 CDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列;

其重链可变区的 CDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 8 所示;

其重链可变区的 CDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9 或 SEQ ID NO: 13 所示的氨基酸序列;

其轻链可变区的 CDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 10 所示;

其轻链可变区的 CDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11 所示;

其轻链可变区的 CDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 12 所示。

在本发明的一个优选例中, 所述的特异性结合 PCSK9 的结合蛋白选自:

(a), 其重链可变区的 CDR1、CDR2 和 CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9 所示; 其轻链可变区的 CDR1、CDR2 和 CDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12 所示; 或

(b), 其重链可变区的 CDR1、CDR2 和 CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 13 所示; 其轻链可变区的 CDR1、CDR2 和 CDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12 所示。

在另一优选例中，所述的特异性结合 PCSK9 的结合蛋白，其特征在于，其重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2 和 SEQ ID NO: 4 所示；或其重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 6 和 SEQ ID NO: 8 所示。

在另一优选例中，所述的结合蛋白是 Fab、F(ab')、F(ab')₂、Fv、dAb、Fd、
5 互补决定区(CDR)片段、单链抗体(scFv)、二价单链抗体、单链噬菌体抗体、双特异双链抗体、三链抗体、四链抗体。

在另一优选例中，所述的结合蛋白是单克隆抗体。

在另一优选例中，所述的结合蛋白的重链可变区和轻链可变区分别具有 SEQ ID NO: 2(含有前导肽)和 SEQ ID NO: 4(含有前导肽)所示的氨基酸序列，或分别具有 SEQ ID NO: 6(含有前导肽)和 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列，或其重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 22(不含有前导肽)和 SEQ ID NO: 24
10 不含有前导肽)所示，或其重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 26 和 SEQ ID NO: 24 所示。其重链恒定区选择下组中重链类型之一的恒定区：IgG1、IgG2a、IgG2b 和 IgG3，和其轻链恒定区选择下组轻链类型的恒定区之一：
15 κ 链和 λ 链；

在本发明的另一方面，提供编码所述的特异性结合 PCSK9 的结合蛋白的核酸。

在本发明的另一方面，提供一种表达载体，其包含所述的核酸。

在本发明的另一方面，提供一种宿主细胞，其包含所述的表达载体或基因组
20 中整合有所述的核酸。

在本发明的另一方面，提供所述的特异性结合 PCSK9 的结合蛋白在制备用于诊断、治疗和/或预防 PCSK9 表达或活性失调相关疾病的药物中的用途。

在一个优选例中，所述的 PCSK9 表达或活性失调相关疾病包括但不限于：高血清胆固醇水平相关的病症；较佳地，包括：高胆固醇血症，冠心病，代谢综合征，急性冠状动脉综合症。
25

在本发明的另一方面，提供一种药物组合物，所述药物组合物含有：有效量的所述的特异性结合 PCSK9 的结合蛋白；和药学上可接受的载体。

在本发明的另一方面，提供一种用于治疗 and/或预防 PCSK9 表达或活性失调相关疾病的药盒，该药盒中包括：所述的特异性结合 PCSK9 的结合蛋白；或所述的
30 药物组合物。

在本发明的另一方面，提供一种免疫缀合物，所述的免疫缀合物包括：所述

的特异性结合 PCSK9 的结合蛋白；以及可检测标记物；较佳地，所述可检测标记物包括：荧光标记物、显色标记物。

在本发明的另一方面，提供一种用于检测 PCSK9 水平的检测试剂盒，该检测试剂盒中包括：所述的特异性结合 PCSK9 的结合蛋白；或所述的免疫缀合物。

5 本发明的其它方面由于本文的公开内容，对本领域的技术人员而言是显而易见的。

附图说明

10 图 1、单克隆抗体 B9287、B9288 分别对于人 PCSK9 抗原、小鼠 PCSK9 抗原、食蟹猕猴 PCSK9 抗原的动力学分析结果。

图 2、本发明的抗原结合蛋白降低细胞吸收 LDL 的能力测定。

15 图 3、抗 PCSK9 优选抗体对高脂血症恒河猴血清 LDL 水平的反应。每组各有 4 只年龄 >7 岁的公及母恒河猴，于第 0 天经皮下注射以给予所示剂量的 PCSK9 优选抗体或相等体积的盐水载体。在所示时间点采集血浆样本及测量血浆 LDL 量与第 0 天的血清 LDL 量相比较。

具体实施方式

20 本发明人经过广泛而深入的研究，获得一种含有独特的互补决定区(CDR 区)的特异性结合前蛋白转化酶枯草溶菌素 kexin 9 型 (Proprotein convertase subtilisin kexin type 9, PCSK9) 的结合蛋白，其能与 PCSK9 特异性结合并有效抑制 PCSK9 的功能、降低血浆中 LDL 胆固醇水平，可以应用于治疗与 PCSK9 功能相关或者是受到 PCSK9 功能影响的疾病。

结合蛋白

25 本发明提供了能特异性结合 PCSK9 的结合蛋白。本发明的结合蛋白可以是完整的免疫球蛋白分子，也可以是抗原结合片段，包括但不限于 Fab 片段，Fd 片段，Fv 片段，F(ab')₂ 片段、互补决定区(CDR)片段、单链抗体(scFv)、结构域抗体，二价单链抗体、单链噬菌体抗体、双特异双链抗体、三链抗体、四链抗体等。

30 CDR区是免疫学感兴趣的蛋白质的序列。在本发明的实施方案中，结合蛋白可包含本文揭示的二、三、四、五或者所有六个CDR区。优选地，本发明的结合蛋白包含本文揭示的至少两个CDR。

本发明的另一方面包括本文所述结合蛋白的功能变体。如果变体能与亲代结合蛋白竞争特异性结合PCSK9,则认为该变体分子是本发明结合蛋白的功能变体。换句话说,所述功能变体仍能结合PCSK9或其片段。功能变体包括但不限于一级结构序列基本相似、但是含有例如在亲代结合蛋白中未发现的体外或体内化学和/或生物化学修饰的衍生物。这种修饰包括乙酰化、酰化、核苷酸或者核苷酸衍生物的共价附着、脂质或者脂质衍生物的共价附着、交联、二硫键形成、糖基化、羟基化、甲基化、氧化、聚乙二醇化、蛋白酶解加工、磷酸化等。换句话说,亲代结合蛋白的氨基酸和/或核苷酸序列中的修饰不显著影响或改变由所述核苷酸序列编码的或者含有所述氨基酸序列的所述结合蛋白的结合特性,即所述结合蛋白仍能识别并结合其靶位。

所述功能变体可以具有保守序列修饰,包括核苷酸和氨基酸取代、添加和缺失。这些修饰可以通过本领域已知的标准技术导入,例如定向诱变和随机PCR介导的诱变,并且可包含天然以及非天然核苷酸和氨基酸。

保守氨基酸取代包括其中氨基酸残基由具有相似结构或者化学性质的另一氨基酸残基置换的取代。具有相似侧链的氨基酸残基的家族已经在本领域中限定。这些家族包括具有碱性侧链的氨基酸(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链氨基酸(例如天冬氨酸、谷氨酸)、无电荷极性侧链氨基酸(例如天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸)、非极性侧链氨基酸(例如甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸)、分支侧链氨基酸(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)以及芳香侧链氨基酸(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸)。本领域技术人员明白也可以使用除了上述家族之外的其它氨基酸残基家族分类方式。另外,变体可具有非保守的氨基酸取代,例如氨基酸由具有不同结构或者化学性质的另一氨基酸残基置换。相似的小变异也可包括氨基酸缺失或者插入,或者这二者。使用本领域熟知的计算机程序可以发现确定哪些氨基酸残基可以被取代、插入或者缺失而不消除免疫学活性的指导。

功能变体可包含氨基酸序列在氨基末端或者羧基末端或者这两端的截短体。本发明的功能变体与亲代结合蛋白相比可具有相同或不同的、更高或更低的结合亲和性,但是仍能结合PCSK9或其片段。例如,本发明的功能变体与亲代结合蛋白相比对于PCSK9或其片段可具有增加或降低(优选增加)的结合亲和性。优选地,可变区包括但不限于构架区、高变区或CDR区的氨基酸序列被修饰。通常,轻链和重链可变区包含三个高变区,包括三个CDR,以及更保守的区域,即所谓的构

架区((FR)。高变区包含来自CDR的氨基酸残基和来自高变环的氨基酸残基。在本发明范围内的功能变体与本文所述亲代结合蛋白具有至少大约50%至大约99%、优选至少大约60%至大约99%、更优选至少大约70%至大约99%、甚至更优选至少大约80%至大约99%、最优选至少大约90%至大约99%、特别是至少大约95%至大约99%，以及特别是至少大约97%至大约99%的氨基酸序列同源性。本领域技术人员已知的计算机算法如Gap或者Bestfit可用于最佳地排列氨基酸序列以进行对比以及明确相似或相同的氨基酸残基。功能变体可以通过使用本领域已知的普通分子生物学方法改变亲代结合蛋白或其一部分而获得，所述方法包括但不限于易错PCR、寡核苷酸指导的诱变、定点诱变以及重链和/或轻链改组法。

5 作为本发明的优选方式，所述的结合蛋白是单克隆抗体。抗体的抗原结合特性可由位于重链和轻链可变区的3个特定的区域来描述，称为互补决定区(CDR)，所述的CDR区将可变区间隔成4个框架区域(FR)，4个FR的氨基酸序列相对比较保守，不直接参与结合反应。这些CDR形成环状结构，通过其间的FR形成的 β 折叠在空间结构上相互靠近，重链上的CDR和相应轻链上的CDR构成了抗体的抗原结合位点。本发明的抗PCSK9单克隆抗体的CDR区是全新的，不同于现有的抗PCSK9抗体。

15 本发明的单克隆抗体是全人源的，具有免疫原性低、安全性高的特点。

20 本发明另一方面提供了编码本发明的至少一种结合蛋白、其功能变体或者免疫缀合物的核酸分子。这种核酸分子可以用作中间物以进行克隆，例如用于如上述的亲和力成熟方法中。在一个优选的实施方案中，所述核酸分子是分离或纯化的。DNA分子的序列可以用常规技术，或利用杂交瘤技术获得。

