

(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2019-509714

(P2019-509714A)

(43) 公表日 平成31年4月11日 (2019.4.11)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13 Z N A	4 B 0 6 4
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63 Z	4 B 0 6 5
C O 7 K 16/40 (2006.01)	C O 7 K 16/40	4 C O 8 5
C O 7 K 16/46 (2006.01)	C O 7 K 16/46	4 H O 4 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 61 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2018-533864 (P2018-533864)
 (86) (22) 出願日 平成28年12月26日 (2016.12.26)
 (85) 翻訳文提出日 平成30年7月28日 (2018.7.28)
 (86) 国際出願番号 PCT/CN2016/112075
 (87) 国際公開番号 W02017/118307
 (87) 国際公開日 平成29年7月13日 (2017.7.13)
 (31) 優先権主張番号 201610010241.3
 (32) 優先日 平成28年1月5日 (2016.1.5)
 (33) 優先権主張国 中国 (CN)

(71) 出願人 510166892
 ジェンス ヘンルイ メディシンカンパニー リミテッド
 J I A N G S U H E N G R U I M E D I C I N E C O . , L T D .
 中華人民共和国 ジェンス 222002
 リエンユンガン エコノミック・アンド・テクノロジカル・ディベロップメント・ゾーン クンルンジャン ロード ナンバー7

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 PCSK9抗体、その抗原結合フラグメント及び医薬用途

(57) 【要約】

本発明は、PCSK9抗体、その抗原結合フラグメント及びその医薬用途を提供する。

【選択図】なし

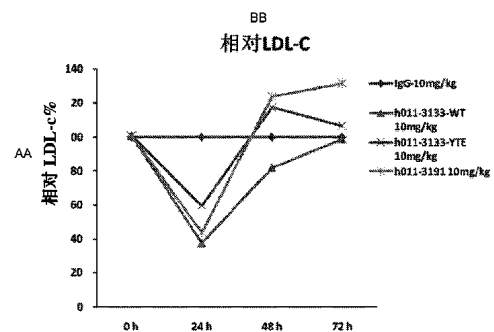


図5

AA Relative LDL-C%
 BB Relative LDL-C

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

i) HCDR1、前記HCDR1の配列がGYX¹IH (配列番号：43)である(式中、X¹はT、DまたはEである。);

ii) HCDR2、前記HCDR2の配列がX²IX³PSX⁴TYTKFNQKFKD (配列番号：44)である(式中、X²はYまたはEであり;X³はN、L、IまたはVであり;X⁴はS、GまたはAである。);

iii) HCDR3、前記HCDR3の配列がAREX⁵IX⁶X⁷NYWFFDX⁸ (配列番号：45)である(式中、X⁵はRまたはNであり;X⁶はYまたはFであり;X⁷はSまたはFであり;X⁸はVまたはRである。);

iv) LCDR1、前記LCDR1の配列がKASQNVYX₁X₂VX₃ (配列番号：46)である(式中、X₁はTまたはWであり;X₂はAまたはEであり;X₃はA、DまたはVである。);

v) LCDR2、前記LCDR2の配列がX₄X₅X₆NRYT (配列番号：47)である(式中、X₄はS、EまたはQであり;X₅はAまたはMであり;X₆はSまたはVである。);及び

vi) LCDR3、前記LCDR3の配列がQQX₇SX₈X₉PX₁₀T (配列番号：48)である(式中、X₇はY、FまたはLであり;X₈はSまたはWであり;X₉はY、F、QまたはSであり;X₁₀はY、DまたはEである。);

から選択される少なくとも1つ以上のCDR領域を含む可変領域を含む、PCSK9と特異的に結合するPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメント。

10

【請求項 2】

PCSK9抗体またはその抗原結合フラグメントが、それぞれ配列番号：43、配列番号：44及び配列番号：45で示されるHCDR1、HCDR2及びHCDR3を含む、請求項 1 に記載のPCSK9と特異的に結合するPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメント。

20

【請求項 3】

PCSK9抗体またはその抗原結合フラグメントが、それぞれ配列番号：46、配列番号：47及び配列番号：48で示されるLCDR1、LCDR2及びLCDR3を含む、請求項 1 に記載のPCSK9と特異的に結合するPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 4】

PCSK9抗体またはその抗原結合フラグメントが、それぞれ配列番号：43、配列番号：44及び配列番号：45で示されるHCDR1、HCDR2及びHCDR3及びそれぞれ配列番号：46、配列番号：47及び配列番号：48で示されるLCDR1、LCDR2及びLCDR3を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のPCSK9と特異的に結合するPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメント。

30

【請求項 5】

前記HCDR1が、配列番号：14、配列番号：20または配列番号：21のアミノ酸配列、または前記の配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列から選択され;

HCDR2が、配列番号：15、配列番号：22、配列番号：23、配列番号：24、配列番号：25、配列番号：26または配列番号：27のアミノ酸配列、または前記の配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列から選択され;

HCDR3が、配列番号：16、配列番号：28、配列番号：29または配列番号：30のアミノ酸配列、または前記の配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列から選択される、請求項 1 または請求項 2 に記載のPCSK9と特異的に結合するPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメント。

40

【請求項 6】

前記LCDR1が、配列番号：17、配列番号：31、配列番号：32、配列番号：33または配列番号：34のアミノ酸配列、または前記の配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列から選択され;

LCDR2が、配列番号：18、配列番号：35、配列番号：36または配列番号：37、または前記の配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列から選択され;

LCDR3が、配列番号：19、配列番号：38、配列番号：39、配列番号：40、配列番号：41または配列番号：42のアミノ酸配列、または前記の配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列から選択される、請求項 1 または請求項 3 に記載のPCSK9と特異的に結合するPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメント。

50

【請求項 7】

前記HCDR1が、配列番号：14、配列番号：20または配列番号：21のアミノ酸配列、または前記の配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列から選択され；

HCDR2が、配列番号：15、配列番号：22、配列番号：23、配列番号：24、配列番号：25、配列番号：26または配列番号：27のアミノ酸配列、または前記の配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列から選択され；

HCDR3が、配列番号：16、配列番号：28、配列番号：29または配列番号：30のアミノ酸配列、または前記の配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列から選択され；及び

LCDR1が、配列番号：17、配列番号：31、配列番号：32、配列番号：33または配列番号：34のアミノ酸配列、または前記の配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列から選択され；

LCDR2が、配列番号：18、配列番号：35、配列番号：36または配列番号：37のアミノ酸配列、または前記の配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列から選択され；

LCDR3が、配列番号：19、配列番号：38、配列番号：39、配列番号：40、配列番号：41または配列番号：42のアミノ酸配列、または前記の配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列から選択される、請求項1～6のいずれか1項に記載のPCSK9と特異的に結合するPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 8】

PCSK9抗体が、

1) それぞれ配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：18及び配列番号：19で示される6つのCDR；

2) それぞれ配列番号：14、配列番号：22、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：18及び配列番号：19で示される6つのCDR；

3) それぞれ配列番号：14、配列番号：23、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：18及び配列番号：19で示される6つのCDR；

4) それぞれ配列番号：20、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：18及び配列番号：19で示される6つのCDR；

5) それぞれ配列番号：14、配列番号：15、配列番号：28、配列番号：17、配列番号：18及び配列番号：19で示される6つのCDR；

6) それぞれ配列番号：14、配列番号：15、配列番号：29、配列番号：17、配列番号：18及び配列番号：19で示される6つのCDR；

7) それぞれ配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：35及び配列番号：19で示される6つのCDR；

8) それぞれ配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：36及び配列番号：19で示されるような6つのCDR；

9) それぞれ配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：31、配列番号：18及び配列番号：19で示される6つのCDR；

10) それぞれ配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：32、配列番号：18及び配列番号：19で示される6つのCDR；

11) それぞれ配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：18及び配列番号：38で示される6つのCDR；

12) それぞれ配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：18及び配列番号：39で示される6つのCDR；

13) それぞれ配列番号：21、配列番号：24、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：18及び配列番号：15で示される6つのCDR；

14) それぞれ配列番号：14、配列番号：25、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：18及び配列番号：19で示される6つのCDR；

15) それぞれ配列番号：14、配列番号：15、配列番号：30、配列番号：17、配列番号：3

10

20

30

40

50

7及び配列番号：19で示される6つのCDR;

16)それぞれ配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：18及び配列番号：40で示される6つのCDR;

17)それぞれ配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：18及び配列番号：41で示される6つのCDR;

18)それぞれ配列番号：14、配列番号：26、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：18及び配列番号：19で示される6つのCDR;

19)それぞれ配列番号：14、配列番号：27、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：18及び配列番号：19で示される6つのCDR;

20)それぞれ配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：33、配列番号：18及び配列番号：19で示される6つのCDR;

21)それぞれ配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：34、配列番号：18及び配列番号：19で示される6つのCDR;

22)それぞれ配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：18及び配列番号：42で示される6つのCDR;及び

23)それぞれ配列番号：14、配列番号：15、配列番号：30、配列番号：17、配列番号：18及び配列番号：19で示される6つのCDR。

から成る群より選択される6つのCDRを含む、請求項1～7のいずれか1項に記載のPCSK9と特異的に結合するPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項9】