25 一旦获得了有关的序列，就可以用重组法来大批量地获得有关序列。这通常是将其克隆入载体，再转入细胞，然后通过常规方法从增殖后的宿主细胞中分离得到有关序列。

此外，还可用人工合成的方法来合成有关序列，尤其是片段长度较短时。通常，通过先合成多个小片段，然后再进行连接可获得序列很长的片段。

30 目前，已经可以完全通过化学合成来得到编码本发明的结合蛋白(或其片段，或其衍生物)的DNA序列。然后可将该DNA序列引入本领域中已知的各种现有的DNA分子(或如载体)和细胞中。此外，还可通过化学合成将突变引入本发明的结合蛋白的序列中。

本发明还涉及包含上述的适当DNA序列以及适当启动子或者控制序列的载体。这些载体可以用于转化适当的宿主细胞，以使其能够表达蛋白质。优选的，本发明的载体是例如含病毒启动子的质粒表达载体，且在所述表达载体中分别插入了抗PCSK9单克隆抗体重链可变区(VH)与恒定区的IgG2(来自人源IgG2的恒定区)融合序列和轻链可变区VL与人体IgLambda (来自人源Iglambda的恒定区)融合序列。

宿主细胞可以是原核细胞，如细菌细胞；或是低等真核细胞，如酵母细胞；或是高等真核细胞，如哺乳动物细胞。代表性例子有：细菌细胞如大肠杆菌，链霉菌属；鼠伤寒沙门氏菌；真菌细胞如酵母；植物细胞；昆虫细胞如果蝇S2或Sf9；动物细胞如CHO、COS7、NSO或Bowes黑素瘤细胞等。特别适用于本发明的宿主细胞是真核宿主细胞，尤其是哺乳动物细胞，如CHO细胞、293细胞。

如果需要，可利用其物理的、化学的和其它特性通过各种分离方法分离和纯化重组的结合蛋白。这些方法是本领域技术人员所熟知的。这些方法的例子包括但并不限于：常规的复性处理、用蛋白沉淀剂处理(盐析方法)、离心、渗透破菌、超声处理、超离心、分子筛层析(凝胶过滤)、吸附层析、离子交换层析、高效液相层析(HPLC)和其它各种液相层析技术及这些方法的结合。

药物组合物

本发明的结合分子可用于制备诊断、治疗和/或预防PCSK9表达或活性失调相关疾病的药物组合物。

所述的“PCSK9表达或活性失调相关疾病”包括高血清胆固醇水平相关的病症。较佳地，所述的“PCSK9表达或活性失调相关疾病”包括但不限于高胆固醇血症、冠心病、代谢综合征、急性冠状动脉综合症以及相关病症。所述PCSK9功能指需要PCSK9参与或者被PCSK9加剧或增强的任何活性及功能。所述PCSK9单抗还可在检测和定量PCSK9，以用于各种诊断目的。

基于本发明的新发现，还提供了一种可诊断、治疗和/或预防PCSK9表达或活性失调相关疾病的药物组合物，其包含：有效量的本发明所述的结合分子；以及药学上可接受的载体。

本文所用的术语“药学上可接受的”是指当分子本体和组合物适当地给予动物或人时，它们不会产生不利的、过敏的或其它不良反应。本文所用的“药学上可接受的载体”应当与本发明的结合分子相容，即能与其共混而不会在通常情况下大幅

度降低组合物的效果。

可作为药学上可接受的载体或其组分的一些物质的具体例子是糖类，如乳糖、葡萄糖和蔗糖；淀粉，如玉米淀粉和土豆淀粉；纤维素及其衍生物，如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和甲基纤维素；西黄蓍胶粉末；麦芽；明胶；滑石；固体润滑剂，如硬脂酸和硬脂酸镁；硫酸钙；植物油，如花生油、棉籽油、芝麻油、橄榄油、玉米油和可可油；多元醇，如丙二醇、甘油、山梨糖醇、甘露糖醇和聚乙二醇；海藻酸；乳化剂，如 Tween®；润湿剂，如月桂基硫酸钠；着色剂；调味剂；压片剂、稳定剂；抗氧化剂；防腐剂；无热原水；等渗盐溶液；和磷酸盐缓冲液等。

10 本发明的药物组合物可根据需要制成各种剂型，并可由医师根据患者种类、年龄、体重和大致疾病状况、给药方式等因素确定对病人有益的剂量进行施用。给药方式例如可以采用注射或其它治疗方式。

本发明的结合分子可以以未分离的或者分离的形式使用。此外，本发明的结合分子可以单独应用或者于包含至少一种本发明的结合分子(或其变体或片段)的混合物中应用。换句话说，所述结合分子可以组合应用，例如作为包含两或更多种本发明的结合分子、其变体或片段的药物组合物。例如，具有不同但互补活性的结合分子可以组合在一个治疗方案中以达到希望的预防、治疗或诊断作用，但是或者也可以将具有相同活性的结合分子组合在一个治疗方案中以达到希望的预防、治疗或诊断作用。

20 本发明的结合分子或药物组合在用于人体之前可以在合适的动物模型系统中检测。这种动物模型系统包括但不限于小鼠、猴。

本发明的结合分子的合适的剂量范围可例如是 0.001-100mg/kg 体重，优选 0.01-15mg/kg 体重。此外，例如可以给予一次推注、随时间给予多次分开剂量或者根据治疗情况的紧急性而可以按比例降低或增加剂量。本发明的分子和组合物 25 优选是无菌的。使得这些分子和组合物无菌的方法为本领域所熟知。用于诊断、预防和/或治疗的其它分子可以以与本发明的结合分子相似的给药方案给予。如果单独给予其它分子，则可以在给予本发明的一或多种结合分子或药物组合物之前、同时或者之后给予患者。对于人患者的精确给药方案通常在临床实验期间挑选出。

30 本发明所述的结合分子可被置于适当的包装中，制成药盒，以便于临床医师使用。较佳地，所述的药盒中也可包含说明如何给药的使用说明书。

本发明还包括降低血清胆固醇水平、治疗或预防患者中与高血清胆固醇水平

相关的疾病的方法，所述方法包括给予患者有效量的本发明的至少一种单克隆抗体。较佳地，可以将本发明的单克隆抗体与提高 LDLR 蛋白的利用率的药剂联合给药。所述的提高 LDLR 蛋白的利用率的药剂包括：阿托伐他汀，西立伐他汀，氟伐他汀，洛伐他汀，美伐他汀，匹伐他汀，罗苏伐他汀，辛伐他汀，也可以选用两种以上所述的提高 LDLR 蛋白的利用率的药剂。

免疫缀合物

另一方面，本发明包括免疫缀合物，即包含本文所述至少一个结合蛋白以及进一步包含至少一个功能性分子(如可检测的部分/物质的分子)。所述抗体与所述功能性分子可以通过共价连接、偶联、附着、交联等方式构成缀合物。本发明的免疫缀合物可包含一个以上的标记。所述标记也可以通过共价键与本发明的结合蛋白直接结合/缀合。或者，所述标记可以通过一或多种连接化合物与所述结合蛋白结合/缀合。标记与结合蛋白的缀合技术为本领域技术人员所熟知。本发明的免疫缀合物的标记也可以是治疗剂。

所述免疫缀合物可包含：本发明的抗体以及可检测标记物。所述的可检测标记物包括但不限于：荧光标记物、显色标记物；如：酶、辅基、荧光材料、发光材料，生物发光材料、放射性材料、正电子发射金属以及非放射性顺磁性金属离子。也可包含一个以上的标记物。为了检测和/或分析和/或诊断目的用于标记抗体的标记依赖于使用的特定检测/分析/诊断技术和/或方法例如免疫组织化学染色(组织)样品、流式细胞计量术等。对于本领域已知的检测/分析/诊断技术和/或方法合适的标记为本领域技术人员所熟知。

此外，本发明的人结合蛋白或者免疫缀合物也可以附着于固体支持物上，其特别用于 PCSK9 蛋白或其片段的体外免疫测定或者纯化。这种固体支持物可以是多孔或者无孔的、平面或非平面的。本发明的结合蛋白可以与标记序列融合以便于纯化。所述标记序列的例子包括但不限于六组氨酸标记、血凝素(HA)标记、myc 标记或者 flag 标记。或者，一种抗体可以与另一种抗体缀合形成抗体异源缀合物(heteroconjugate)。

本发明的结合蛋白(抗体)的序列可以包含前导肽或不包含前导肽，当被细胞表达后，成熟的结合蛋白(抗体)不包含前导肽。

检测试剂和试剂盒

以本发明所述的结合分子为基础，可制备方便、快速且准确地检测待测样品中 PCSK9 水平的试剂或试剂盒。

如本文所用，术语“待测样品”涵盖了多种样品类型，包括生物学来源的血液及其它体液样品，实体组织样品如活检组织样品或者组织培养物，或者衍生自其中的细胞或者其后代。该术语还包括在获得后已经通过任何方式处理的样品，例如用试剂处理、溶解、或者富集某些成分如蛋白质或者多核苷酸。

因此，本发明提供了一种用于检测待测样品中 PCSK9 水平的检测试剂盒，该试剂盒中含有本发明的 PCSK9 结合分子，或 PCSK9 结合分子与可检测标记物构成的免疫缀合物。

在获得了本发明提供的 PCSK9 结合分子后，可以方便地制备出用于特异性检测 PCSK9 水平的检测试剂盒。

为了在检测时更方便，所述试剂盒中除了含有本发明的结合分子或含有 PCSK9 结合分子与可检测标记物构成的免疫缀合物以外，还可以包含其它检测试剂或辅助试剂，所述的辅助试剂例如是 ELISA 试剂盒中常规使用的一些试剂，这些试剂的特性以及它们的配制方法均是本领域技术人员所熟知的，如显色剂、标记物、二抗、抗抗体、增敏剂等。本领域人员应理解，各种变化形式的检测试剂盒均是包含在本发明中的，只要在其中利用了本发明的结合分子作为识别 PCSK9 的试剂。