PCSK9抗体またはその抗原結合フラグメントが、マウス抗体またはそのフラグメントである、請求項1～8のいずれか1項に記載のPCSK9と特異的に結合するPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項10】

PCSK9抗体またはその抗原結合フラグメントが、キメラ抗体またはそのフラグメントである、請求項1～8のいずれか1項に記載のPCSK9と特異的に結合するPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項11】

PCSK9抗体またはその抗原結合フラグメントが、ヒト化抗体またはそのフラグメントである、請求項1～8のいずれか1項に記載のPCSK9と特異的に結合するPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項12】

ヒト化抗体が、重鎖可変FR領域を含み、該重鎖可変FR領域が、ヒト生殖系列重鎖IGHV1-2*02及びhjh6.1の組合せ配列またはその変異体配列に由来し;該重鎖可変FR領域が、IGHV1-2*02由来のFR1、FR2、FR3領域及びhjh6.1由来のFR4領域またはその変異体配列を含む、請求項11に記載のPCSK9と特異的に結合するPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項13】

ヒト化抗体が、配列番号：10で示される重鎖可変領域またはその変異体を含み;該変異体が、配列番号：10に1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個のアミノ酸変化の存在を意味する、請求項12に記載のPCSK9と特異的に結合するPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項14】

ヒト化抗体が、1～10個のアミノ酸逆突然変異を有する重鎖FR領域を含み、該逆突然変異が、好ましくは、R72A、T74K、V68A、M70L、M48V、G49A、R67K及びR38Kから成る1つ以上の逆突然変異から選択される、請求項12に記載のPCSK9と特異的に結合するPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項15】

PCSK9抗体がVHを含み、前記VHのアミノ酸配列は、配列番号：12、配列番号：49、配列番号：50、配列番号：51、配列番号：52、配列番号：53、配列番号：54、配列番号：55、

10

20

30

40

50

配列番号：56、配列番号：57または配列番号：58、または前記の配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列から選択される、請求項1～11のいずれか1項に記載のPCSK9と特異的に結合するPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項16】

ヒト化抗体が、軽鎖可変領域上の軽鎖FR領域を含み、該軽鎖FR領域の配列が、ヒト生殖系列軽鎖IGKV1-39*01及びhjk4.1の組合せ配列またはその変異体配列に由来し；該軽鎖FR領域が、ヒト生殖系列軽鎖IGKV1-39*01由来のFR1、FR2、FR3及びhjk4.1由来のFR4、またはその突然変異配列を含む、請求項11に記載のPCSK9と特異的に結合するPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項17】

ヒト化抗体が、配列番号：11で示される軽鎖可変領域またはその変異体を含み；該変異体が、配列番号：11に1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個のアミノ酸変化の存在を意味する、請求項16に記載のPCSK9と特異的に結合するPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項18】

ヒト化抗体が、1～10個のアミノ酸逆突然変異を有する軽鎖FR領域を含み、該逆突然変異が、好ましくは、Q3V、A43S及びY87Fから成る1つ以上の逆突然変異から選択される、請求項16に記載のPCSK9と特異的に結合するPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項19】

PCSK9抗体がVLを含み、該VLのアミノ酸配列が、配列番号：13、配列番号：59、配列番号：60、配列番号：61、配列番号：62、配列番号：63、配列番号：64、配列番号：65、配列番号：66、配列番号：67、配列番号：68、配列番号：69または配列番号：70、または前記の配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列から選択される、請求項1～11のいずれか1項に記載のPCSK9と特異的に結合するPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項20】

PCSK9抗体が、

- 1) 配列番号：12のVH及び配列番号：13のVL；
- 2) 配列番号：49のVH及び配列番号：13のVL；
- 3) 配列番号：50のVH及び配列番号：13のVL；
- 4) 配列番号：51のVH及び配列番号：13のVL；
- 5) 配列番号：52のVH及び配列番号：13のVL；
- 6) 配列番号：53のVH及び配列番号：13のVL；
- 7) 配列番号：12のVH及び配列番号：59のVL；
- 8) 配列番号：12のVH及び配列番号：60のVL；
- 9) 配列番号：12のVH及び配列番号：61のVL；
- 10) 配列番号：12のVH及び配列番号：62のVL；
- 11) 配列番号：12のVH及び配列番号：63のVL；
- 12) 配列番号：12のVH及び配列番号：64のVL；
- 13) 配列番号：54のVH及び配列番号：13のVL；
- 14) 配列番号：55のVH及び配列番号：13のVL；
- 15) 配列番号：56のVH及び配列番号：65のVL；
- 16) 配列番号：12のVH及び配列番号：66のVL；
- 17) 配列番号：12のVH及び配列番号：67のVL；
- 18) 配列番号：57のVH及び配列番号：13のVL；
- 19) 配列番号：58のVH及び配列番号：13のVL；
- 20) 配列番号：12のVH及び配列番号：68のVL；
- 21) 配列番号：12のVH及び配列番号：69のVL；
- 22) 配列番号：12のVH及び配列番号：70のVL；及び
- 23) 配列番号：56のVH及び配列番号：13のVL。