此外，在所述试剂盒中还可包含使用说明书，用于说明其中装载的试剂的使用方法。

在获得了本发明提供的结合分子和/或试剂盒后，可以利用多种免疫学相关方法来检测样品中 PCSK9 或其含量，从而得知待测样品的供体是否存在 PCSK9 表达或活性失调相关疾病。

下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件如 J.萨姆布鲁克等编著，分子克隆实验指南，第三版，科学出版社，2002 中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。

30 实施例 1、PCSK9 单克隆抗体的优化与筛选

为了找寻符合要求的 PCSK9 抗体，本发明人经过大量的研究和筛选，从全人

源噬菌体库中获得了两株性能优异的单克隆抗体。它们的可变结构域的核酸序列及氨基酸序列描述如下：

1、单克隆抗体 B9287

含有前导肽的重链可变区核苷酸序列如 SEQ ID NO: 1；不含有前导肽的重链可变区核苷酸序列如 SEQ ID NO: 21。

含有前导肽的重链可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2；不含有前导肽的重链可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO: 22。

重链的各 CDR 区氨基酸序列：

HCDR1: AFTFDSFGMH (SEQ ID NO: 7);

10 HCDR2: LLWSDGSDEYYADSAKG (SEQ ID NO: 8);

HCDR3: AVGAIYQFYAMDV (SEQ ID NO: 9)。

重链各 CDR 区的核苷酸序列：

HCDR1: GCCTTCACCTTCGACAGCTTCGGCATGCAC (SEQ ID NO: 14);

15 HCDR2 : CTGCTTTGGAGCGACGGCTCCGACGAGTACTACGCCGACTCCGC
TAAGGGC (SEQ ID NO: 15);

HCDR3: GCGGTGGGCGCCATCTACCAGTTCTACGCCATGGACGTG (SEQ ID NO: 16)。

轻链可变区核苷酸序列如 SEQ ID NO: 3；不含有前导肽的轻链可变区核苷酸序列如 SEQ ID NO: 23。

20 轻链可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO: 4；不含有前导肽的轻链可变区核苷酸序列如 SEQ ID NO: 24。

轻链的各 CDR 区氨基酸序列：

LCDR1: TGTSSNIGNQFVS (SEQ ID NO: 10);

LCDR2: EYNKRPS (SEQ ID NO: 11);

25 LCDR3: GSWDSSLSGYV (SEQ ID NO: 12)。

轻链的各 CDR 区核苷酸序列：

LCDR1: ACCGGCACCTCCTCCAACATCGGCAACCAATTCGTGTCC (SEQ ID NO: 17);

LCDR2: GAGTACAACAAGCGGCCCTCC (SEQ ID NO: 18);

30 LCDR3: GGCTCCTGGGACTCTTCCCTGTCCGGCTATGTG (SEQ ID NO: 19)。

2、单克隆抗体 B9288

重链核苷酸序列如 SEQ ID NO: 5; 不含有前导肽的重链可变区核苷酸序列如 SEQ ID NO: 25。

重链氨基酸序列如 SEQ ID NO: 6; 不含有前导肽的重链可变区核苷酸序列如
5 SEQ ID NO: 26。

重链的各 CDR 区氨基酸序列:

HCDR1: AFTFDSFGMH (SEQ ID NO: 7);

HCDR2: LLWSDGSDEYYADSAKG (SEQ ID NO: 8);

HCDR3: AVGSIYYYYAMDV (SEQ ID NO: 13)。

10 重链的各 CDR 区核苷酸序列:

HCDR1: GCCTTCACCTTCGACAGCTTCGGCATGCAC (SEQ ID NO: 14);

HCDR2 : CTGCTTTGGAGCGACGGCTCCGACGAGTACTACGCCGACTC
CGCTAAGGGC (SEQ ID NO: 15);

HCDR3: GCGGTGGGCTCCATCTACTACTACTACGCCATGGACGTG (SEQ ID
15 NO: 20)。

单克隆抗体 B9288 轻链核苷酸和氨基酸序列同 B9287 的轻链核苷酸和氨基酸序列, 其相应的各 CDR 区也同 B9287。

实施例 2、由转染的细胞制备 PCSK9 单克隆抗体

20 将前述单克隆抗体 B9287 的重链核苷酸序列(SEQ ID NO: 1; 含前导肽编码序列)两端加上 HindIII/NotI 位点, 插入到 pCDNA3.1+质粒的相应位点中; 将前述单克隆抗体 B9287 的轻链核苷酸序列(SEQ ID NO: 3; 含前导肽编码序列)两端加上 HindIII/NotI 位点, 插入到 pCDNA3.1+质粒的相应位点中。获得表达所述单克隆抗体 B9287 的重组质粒。

25 将前述单克隆抗体 B9288 的重链核苷酸序列(SEQ ID NO: 5; 含前导肽编码序列)两端加上 HindIII/NotI 位点, 插入到 pCDNA3.1+质粒的相应位点中; 将前述单克隆抗体 B9288 的轻链核苷酸序列(SEQ ID NO: 3)两端加上 HindIII/NotI 位点, 插入到 pCDNA3.1+质粒的相应位点中。获得表达所述单克隆抗体 B9288 的重组质粒。

30 1、瞬时转染

将上述表达所述单克隆抗体 B9287 的重组质粒或表达所述单克隆抗体 B9288

的重组质粒用脂质体法瞬时转染悬浮 HEK293 细胞。

在 Expi293 Expression 培养基中，37℃，CO₂ 8%，120rpm 转速条件下培养前述获得的转染细胞。

5 经过大量培养的转染细胞，通过二级离心处理(第一级离心条件 10min，1000g；第二级离心条件 30min，10000g)，去除细胞和细胞碎片，得到上清液。将澄清的上清液装载入 Protein A 亲和层析柱，通过用三步淋洗(淋洗缓冲液依次为 PB 150mM NaCl pH6.5；20mM Na-citrate 1M NaCl pH5.5；20mM Na-citrate pH5.5)来去除杂质，然后通过 pH 线性洗脱方式(起始缓冲液 A：20mM Na-citrate pH5.5；目标缓冲液 B：20mM Na-citrate pH3.0)来分离捕获目标抗体。最后通过超
10 滤浓缩步骤将目标抗体置换至 200mM HEPE，100mM NaCl，50mM NaOAc pH7.0 缓冲液中。

2、稳定表达 B9287 的细胞的电转染

15 将构建好的含有 B9287 轻链(SEQ ID NO: 23)和 B9287 重链(SEQ ID NO: 21)的质粒(总量 20μg 的质粒 DNA)混合于 1.0×10^7 宿主细胞 CHO-K1 细胞；该细胞和质粒混合液放入到电转仪(Gene Pulser II)，利用电压 300V，电容 950μF 的指数衰减波对细胞和质粒混合液进行电击共转染。将已电转染的细胞和 DNA 混合液加入到含有 2mL 宿主细胞基础培养基(EX-CELL® Advanced™ CHO Fed-batch Medium, Sigma 含 6mM 的 L-glutamine, Sigma)的 6 孔板中，细胞放入二氧化碳
20 培养箱中，37℃ 培养 24h，然后将培养基更换成选择性生长培养基(EX-CELL® Advanced™ CHO Fed-batch Medium, Sigma; 含 Puromycin, 20μg/mL, GIBCO 和 6mM L-glutamine, Sigma)进行加压筛选约 3 周时间至细胞活力恢复至 90%以上，获得含有重链和轻链整合至 CHO-K1 基因组的 Pool 细胞系。待 Pool 细胞活力恢复至 90%以上时，在 125 mL 摇瓶进行 Fed-batch 培养，培养体积 30 mL，初
25 始细胞浓度 0.3×10^6 /mL。在第 3、5、7、9、11 和 13 天补加补料培养基(Ex-CELL Advanced CHO feed 1 (with glucose), Sigma)并取样检测细胞密度和活力，在葡萄糖浓度降至 3g/L 时加葡萄糖至 6 g/L，于活力降至 70%以下终止培养并检测抗体浓度。

30 3、稳定表达 B9287 转染体的半固体克隆和 ELISA 筛选

挑取抗体浓度较高的 Pool 细胞进行单克隆筛选,将含有 50-200 个 Pool 细胞的细胞悬液与 10mL 半固体培养基(CloneMedia CHO Growth A with L-Gln, Molecular devices) 混匀后铺在 100mm 培养皿中,于 37°C、5%CO₂ 培养箱中培养 14 天,挑取中度大小的细胞集转移至含有 200μL 选择培养基的 96 孔板中培养 4-5 天,将细胞悬液吹打混匀,平均分 2 块 96 孔板并分别补足新鲜培养基至 200μL 培养体系,其中 1 块板正常换液扩增,换液扩增时将细胞悬液吹打混匀,取 100μL 培养基并舍弃,补加 100μL 新鲜培养基,依此类推;另 1 块板则不换液连续培养 10 天,取细胞上清进行 ELISA 检测。根据 OD 值挑选细胞株进行扩增和亚克隆筛选。将第 1 轮半固体筛选得到的优选细胞株以 0.5 细胞/孔的密度铺 96 孔细胞板。7 天后对细胞进行观察,直到单细胞克隆生长到一定的筛选规模,挑选只有单个细胞群的孔作为单细胞孔。将 96 孔培养板单细胞孔的培养液(可进行适当稀释)转移到已包被的 ELISA 板,进行 ELISA 筛选分析,筛选至 TOP 3 单细胞系,做 Fed-Batch 进行表达量确认。

15 **实施例 3、PCSK9 单克隆抗体的生物分析表征**

1、毛细管电泳(CE-SDS)

通过 LabChip GXII 系统进行毛细管电泳分析抗体。结果表明,在还原和非还原条件下,本发明的 PCSK9 单克隆抗体(不包括前导肽,后同)样品的峰纯度百分比和分子量如表 1(非还原条件)和表 2(还原条件)所示。

20

表 1

ID#	主峰纯度% (非还原条件)	分子量 (kDa)
B9287	77.4%	177.67
B9288	80.4%	178.05

表 2

ID#	主峰纯度% (还原条件)	分子量 (kDa)
B9287	35.4%, 63.5%	36.82, 65.35

B9288	36.7%, 63.3%	36.80, 65.72
-------	--------------	--------------

2、分子筛液相色谱(SE-HPLC)

单克隆抗体通过 0.2 μ m 过滤器过滤(Thomson, 目录号 25535-100), 然后加载到 MAbPac SEC-1 柱(Thermo, 目录编号 07469620)。流动相缓冲为 50 mM 磷酸钠, 300 mM 氯化钠, pH 6.2, 流速为 0.2 ml/min。峰值计算使用 ChemStation 软件进行整合。本发明的 PCSK9 单克隆抗体的主峰和聚体峰的百分比如表 3 所示。

表 3

ID#	主峰纯度%	聚体纯度%
B9287	>99.9%	<0.01%
B9288	>99.9%	<0.01%

3、差示扫描量热法评价蛋白质的稳定性

差示扫描量热法(DSC)是一种在需要增加样本和参考温度的热量差异作为温度的函数的测量技术。差示扫描量热法可用于测量多个蛋白质的特性, 包括 50% 蛋白质变性(T_m)时的温度/融化温度, 这是评价蛋白质的稳定性的一种方法。

被检测抗体以 1mg/ml 的浓度被装入 Nano DSC 样品室, 从 25 $^{\circ}$ C 到 100 $^{\circ}$ C 以 1 $^{\circ}$ C/min 的速度升温进行。样品检测前预先扫描了 15 分钟以确保实施之前有个准确的起始温度。样品数据中减去了只有缓冲液的样品数值; 使用 Nano DSC 软件来计算 T_m。

结果见表 4。

表 4

ID#	T _m ($^{\circ}$ C)
B9287	63 $^{\circ}$ C, 74 $^{\circ}$ C
B9288	61 $^{\circ}$ C, 73 $^{\circ}$ C

20 实施例 4、抗体与 PCSK9 结合的表征

PCSK9 单抗与人、小鼠或食蟹猕猴 PCSK9 相结合的能力采用 Octet Red96 系统(ForteBio)来进行表征。抗人 IgG Fc(AHC)的动力学级生物传感器(Fortebio, #

18-5063)在 pH 1.7 的甘氨酸预处理后浸泡在测定缓冲液中。被检测 PCSK9 单克隆抗体以 10 μ g/ml 的浓度被固定到 AHC 生物传感器 120 秒。加载了 PCSK9 单克隆抗体的 AHC 生物传感器然后被浸入到不同浓度的人 PCSK9 抗原(GeneBank AX127530.1)、小鼠 PCSK9 抗原(NCBI NM_153565.2)或食蟹猕猴 PCSK9 抗原(NCBI NM_001112660.1)和缓冲液中。分析物柱的最后稀释点只包含检测缓冲液，以测试缓冲液与负载生物传感器之间的非特异性结合。从 80 到 120 秒检测到了抗原与抗体结合，随后 120 到 180 秒发生解离。用检测缓冲液确定了 60 秒的基线。抗 PCSK9 的单克隆抗体的亲和力曲线是以一个 1:1 结合的动力学传感单价结合模型拟合的。

10 动力学分析如图 1 和表 5 所示。

表 5

上样 ID	样品 ID	KD (M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)	Full X^2	Full R^2
B9287	huPCSK9	<1.0E-12	3.09E+05	<1.0E-07	0.0444	0.9989
B9288	huPCSK9	<1.0E-12	2.52E+05	<1.0E-07	0.016	0.9995
B9287	cynoPCSK9	2.9E-11	2.48E+05	7.21E-06	0.0102	0.9995
B9288	cynoPCSK9	4.1E-10	2.51E+05	1.03E-04	0.0126	0.999
B9287	msPCSK9	9.80E-09	2.70E+05	2.70E-03	0.0308	0.9994
B9288	msPCSK9	6.60E-09	1.40E+05	9.20E-04	0.0123	0.9994

实施例 5、细胞 LDL 吸收测定

15 将人 HepG2 细胞以每孔 5 \times 10⁴ 个细胞的浓度铺在黑色透明的 96-孔板(Costar)中的补充有 10% FBS 的 DMEM 培养基(Mediatech, Inc)中，并于 37 $^{\circ}$ C(5% CO₂)过夜孵育。为了形成 PCSK9 和抗体复合物，让 20 μ g/ml 的人 PCSK9 与用吸收缓冲液(含 10% FBS 的 DMEM)稀释的各种浓度的抗体或单用缓冲液(对照)在室温下孵育 1 小时。去除细胞上清后加入 PCSK9/抗体混合物，接着加入以 8 μ g/ml 最终浓度稀释在吸收缓冲液中的 Dil-LDL(Invitrogen)。在 37 $^{\circ}$ C(5% CO₂)孵育 16-18
20 小时后，用 PBS 彻底洗涤细胞，通过 TECAN M1000 554nm(激发)和 571nm(发射)检测细胞荧光信号。

细胞吸收测定结果示于图 2 中。概括地说，测定了 PCSK9 单克隆抗体的 IC50

值，具体来说数值为 3.94nM (B9287)和 1.46nM (B9288) pM(图 2)。

上述结果说明，本发明的抗原结合蛋白具有优异的降低细胞吸收 LDL 的能力。

5 实施例 6、恒河猴体内 PCSK9 单抗对于血液中 LDL 水平的影响

在高脂血症恒河猴中测试 PCSK9 单克隆抗体 B9287 降低非灵长类动物疾病模型体内血清 LDL 的效果。4 只 7 岁以上具有高脂血症的恒河猴于第 0 天经单次皮下注射方式注射载体(PBS+0.01 % Tween20)或以 3mg/kg 剂量的 PCSK9 单克隆抗体 B9287。分别于第 0、1、3、5、7、9、11、14 天隔夜禁食后分析血清 LDL 含量。

结果如图 3。单次注射 3mg/kg PCSK9 单克隆抗体 B9287 在所有 4 只动物中产生血清 LDL (50%及以上) 的大幅降低。

同样地，本发明人也在高脂血症恒河猴中测试 PCSK9 单克隆抗体 B9288 降低体内血清 LDL 的效果。结果也证明 PCSK9 单克隆抗体 B9288 能够显著降低恒河猴中血清 LDL 水平。

因此，PCSK9 抗体降低非人灵长动物疾病模型的血清 LDL 水平。

在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考，就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解，在阅读了本发明的上述讲授内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

权 利 要 求

1. 特异性结合 PCSK9 的结合蛋白，其特征在于，该结合蛋白具有轻链可变区和重链可变区，且，

5 其重链可变区的 CDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列；
其重链可变区的 CDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 8 所示；
其重链可变区的 CDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9 或 SEQ ID NO: 13 所示的氨基酸序列；

其轻链可变区的 CDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 10 所示；
10 其轻链可变区的 CDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11 所示；
其轻链可变区的 CDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 12 所示。

2. 如权利要求 1 所述的特异性结合 PCSK9 的结合蛋白，其特征在于，其选自：

(a), 其重链可变区的 CDR1、CDR2 和 CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9 所示；其轻链可变区的 CDR1、CDR2 和 CDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12 所示；或

(b), 其重链可变区的 CDR1、CDR2 和 CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 13 所示；其轻链可变区的 CDR1、CDR2 和 CDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12 所示。

25 3. 如权利要求 1 或 2 所述的特异性结合 PCSK9 的结合蛋白，其特征在于，其重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2 和 SEQ ID NO: 4 所示；
或

其重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 6 和 SEQ ID NO: 4 所示；或

其重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 22 和 SEQ ID NO: 24 所示；或

其重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 26 和 SEQ ID NO: 24 所示。

4. 编码权利要求 1-3 任一所述的特异性结合 PCSK9 的结合蛋白的核酸。

30 5. 一种表达载体，其包含权利要求 4 所述的核酸。

6. 一种宿主细胞，其包含权利要求 5 所述的表达载体或基因组中整合有权利

要求 4 所述的核酸。

7. 权利要求 1-3 任一所述的特异性结合 PCSK9 的结合蛋白在制备用于诊断、治疗和/或预防 PCSK9 表达或活性失调相关疾病的药物中的用途。

8. 如权利要求 7 所述的用途，其特征在于，所述的 PCSK9 表达或活性失调
5 相关疾病包括：高血清胆固醇水平相关的病症。

9. 如权利要求 8 所述的用途，其特征在于，包括：高胆固醇血症，冠心病，代谢综合征，急性冠状动脉综合症。

10. 一种药物组合物，其特征在于，所述药物组合物含有：
有效量的权利要求 1-3 任一所述的特异性结合 PCSK9 的结合蛋白；和
10 药理学上可接受的载体。