10

20

30

40

50

から成る群より選択されるVH及びVLを含む、請求項 1 1 に記載のPCSK9と特異的に結合するPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 2 1】

PCSK9抗体またはその抗原結合フラグメントが、更にヒトIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4またはそれらの変異体、またはそれらの配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列に由来する重鎖定常領域を含み;好ましくは、ヒトIgG1、IgG2またはIgG4、またはアミノ酸変異は血清における抗体の半減期を延長させるヒトIgG1、IgG2もしくはIgG4変異体に由来する重鎖定常領域を含み、より好ましくは、YTE突然変異で導入されたIgG1、IgG2またはIgG4重鎖定常領域を含む;

PCSK9抗体またはその抗原結合フラグメントが、更にヒト鎖、ヒト鎖またはそれらの変異体、またはそれらの配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列に由来する軽鎖定常領域を含む、請求項 1 0 ~ 2 0 のいずれか 1 項に記載のPCSK9と特異的に結合するPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 2 2】

PCSK9抗体またはその抗原結合フラグメントが、

1) 配列番号: 71の重鎖配列及び配列番号: 73の軽鎖配列;または

2) 配列番号: 75の重鎖配列及び配列番号: 73の軽鎖配列。

を含む、請求項 2 1 に記載のPCSK9と特異的に結合するPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 2 3】

請求項 1 ~ 2 2 のいずれか 1 項に記載のPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメントをコードするDNA分子。

【請求項 2 4】

請求項 2 3 に記載のDNA分子を含む発現ベクター。

【請求項 2 5】

請求項 2 4 に記載の発現ベクターで形質転換された宿主細胞であって、該宿主細胞が、原核細胞及び真核細胞から成る群より選択され、好ましくは真核細胞であり、より好ましくは哺乳動物細胞である。

【請求項 2 6】

請求項 1 ~ 2 2 のいずれか 1 項に記載のPCSK9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 5 の宿主細胞を培養すること、及び/または該宿主細胞からPCSK9抗体を回収することを含む、PCSK9抗体を調製する方法。

【請求項 2 7】

治療的有效量の請求項 1 ~ 2 2 のいずれか 1 項に記載のPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメント、及び1つ以上の薬学的に許容される担体、希釈剤または賦形剤を含有する、医薬組成物。

【請求項 2 8】

PCSK9媒介性の疾患または病態を治療するための医薬品の調製における、請求項 1 ~ 2 2 のいずれか 1 項に記載のPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメント、または請求項 2 7 に記載の医薬組成物の使用。該疾患または病態が、好ましくは、コレステロール関連疾患であり;より好ましくは、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、冠状動脈性心疾患、脳卒中、心血管疾患、アルツハイマー病及び一般的な脂質異常症であり;最も好ましくは、高コレステロール血症、脂質異常症、粥状動脈硬化、CV Dまたは冠状動脈性心疾患である。

【発明の分野】

【0001】

本発明は、PCSK9抗体、その抗原結合フラグメント、キメラ抗体及びPCSK9抗体のCDR領域を含むヒト化抗体、ならびにPCSK9抗体及びその抗原結合フラグメントを含む医薬組成物及び血中の脂質レベルを低下させるための医薬品としての使用に関する。

【発明の背景】

【0002】

高コレステロール血症は、血清中コレステロールレベルの上昇を特徴とする、脂質の異常な代謝を伴う疾患である。その主な症状は血清中のコレステロール値の上昇である。これは血管内でコレステロール凝集を引き起こし、結果的に粥状動脈硬化が生じる。膨大な臨床的及び実験的な研究結果によって、脂質の異常代謝は冠状動脈性心臓病の発症及び進行と密接に関連することが実証された。従って、血中のコレステロール濃度を低下させることは、粥状動脈硬化症を治療及び予防するための主な手段となる。

10

【0003】

中国における生活水準の急速な向上に伴い、脂質異常症は中国の都市部及び農村部の住民を危険にさらす主な要因になっている。2012年の統計結果によると、中国における年間死亡者の約40%が心臓血管疾患に起因していた。中国の成人における脂質異常症の罹患率は18.6%である。現在、脂質異常症の患者は1億6,000万人いると推定されている。各種脂質異常症の罹患率は次のとおりである。高コレステロール血症：2.9%、高中性脂肪血症：11.9%、低高密度リポタンパク質血症：7.4%、血中コレステロールレベルの僅かな増加：3.9%。中国では高コレステロール血症の患者が3300万人いると言われているが、地方での脂質異常症の罹患率はこの数字より遥かに深刻である（公衆衛生省疾病予防管理委員会の慢性疾患の予防及び管理支部、2012年）。

20

【0004】

現在、臨床で使用される脂質レベルを制御するための医薬品は、主にスタチン系の薬剤に重点を置いている。リプトールは最も広く使用されているコレステロール低下薬として、コレステロールを産生する酵素の肝臓への影響を阻害することによりコレステロールの生成を減少させ、従って肝臓による血液からのコレステロールの取込みを増加させる。そのため、血液中のコレステロール濃度を減少させる。しかし、リプトールには欠点がある。まず、データから分かるように、リプトールは低密度リポタンパク質を30%～40%まで減少させることができるが、多くの患者では血中脂質レベルを効果的に減少させることはまだ達成できない（低密度リポタンパク質<50mg/dL）。第二に、リプトールに対する応答率には患者間に人種差がある。これらの理由で患者はより効果的な血中脂質を低下させる薬を必要としている。

30

【0005】

家族性高コレステロール血症（FM）は常染色体の単遺伝子優性遺伝病である。その臨床的特徴としては、血中総コレステロール（TC）及び低密度リポタンパク質コレステロール（LDL-c）の著しい増加、黄色板腫、角膜環及び早発性心血管疾病がある。低密度リポタンパク質受容体（LDL受容体、LDLR）遺伝子の突然変異はLDLR欠損または欠如を引き起こし、結果として、LDL-cは肝臓に運ばれて清浄化されないため、血液中のLDL-cレベルが上昇する。現在、3つの遺伝子がFMの発生と関連することが明らかになっている。即ち、LDLR遺伝子、アポリポタンパク質B100遺伝子及びプロタンパク質転換酵素サブチリシン/ケクシン9型（PCSK9）遺伝子である。

40

【0006】

プロタンパク質転換酵素サブチリシン/ケクシン9型（PCSK9）は、プロタンパク質転換酵素であり、分泌性枯草菌ファミリーに属するプロテアーゼKのサブファミリーである。コードされたタンパク質は、可溶性の酵素前駆体として合成され、自己触媒作用によって小胞体内で分子内処理される。実験結果によると、PCSK9はLDL受容体の分解を促進し、血漿中のLDLコレステロールの量を増加させるが、LDL受容体は肝臓におけるLDLの形質膜陥入の過程を媒介し、後者は循環系からLDLを除去する主経路である。研究者らは、高コレ

50

ステロール血症（ADH）患者の12.5%においてPCSK9遺伝子変異が同定されていることを発見した。様々なタイプのPCSK9突然変異が存在している。PCSK9によって調節されるLDL-cレベルに対する突然変異の異なる影響によって、機能喪失型及び機能獲得型を含む2つのグループの突然変異がある。機能喪失突然変異は、低血中コレステロールのレベルと関連し、粥状動脈硬化性心疾患の発症を予防する効果を有する。低コレステロールに関連するPCSK9突然変異の割合は、他の人種よりアフリカ人種において高い。PCSK9機能獲得突然変異はPCSK9機能を増大させ、LDLRの発現を低下させることにより血漿コレステロールのレベルを上昇させ、重篤な高コレステロール血症及び早期冠動脈と粥状動脈硬化性の心疾患を引き起こす。現在、PCSK9の機能獲得突然変異には、D374Y、S127R、F216L、N157K、R306S等は含まれることが判明されている。PCSK9野生型と比較し、細胞表面上のLDLRはD374Y変異体では36%減少し、S127R変異体では10%減少した。

10

【0007】

PCSK9は潜在的な新規標的として高コレステロール血症の研究において注目されている。コレステロール代謝のメカニズムを更に理解し、新しい治療戦略を見つけることが重要である。多くの多国籍製薬会社はPCSK9に対するモノクローナル抗体を開発している。これは血液中のPCSK9を中和することにより肝臓表面上のLDLR濃度を増加させ、血液中のLDL濃度を低下させる。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