11. 一种用于治疗 and/或预防 PCSK9 表达或活性失调相关疾病的药盒，其特征
在于，该药盒中包括：

权利要求 1-3 任一所述的特异性结合 PCSK9 的结合蛋白；或
权利要求 10 所述的药物组合物。

12. 一种免疫缀合物，其特征在于，所述的免疫缀合物包括：
15 权利要求 1-3 任一所述的特异性结合 PCSK9 的结合蛋白；以及
可检测标记物。

13. 如权利要求 12 所述的免疫缀合物，其特征在于，所述可检测标记物包括：
荧光标记物、显色标记物。

14. 一种用于检测 PCSK9 水平的检测试剂盒，其特征在于，该检测试剂盒中
20 包括：

权利要求 1-3 任一所述的特异性结合 PCSK9 的结合蛋白；或
权利要求 12 所述的免疫缀合物。

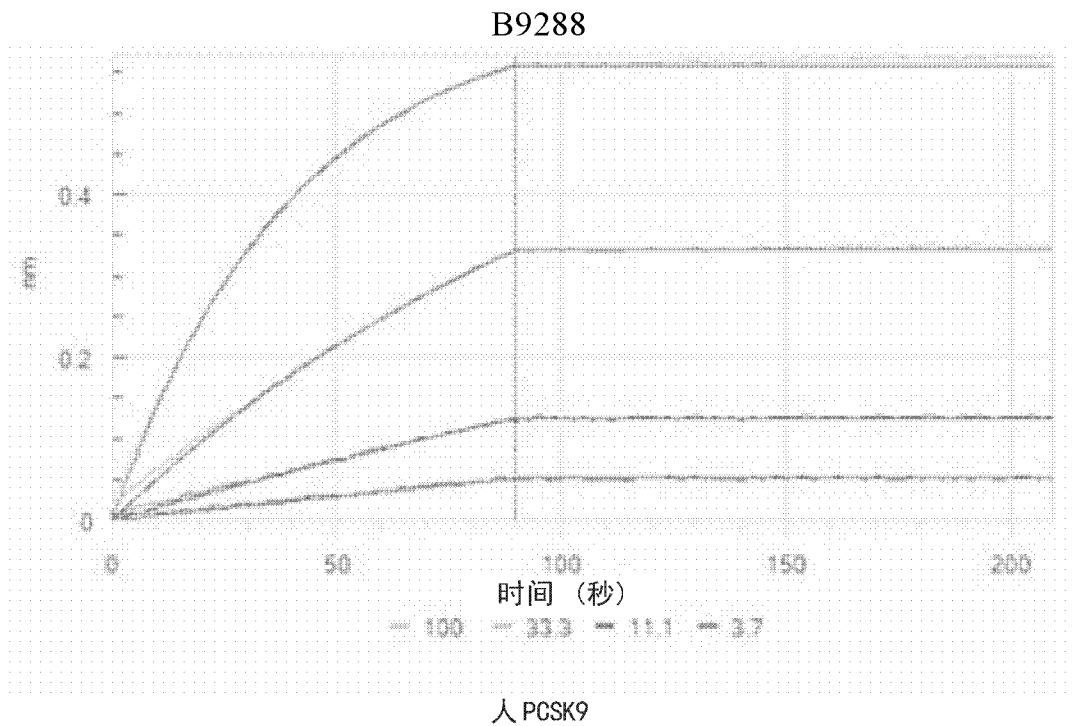
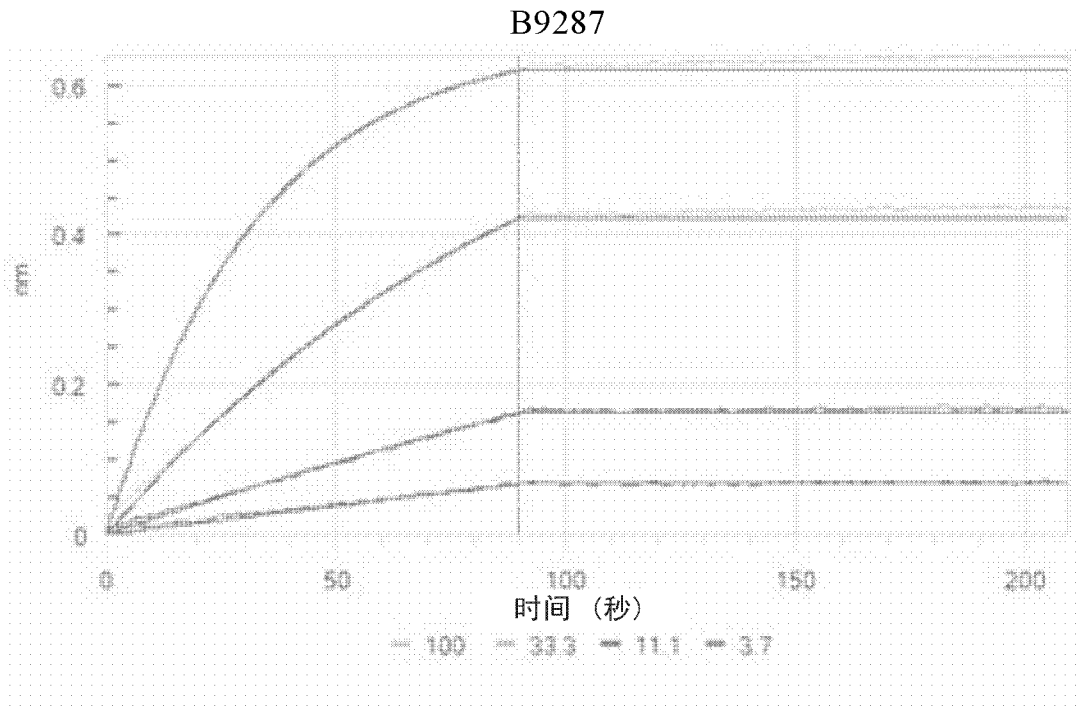
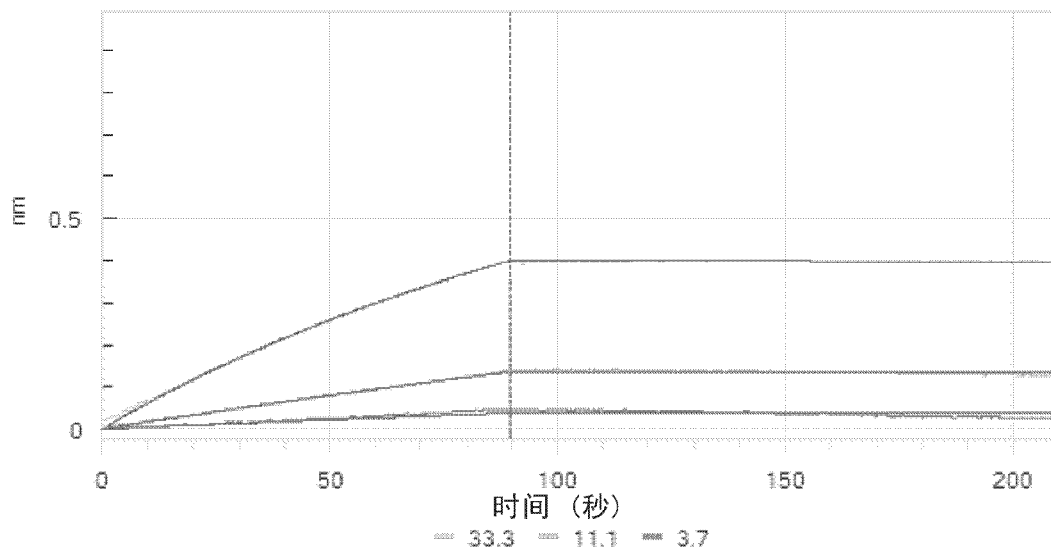
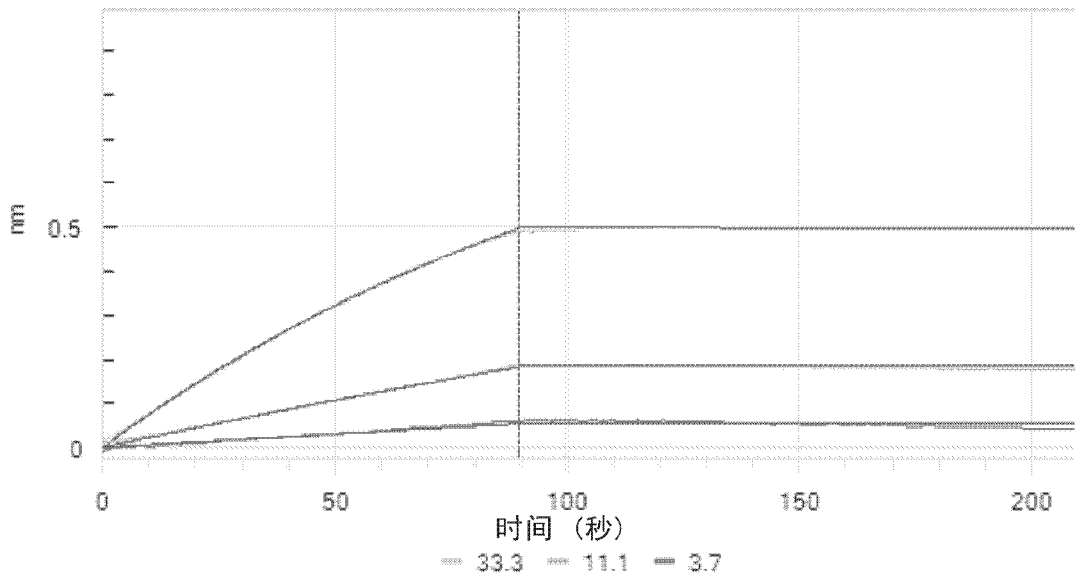
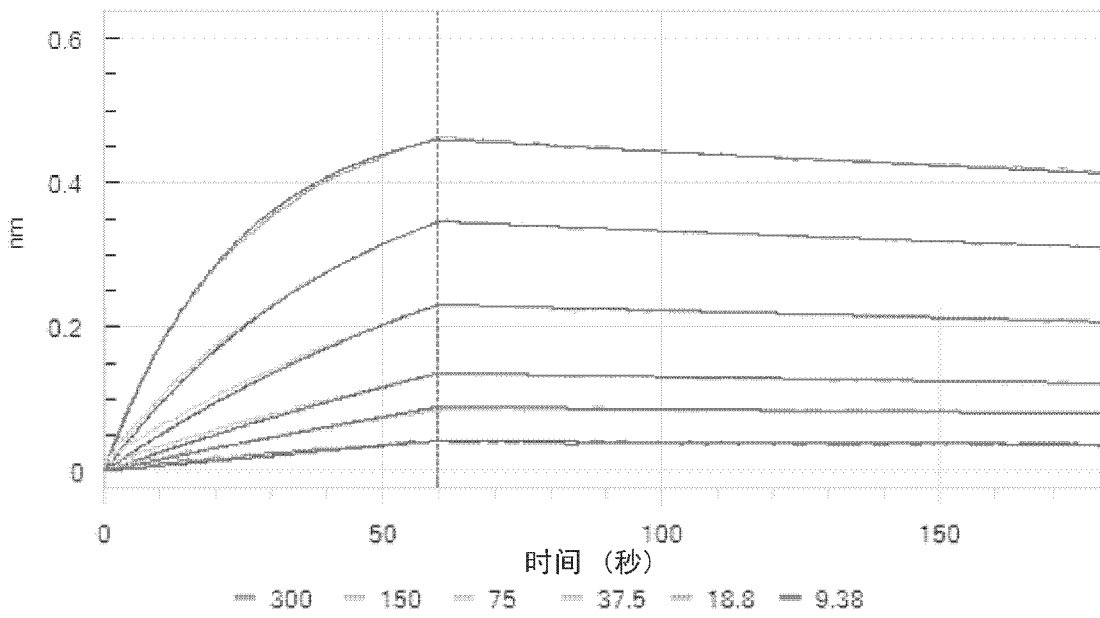
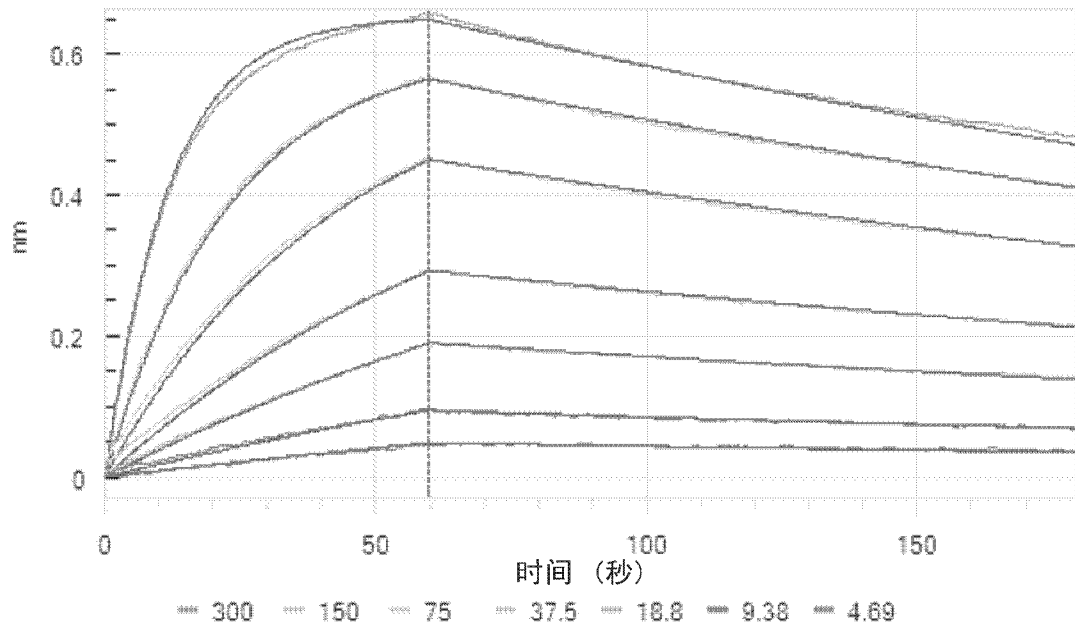