20

【特許文献1】WO2011111007

【特許文献2】WO2011072263

【特許文献3】WO2013170367

【特許文献4】WO2013169886

【特許文献5】WO2013148284

【特許文献6】WO2013091103

【特許文献7】WO2013039958

【特許文献8】WO2013039969

【特許文献9】WO2013016648

【特許文献10】WO2013008185

30

【特許文献11】WO2012170607

【特許文献12】WO2012168491

【特許文献13】WO2012154999

【特許文献14】WO2012109530

【特許文献15】WO2012101251

【特許文献16】WO2012088313

【特許文献17】US8829165B2

【特許文献18】US8563698B2

【特許文献19】US8859741B2

【特許文献20】US8871913B2

40

【特許文献21】US8871914B2

【特許文献22】US8883983B2

【特許文献23】WO2012058137

【特許文献24】WO2012054438

【0009】

本発明は、より高い親和性、より高い選択性及びより高い生物活性を有するPCSK9抗体を提供する。

【発明の概要】

【0010】

本発明は、

50

- i) GYX¹IH (配列番号：43) のHCDR1 (式中、X¹はT、DまたはEである。) ;
- ii) X²IX³PSX⁴TYTKFNQKFKD (配列番号：44) のHCDR2 (式中、X²がYまたはEであり; X³はN、L、IまたはVであり; X⁴はS、GまたはAである。) ;
- iii) AREX⁵IX⁶X⁷NYWFFDX⁸ (配列番号：45) のHCDR3 (式中、X⁵がRまたはNであり; X⁶はYまたはFであり; X⁷はSまたはFであり; X⁸はVまたはRである。) ;
- iv) KASQNVYX₁X₂VX₃ (配列番号：46) のLCDR1 (式中、X₁はTまたはWであり; X₂はAまたはEであり; X₃はA、DまたはVである。) ;
- v) X₄X₅X₆NRYT (配列番号：47) のLCDR2 (式中、X₄がS、EまたはQであり; X₅はAまたはMであり; X₆はSまたはVである。) ;及び
- vi) QQX₇SX₈X₉PX₁₀T (配列番号：48) のLCDR3 (式中、X₇がY、FまたはLであり; X₈はSまたはWであり; X₉はY、F、QまたはSであり; X₁₀はY、DまたはEである。)。
- から選択される少なくとも1つ以上のCDR領域を含む可変領域を含む、PCSK9と特異的に結合するPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメントを提供する。

【0011】

本発明の別の好ましい実施形態では、本発明によるPCSK9と特異的に結合するPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメントは、それぞれ配列番号：43、配列番号：44及び配列番号：45で示されるHCDR1、HCDR2及びHCDR3を含む。

【0012】

本発明の別の好ましい実施形態では、本発明によるPCSK9と特異的に結合するPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメントは、それぞれ配列番号：46、配列番号：47及び配列番号：48で示されるLCDR1、LCDR2及びLCDR3を含む。

【0013】

親和性成熟化を用い、本発明による前記の配列番号：43～48のCDR領域にアミノ酸突然変異を行い、より高い活性を得ることができる。

【0014】

本発明の別の好ましい実施形態では、本発明によるPCSK9と特異的に結合するPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメントにおいて、HCDR1は、配列番号：14、配列番号：20または配列番号：21、または前記の配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有する配列から選択される；

HCDR2は、配列番号：15、配列番号：22、配列番号：23、配列番号：24、配列番号：25、配列番号：26または配列番号：27、または前記の配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有する配列から選択される；

HCDR3は、配列番号：16、配列番号：28、配列番号：29、または配列番号：30、または前記の配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有する配列から選択される。

【0015】

本発明の別の好ましい実施形態では、本発明によるPCSK9と特異的に結合するPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメントにおいて、LCDR1は、配列番号：17、配列番号：31、配列番号：32、配列番号：33または配列番号：34、または前記の配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有する配列から選択される；

LCDR2は、配列番号：18、配列番号：35、配列番号：36または配列番号：37、または前記の配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有する配列から選択される；

LCDR3は、配列番号：19、配列番号：38、配列番号：39、配列番号：40、配列番号：41または配列番号：42、または前記の配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有する配列から選択される。

【0016】

本発明の別の好ましい実施形態では、本発明によるPCSK9と特異的に結合するPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメントは、以下より選択される6つCDR領域を含む。

1) それぞれ配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：18及び配列番号：19で示される6つのCDR領域；

2) それぞれ配列番号：14、配列番号：22、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：18

10

20

30

40

50

及び配列番号：19で示される6つのCDR領域；

3) それぞれ配列番号：14、配列番号：23、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：18

及び配列番号：19で示される6つのCDR領域；

4) それぞれ配列番号：20、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：18

及び配列番号：19で示される6つのCDR領域；

5) それぞれ配列番号：14、配列番号：15、配列番号：28、配列番号：17、配列番号：18

及び配列番号：19で示される6つのCDR領域；

6) それぞれ配列番号：14、配列番号：15、配列番号：29、配列番号：17、配列番号：18

及び配列番号：19で示される6つのCDR領域；

7) それぞれ配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：35

10

及び配列番号：19で示される6つのCDR領域；

8) それぞれ配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：36

及び配列番号：19で示される6つのCDR領域；

9) それぞれ配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：31、配列番号：18

及び配列番号：19で示される6つのCDR領域；

10) それぞれ配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：32、配列番号：18

及び配列番号：19で示される6つのCDR領域；

11) それぞれ配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：18

及び配列番号：38で示される6つのCDR領域；

12) それぞれ配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：18

20

及び配列番号：39で示される6つのCDR領域；

13) それぞれ配列番号：21、配列番号：24、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：18

及び配列番号：15で示される6つのCDR領域；

14) それぞれ配列番号：14、配列番号：25、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：18

及び配列番号：19で示される6つのCDR領域；

15) それぞれ配列番号：14、配列番号：15、配列番号：30、配列番号：17、配列番号：37

及び配列番号：19で示される6つのCDR領域；

16) それぞれ配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：18

及び配列番号：40で示される6つのCDR領域；

17) それぞれ配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：18

30

及び配列番号：41で示される6つのCDR領域；

18) それぞれ配列番号：14、配列番号：26、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：18

及び配列番号：19で示される6つのCDR領域；

19) それぞれ配列番号：14、配列番号：27、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：18

及び配列番号：19で示される6つのCDR領域；

20) それぞれ配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：33、配列番号：18

及び配列番号：19で示される6つのCDR領域；

21) それぞれ配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：34、配列番号：18

及び配列番号：19で示される6つのCDR領域；

22) それぞれ配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：18

40

及び配列番号：42で示される6つのCDR領域；及び

23) それぞれ配列番号：14、配列番号：15、配列番号：30、配列番号：17、配列番号：18

及び配列番号：19で示される6つのCDR領域。

【0017】

本発明の別の好ましい実施形態では、本発明によるPCSK9と特異的に結合するPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメントは、マウス由来の抗体またはそのフラグメントである。

【0018】

本発明の別の好ましい実施形態では、本発明によるPCSK9と特異的に結合するPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメントは、キメラ抗体またはそのフラグメントである。

【0019】

本発明の別の好ましい実施形態では、本発明によるPCSK9と特異的に結合するPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメントは、ヒト化抗体またはそのフラグメントである。

【0020】

本発明の別の好ましい実施形態では、本発明によるPCSK9と特異的に結合するPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメントに関して、ヒト化抗体の重鎖は、FR配列がヒト生殖系列重鎖IGHV1-2*02及びhjh6.1の組合せ配列、またはそれらの変異体配列に由来する重鎖可変領域を含む；前記FR配列が、IGHV1-2*02に由来のFR1、FR2、FR3及びhjh6.1由来のFR4、またはその変異体配列を含むか、または前記の配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0021】

本発明の別の好ましい実施形態では、本発明によるPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメントに関して、ヒト化抗体の重鎖配列は、配列番号：10に記載の配列の変異体である；該変異体が、好ましくは、重鎖可変領域に0～10個のアミノ酸変化を有する。該アミノ酸変化が、抗体の親和性または半減期を改善するための当技術分野の技術（例えば、親和性成熟化によるCDRアミノ酸の修飾、または逆突然変異によるFRアミノ酸の修飾）に基づいた修飾であってもよい。

【0022】

本発明の別の好ましい実施形態では、本発明によるPCSK9と特異的に結合するPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメントに関して、ヒト化抗体は、0～10個のアミノ酸逆突然変異を有する重鎖FR領域を含み、該逆突然変異が、好ましくは、R72A、T74K、V68A、M70L、M48V、G49A、R67K及びR38Kから成る1つ以上の逆突然変異から選択される。

【0023】

本発明の別の好ましい実施形態では、本発明によるPCSK9と特異的に結合するPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメントに関して、PCSK9抗体は、VHを含み、そのアミノ酸配列は、配列番号：12、配列番号：49、配列番号：50、配列番号：51、配列番号：52、配列番号：53、配列番号：54、配列番号：55、配列番号：56、配列番号：57及び配列番号：58から成る群より選択され、または前記の配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有する配列から成る群より選択される。

【0024】

本発明の別の好ましい実施形態では、本発明によるPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメントに関して、ヒト化抗体軽鎖可変領域の軽鎖FR配列は、ヒト生殖系列軽鎖IGKV1-39*01及びhjk4.1の組合せ配列、またはそれらの変異体配列に由来する。該軽鎖FRが、IGKV1-39*01由来のFR1、FR2、FR3及びhjk4.1由来のFR4またはそれらの変異体配列、または前記の配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含む。