图 1



猴 PCSK9

图 1 (续)



小鼠 PCSK9

图 1 (续)

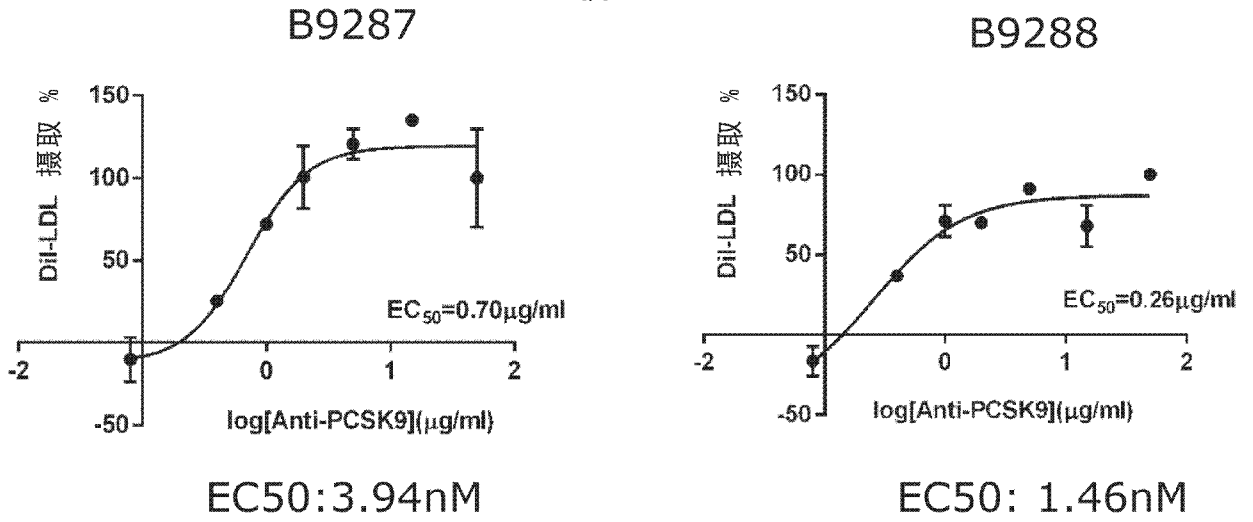


图 2

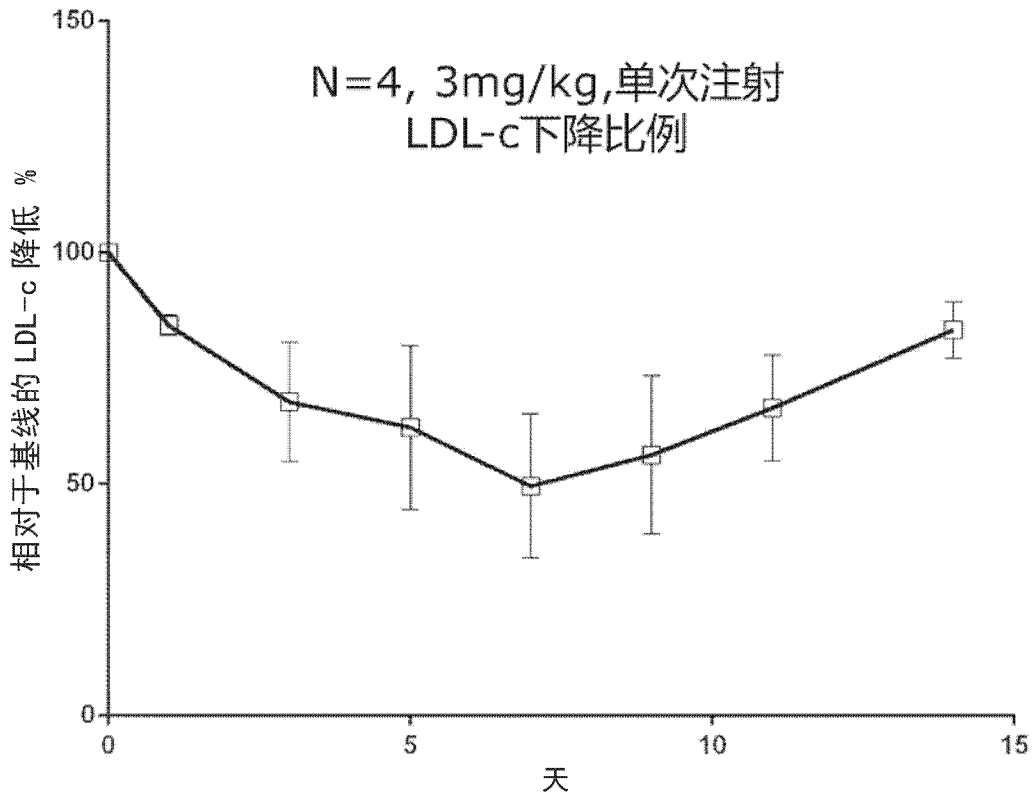


图 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2017/079655

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/40 (2006.01) i; C12N 15/13 (2006.01) i; A61K 39/395 (2006.01) i; A61P 9/00 (2006.01) i; A61P 9/10 (2006.01) i; A61P 7/02 (2006.01) i; G01N 33/577 (2006.01) i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K; C12N; A61K; A61P; G01N

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

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

CNABS; CPRSABS; CPEA; DWPI; SIPOABS; CNTXT; EPTXT; USTXT; WOTXT; GENBANK; EMBL-EBI; CNKI; GOOGLE; PubMed; ISI Web of Knowledge: MABSPACE (HONG KONG) TECHNOLOGY CO., LTD.; WANG, Shaoxiong; binding protein, bacteriophage library, IC50, EC50, PCSK9, Proprotein convertase subtilisin, inhibit+, ligand, bind+, antibod+, antagonist, SEQ ID NOs: 1-26

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 104583237 A (ALDERBIO HOLDINGS LLC), 29 April 2015 (29.04.2015), claims 1-139, 174-182, 260-375 and 404-405	1-14
X	CN 102333542 A (RINAT NEUROSCIENCE CORP. et al.), 25 January 2012 (25.01.2012), claims 1-24	1-14
X	CN 104861071 A (NANJING NORMAL UNIVERSITY), 26 August 2015 (26.08.2015), claims 1-9	1-14
X	CN 104364266 A (HOFFMANN-LA ROCHE INC.), 18 February 2015 (18.02.2015), claims 1-26 and 55-80	1-14
A	CN 105001336 A (SHANGHAI FUDAN-ZHANGJIANG BIO-PHARMACEUTICAL CO., LTD.), 28 October 2015 (28.10.2015), the whole document	1-14
A	CN 104447997 A (REGENERON PHARMACEUTICALS INC.), 25 March 2015 (25.03.2015), the whole document	1-14

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“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)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&” document member of the same patent family</p>
---	---

<p>Date of the actual completion of the international search</p> <p style="text-align: center;">08 June 2017 (08.06.2017)</p>	<p>Date of mailing of the international search report</p> <p style="text-align: center;">04 July 2017 (04.07.2017)</p>
<p>Name and mailing address of the ISA/CN:</p> <p>State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451</p>	<p>Authorized officer</p> <p style="text-align: center;">CHEN, Ying</p> <p>Telephone No.: (86-10) 62413889</p>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2017/079655

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 101636179 A (MERCK & CO., INC.), 27 January 2010 (27.01.2010), the whole document	1-14
A	WO 2008133647 A2 (MERCK & CO., INC. et al.), 06 November 2008 (06.11.2008), the whole document	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2017/079655

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 104583237 A	29 April 2015	EP 2844673 A4	20 April 2016
		MX 2014013612 A	26 October 2015
		CA 2872777 A1	14 November 2013
		TW 201348260 A	01 December 2013
		WO 2013169886 A1	14 November 2013
		US 2013302399 A1	14 November 2013
		AU 2013259562 A1	27 November 2014
		SG 11201407099W A	27 November 2014
		WO 2013169886 A9	23 January 2014
		KR 20150006471 A	16 January 2015
		JP 2015519050 A	09 July 2015
		US 2016194408 A1	07 July 2016
		EP 2844673 A1	11 March 2015
		US 9255154 B2	09 February 2016
		AR 092005 A1	18 March 2015
		RU 2011109178 A	20 September 2012
		CN 102333542 A	25 January 2012
NZ 591541 A	30 November 2012		
IL 211519 A	30 June 2016		
MX 2011002726 A	29 July 2011		
TW I445716 B	21 July 2014		
HK 1161136 A1	27 January 2017		
JP 2012107017 A	07 June 2012		
IL 229059 D0	31 December 2013		
US 8426363 B2	23 April 2013		
US 2010068199 A1	18 March 2010		
JP 6060212 B2	11 January 2017		
US 2012014951 A1	19 January 2012		
PE 19522015 A1	17 January 2016		
TW I516501 B	11 January 2016		
JP 5750421 B2	22 July 2015		
IL 229059 A	30 June 2016		
PH 12014501261 A1	07 December 2015		
US 8399646 B2	19 March 2013		
EP 2344194 A2	20 July 2011		
ZA 201101688 B	29 August 2012		
CN 102333542 B	20 January 2016		
US 9175093 B2	03 November 2015		
IL 211519 D0	31 May 2011		
US 8080243 B2	20 December 2011		
TW 201431882 A	16 August 2014		
US 2012015435 A1	19 January 2012		
AU 2009290438 B2	20 December 2012		
JP 2013078312 A	02 May 2013		
AR 073292 A1	28 October 2010		
CO 6351752 A2	20 December 2011		
RU 2014127686 A	10 February 2016		
JP 5119359 B2	16 January 2013		
WO 2010029513 A3	15 July 2010		
CA 2736349 A1	18 March 2010		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2017/079655

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 104861071 A CN 104364266 A	26 August 2015 18 February 2015	WO 2010029513 A2	18 March 2010
		JP 2012504388 A	23 February 2012
		KR 20110056317 A	26 May 2011
		US 2016096898 A1	07 April 2016
		JP 2015205883 A	19 November 2015
		AU 2009290438 A1	18 March 2010
		JP 4898976 B2	21 March 2012
		TW 201024321 A	01 July 2010
		KR 101230675 B1	13 February 2013
		US 2013273069 A1	17 October 2013
		CA 2736349 C	29 December 2015
		PE 08022011 A1	27 October 2011
		None	
		EP 2861624 A1	22 April 2015
CN 105001336 A CN 104447997 A	28 October 2015 25 March 2015	HK 1205141 A1	11 December 2015
		US 2016355606 A1	08 December 2016
		MX 2014014830 A	11 May 2015
		CA 2875096 A1	19 December 2013
		US 2013344085 A1	26 December 2013
		WO 2013188855 A1	19 December 2013
		US 9266961 B2	23 February 2016
		KR 20150023711 A	05 March 2015
		AR 091462 A1	04 February 2015
		TW 201410706 A	16 March 2014
		JP 2015530867 A	29 October 2015
		RU 2015101113 A	10 August 2016
		None	
		LT 2358756 T	27 March 2017
EC SP11011134 A	29 July 2011		
US 2011065902 A1	17 March 2011		
IL 230771 A	31 May 2015		
RU 2552169 C2	10 June 2015		
KR 20110094067 A	19 August 2011		
US 2010166768 A1	01 July 2010		
D0 P2011000184 A	15 August 2012		
EP 2358756 A1	24 August 2011		
MX 2011006197 A	20 July 2011		
JP 2012511913 A	31 May 2012		
KR 101699707 B1	25 January 2017		
TW 201036633 A	16 October 2010		
NZ 601923 A	28 March 2013		
IL 230771 D0	31 March 2014		
AU 2009333326 A1	08 July 2010		
NZ 593155 A	30 November 2012		
US 2013085266 A1	04 April 2013		
JP 2013198487 A	03 October 2013		
TW 1465249 B	21 December 2014		
WO 2010077854 A1	08 July 2010		
RU 2011129316 A	20 January 2013		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2017/079655

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 101636179 A	27 January 2010	HN 2011001659 A BR PI0922885 A2 CR 20110296 A MX 341041 B AU 2009333326 B9 EP 3156422 A2 PE 00142012 A1 US 8501184 B2 TN 2011000300 A1 ZA 201103762 B PA 8854201 A1 KR 101504494 B1 DK 2358756 T3 US 8062640 B2 CA 2747123 A1 EP 2358756 B1 JP 5902122 B2 IL 213050 A WO 2010077854 A8 CO 6571847 A2 KR 20150013359 A RU 2015109166 A JP 5318965 B2 IL 213050 D0 CN 102245641 B US 2017096496 A1 UY 32329 A AR 077724 A1 US 2013115223 A1 EP 2083861 A2 CA 2667894 A1 US 2010136028 A1 JP 2010508817 A AU 2007322265 A1 WO 2008063382 A2 WO 2008063382 A3 US 2012082679 A1 US 2013189278 A1 CN 101636179 B AU 2007322265 B2 WO 2008057459 A3 EP 2083864 A4 JP 5588175 B2 WO 2008057459 A2 EP 2083864 A2 CA 2669424 A1 US 8344114 B2 JP 2014144005 A EP 2083861 A4 US 2010041102 A1	02 February 2015 04 October 2016 14 July 2011 05 August 2016 26 February 2015 19 April 2017 07 February 2012 06 August 2013 17 December 2012 25 January 2012 27 July 2010 20 March 2015 10 April 2017 22 November 2011 08 July 2010 11 January 2017 13 April 2016 29 January 2015 07 July 2011 30 November 2012 04 February 2015 10 August 2015 16 October 2013 31 July 2011 07 January 2015 06 April 2017 30 July 2010 21 September 2011 09 May 2013 05 August 2009 15 May 2008 03 June 2010 25 March 2010 29 May 2008 29 May 2008 04 December 2008 05 April 2012 25 July 2013 10 October 2012 20 June 2013 27 November 2008 08 December 2010 10 September 2014 15 May 2008 05 August 2009 29 May 2008 01 January 2013 14 August 2014 24 November 2010 18 February 2010

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2017/079655

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 2008133647 A2	06 November 2008	WO 2008133647 A3	26 February 2009
		EP 2106261 A4	26 May 2010
		EP 2106261 A2	07 October 2009
		US 2012082680 A1	05 April 2012
		US 2010040610 A1	18 February 2010
		CA 2667989 A1	06 November 2008

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2017/079655

<p>A. 主题的分类</p> <p>C07K 16/40(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 9/00(2006.01)i; A61P 9/10(2006.01)i; A61P 7/02(2006.01)i; G01N 33/577(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																							
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C07K; C12N; A61K; A61P; G01N</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNABS; CPRABS; CPEA; DWPI; SIPOABS; CNTXT; EPTXT; USTXT; WOTXT; GENBANK; EMBL-EBI; CNKI; GOOGLE; PubMed; ISI Web of Knowledge; 迈博斯(香港)科技有限公司, 王少雄, 前蛋白转化酶枯草溶菌素, 抗体, 结合蛋白, 拮抗剂, 抑制剂, 噬菌体库, IC50, EC50, PCSK9, Proprotein convertase subtilisin, inhibit+, ligand, bind+, antibod+, antagonist, SEQ ID NOs: 1-26</p>																							
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>CN 104583237 A (奥尔德生物控股有限责任公司) 2015年 4月 29日 (2015 - 04 - 29) 权利要求1-139, 174-182, 260-375, 404-405</td> <td>1-14</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 102333542 A (瑞纳神经科学公司等) 2012年 1月 25日 (2012 - 01 - 25) 权利要求1-24</td> <td>1-14</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 104861071 A (南京师范大学) 2015年 8月 26日 (2015 - 08 - 26) 权利要求1-9</td> <td>1-14</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 104364266 A (霍夫曼-拉罗奇有限公司) 2015年 2月 18日 (2015 - 02 - 18) 权利要求1-26, 55-80</td> <td>1-14</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 105001336 A (上海复旦张江生物医药股份有限公司) 2015年 10月 28日 (2015 - 10 - 28) 全文</td> <td>1-14</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 104447997 A (瑞泽恩制药公司) 2015年 3月 25日 (2015 - 03 - 25) 全文</td> <td>1-14</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	X	CN 104583237 A (奥尔德生物控股有限责任公司) 2015年 4月 29日 (2015 - 04 - 29) 权利要求1-139, 174-182, 260-375, 404-405	1-14	X	CN 102333542 A (瑞纳神经科学公司等) 2012年 1月 25日 (2012 - 01 - 25) 权利要求1-24	1-14	X	CN 104861071 A (南京师范大学) 2015年 8月 26日 (2015 - 08 - 26) 权利要求1-9	1-14	X	CN 104364266 A (霍夫曼-拉罗奇有限公司) 2015年 2月 18日 (2015 - 02 - 18) 权利要求1-26, 55-80	1-14	A	CN 105001336 A (上海复旦张江生物医药股份有限公司) 2015年 10月 28日 (2015 - 10 - 28) 全文	1-14	A	CN 104447997 A (瑞泽恩制药公司) 2015年 3月 25日 (2015 - 03 - 25) 全文	1-14
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																					
X	CN 104583237 A (奥尔德生物控股有限责任公司) 2015年 4月 29日 (2015 - 04 - 29) 权利要求1-139, 174-182, 260-375, 404-405	1-14																					
X	CN 102333542 A (瑞纳神经科学公司等) 2012年 1月 25日 (2012 - 01 - 25) 权利要求1-24	1-14																					
X	CN 104861071 A (南京师范大学) 2015年 8月 26日 (2015 - 08 - 26) 权利要求1-9	1-14																					
X	CN 104364266 A (霍夫曼-拉罗奇有限公司) 2015年 2月 18日 (2015 - 02 - 18) 权利要求1-26, 55-80	1-14																					
A	CN 105001336 A (上海复旦张江生物医药股份有限公司) 2015年 10月 28日 (2015 - 10 - 28) 全文	1-14																					
A	CN 104447997 A (瑞泽恩制药公司) 2015年 3月 25日 (2015 - 03 - 25) 全文	1-14																					
<input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。		<input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。																					
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</p> <p>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p>		<p>“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>“&” 同族专利的文件</p>																					
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2017年 6月 8日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2017年 7月 4日</p>																					
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>受权官员</p> <p>陈莹</p> <p>电话号码 (86-10)62413889</p>																					

C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 101636179 A (默克公司) 2010年 1月 27日 (2010 - 01 - 27) 全文	1-14
A	WO 2008133647 A2 (MERCK & CO., INC. 等) 2008年 11月 6日 (2008 - 11 - 06) 全文	1-14

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2017/079655

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)				
CN	104583237	A	2015年 4月 29日	EP	2844673	A4	2016年 4月 20日				
				MX	2014013612	A	2015年 10月 26日				
				CA	2872777	A1	2013年 11月 14日				
				TW	201348260	A	2013年 12月 1日				
				WO	2013169886	A1	2013年 11月 14日				
				US	2013302399	A1	2013年 11月 14日				
				AU	2013259562	A1	2014年 11月 27日				
				SG	11201407099W	A	2014年 11月 27日				
				WO	2013169886	A9	2014年 1月 23日				
				KR	20150006471	A	2015年 1月 16日				
				JP	2015519050	A	2015年 7月 9日				
				US	2016194408	A1	2016年 7月 7日				
				EP	2844673	A1	2015年 3月 11日				
				US	9255154	B2	2016年 2月 9日				
				AR	092005	A1	2015年 3月 18日				
				CN	102333542	A	2012年 1月 25日	RU	2011109178	A	2012年 9月 20日
								RU	2528735	C2	2014年 9月 20日
NZ	591541	A	2012年 11月 30日								
IL	211519	A	2016年 6月 30日								
MX	2011002726	A	2011年 7月 29日								
TW	1445716	B	2014年 7月 21日								
HK	1161136	A1	2017年 1月 27日								
JP	2012107017	A	2012年 6月 7日								
IL	229059	D0	2013年 12月 31日								
US	8426363	B2	2013年 4月 23日								
US	2010068199	A1	2010年 3月 18日								
JP	6060212	B2	2017年 1月 11日								
US	2012014951	A1	2012年 1月 19日								
PE	19522015	A1	2016年 1月 17日								
TW	1516501	B	2016年 1月 11日								
JP	5750421	B2	2015年 7月 22日								
IL	229059	A	2016年 6月 30日								
PH	12014501261	A1	2015年 12月 7日								
US	8399646	B2	2013年 3月 19日								
EP	2344194	A2	2011年 7月 20日								
ZA	201101688	B	2012年 8月 29日								
CN	102333542	B	2016年 1月 20日								
US	9175093	B2	2015年 11月 3日								
IL	211519	D0	2011年 5月 31日								
US	8080243	B2	2011年 12月 20日								
TW	201431882	A	2014年 8月 16日								
US	2012015435	A1	2012年 1月 19日								
AU	2009290438	B2	2012年 12月 20日								
JP	2013078312	A	2013年 5月 2日								
AR	073292	A1	2010年 10月 28日								
CO	6351752	A2	2011年 12月 20日								
RU	2014127686	A	2016年 2月 10日								
JP	5119359	B2	2013年 1月 16日								
WO	2010029513	A3	2010年 7月 15日								
CA	2736349	A1	2010年 3月 18日								

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2017/079655

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
				WO	2010029513	A2	2010年 3月 18日
				JP	2012504388	A	2012年 2月 23日
				KR	20110056317	A	2011年 5月 26日
				US	2016096898	A1	2016年 4月 7日
				JP	2015205883	A	2015年 11月 19日
				AU	2009290438	A1	2010年 3月 18日
				JP	4898976	B2	2012年 3月 21日
				TW	201024321	A	2010年 7月 1日
				KR	101230675	B1	2013年 2月 13日
				US	2013273069	A1	2013年 10月 17日
				CA	2736349	C	2015年 12月 29日
				PE	08022011	A1	2011年 10月 27日
CN	104861071	A	2015年 8月 26日	无			
CN	104364266	A	2015年 2月 18日	EP	2861624	A1	2015年 4月 22日
				HK	1205141	A1	2015年 12月 11日
				US	2016355606	A1	2016年 12月 8日
				MX	2014014830	A	2015年 5月 11日
				CA	2875096	A1	2013年 12月 19日
				US	2013344085	A1	2013年 12月 26日
				WO	2013188855	A1	2013年 12月 19日
				US	9266961	B2	2016年 2月 23日
				KR	20150023711	A	2015年 3月 5日
				AR	091462	A1	2015年 2月 4日
				TW	201410706	A	2014年 3月 16日
				JP	2015530867	A	2015年 10月 29日
				RU	2015101113	A	2016年 8月 10日
CN	105001336	A	2015年 10月 28日	无			
CN	104447997	A	2015年 3月 25日	LT	2358756	T	2017年 3月 27日
				EC	SP11011134	A	2011年 7月 29日
				US	2011065902	A1	2011年 3月 17日
				IL	230771	A	2015年 5月 31日
				RU	2552169	C2	2015年 6月 10日
				KR	20110094067	A	2011年 8月 19日
				US	2010166768	A1	2010年 7月 1日
				DO	P2011000184	A	2012年 8月 15日
				EP	2358756	A1	2011年 8月 24日
				MX	2011006197	A	2011年 7月 20日
				JP	2012511913	A	2012年 5月 31日
				KR	101699707	B1	2017年 1月 25日
				TW	201036633	A	2010年 10月 16日
				NZ	601923	A	2013年 3月 28日
				IL	230771	D0	2014年 3月 31日
				AU	2009333326	A1	2010年 7月 8日
				NZ	593155	A	2012年 11月 30日
				US	2013085266	A1	2013年 4月 4日
				JP	2013198487	A	2013年 10月 3日
				TW	I465249	B	2014年 12月 21日
				WO	2010077854	A1	2010年 7月 8日
				RU	2011129316	A	2013年 1月 20日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2017/079655

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
		HN 2011001659 A	2015年 2月 2日
		BR PI0922885 A2	2016年 10月 4日
		CR 20110296 A	2011年 7月 14日
		MX 341041 B	2016年 8月 5日
		AU 2009333326 B9	2015年 2月 26日
		EP 3156422 A2	2017年 4月 19日
		PE 00142012 A1	2012年 2月 7日
		US 8501184 B2	2013年 8月 6日
		TN 2011000300 A1	2012年 12月 17日
		ZA 201103762 B	2012年 1月 25日
		PA 8854201 A1	2010年 7月 27日
		KR 101504494 B1	2015年 3月 20日
		DK 2358756 T3	2017年 4月 10日
		US 8062640 B2	2011年 11月 22日
		CA 2747123 A1	2010年 7月 8日
		EP 2358756 B1	2017年 1月 11日
		JP 5902122 B2	2016年 4月 13日
		IL 213050 A	2015年 1月 29日
		WO 2010077854 A8	2011年 7月 7日
		CO 6571847 A2	2012年 11月 30日
		KR 20150013359 A	2015年 2月 4日
		RU 2015109166 A	2015年 8月 10日
		JP 5318965 B2	2013年 10月 16日
		IL 213050 D0	2011年 7月 31日
		CN 102245641 B	2015年 1月 7日
		US 2017096496 A1	2017年 4月 6日
		UY 32329 A	2010年 7月 30日
		AR 077724 A1	2011年 9月 21日
CN	101636179 A	2010年 1月 27日	
		US 2013115223 A1	2013年 5月 9日
		EP 2083861 A2	2009年 8月 5日
		CA 2667894 A1	2008年 5月 15日
		US 2010136028 A1	2010年 6月 3日
		JP 2010508817 A	2010年 3月 25日
		AU 2007322265 A1	2008年 5月 29日
		WO 2008063382 A2	2008年 5月 29日
		WO 2008063382 A3	2008年 12月 4日
		US 2012082679 A1	2012年 4月 5日
		US 2013189278 A1	2013年 7月 25日
		CN 101636179 B	2012年 10月 10日
		AU 2007322265 B2	2013年 6月 20日
		WO 2008057459 A3	2008年 11月 27日
		EP 2083864 A4	2010年 12月 8日
		JP 5588175 B2	2014年 9月 10日
		WO 2008057459 A2	2008年 5月 15日
		EP 2083864 A2	2009年 8月 5日
		CA 2669424 A1	2008年 5月 29日
		US 8344114 B2	2013年 1月 1日
		JP 2014144005 A	2014年 8月 14日
		EP 2083861 A4	2010年 11月 24日
		US 2010041102 A1	2010年 2月 18日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2017/079655

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
WO	2008133647	A2	2008年 11月 6日	WO	2008133647	A3	2009年 2月 26日
				EP	2106261	A4	2010年 5月 26日
				EP	2106261	A2	2009年 10月 7日
				US	2012082680	A1	2012年 4月 5日
				US	2010040610	A1	2010年 2月 18日
				CA	2667989	A1	2008年 11月 6日
.....							