【0025】

本発明の別の好ましい実施形態では、本発明によるPCSK9と特異的に結合するPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメントに関して、ヒト化抗体は、配列番号：11の軽鎖可変領域またはその変異体；該変異体が、配列番号：11に1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個のアミノ酸変化の存在を意味する。該アミノ酸変化が、抗体の親和性または半減期を改善するための当技術分野の技術（例えば、親和性成熟化によるCDRアミノ酸の修飾、または逆突然変異によるFRアミノ酸の修飾）に基づいた修飾であってもよい。

【0026】

本発明の別の好ましい実施形態では、本発明によるPCSK9と特異的に結合するPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメントに関して、ヒト化抗体は、0～10個のアミノ酸逆突然変異を有する軽鎖FR領域を含み、該逆突然変異が、好ましくは、Q3V、A43S及びY87Fから成る1つ以上のアミノ酸逆突然変異から選択される。

【0027】

本発明の別の好ましい実施形態では、本発明によるPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメントは、VLを含み、そのアミノ酸配列は、配列番号：13、配列番号：59、配列番号：60、配列番号：61、配列番号：62、配列番号：63、配列番号：64、配列番号：65、配列番

10

20

30

40

50

号：66、配列番号：67、配列番号：68、配列番号：69及び配列番号：70から成る群より選択され、または前記の配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有する配列から選択される。

【0028】

本発明の別の好ましい実施形態では、本発明によるPCSK9と特異的に結合するPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメントは、以下の群から選択されるVH及びVLを含む：

- 1) 配列番号：12のVH及び配列番号：13のVL；
- 2) 配列番号：49のVH及び配列番号：13のVL；
- 3) 配列番号：50のVH及び配列番号：13のVL；
- 4) 配列番号：51のVH及び配列番号：13のVL；
- 5) 配列番号：52のVH及び配列番号：13のVL；
- 6) 配列番号：53のVH及び配列番号：13のVL；
- 7) 配列番号：12のVH及び配列番号：59のVL；
- 8) 配列番号：12のVH及び配列番号：60のVL；
- 9) 配列番号：12のVH及び配列番号：61のVL；
- 10) 配列番号：12のVH及び配列番号：62のVL；
- 11) 配列番号：12のVH及び配列番号：63のVL；
- 12) 配列番号：12のVH及び配列番号：64のVL；
- 13) 配列番号：54のVH及び配列番号：13のVL；
- 14) 配列番号：55のVH及び配列番号：13のVL；
- 15) 配列番号：56のVH及び配列番号：65のVL；
- 16) 配列番号：12のVH及び配列番号：66のVL；
- 17) 配列番号：12のVH及び配列番号：67のVL；
- 18) 配列番号：57のVH及び配列番号：13のVL；
- 19) 配列番号：58のVH及び配列番号：13のVL；
- 20) 配列番号：12のVH及び配列番号：68のVL；
- 21) 配列番号：12のVH及び配列番号：69のVL；
- 22) 配列番号：12のVH及び配列番号：70のVL；及び
- 23) 配列番号：56のVH及び配列番号：13のVL。

10

20

30

【0029】

本発明の別の好ましい実施形態では、本発明によるPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメントに関して、キメラ抗体またはヒト化抗体の重鎖は、ヒトIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4またはそれらの変異体、またはそれらの配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有する配列に由来する重鎖定常領域を含み；好ましくは、ヒトIgG1、IgG2またはIgG4に由来する重鎖定常領域、またはアミノ酸変異が血清中の抗体の半減期を延長させる、IgG1、IgG2またはIgG4変異体の重鎖定常領域を含み、最も好ましくは、YTE突然変異で導入されたIgG1、IgG2またはIgG4重鎖定常領域を含む。

キメラ抗体またはヒト化抗体の軽鎖は、更にヒト鎖、ヒト鎖またはそれらの変異体、またはそれらの配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有する配列に由来する定常領域を含む。

40

【0030】

本発明の別の好ましい実施形態では、本発明によるPCSK9と特異的に結合するPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメントは、

- 1) 配列番号：71の重鎖配列及び配列番号：73の軽鎖配列；または
 - 2) 配列番号：75の重鎖配列及び配列番号：73の軽鎖配列。
- を含む。

【0031】

一方、本発明は、配列番号：14、配列番号：15または配列番号：16で示されるHCDR、または配列番号：14、配列番号：15または配列番号：16に対して少なくとも95%の配列同一性を有する配列で示されるHCDR、及び配列番号：17、配列番号：18または配列番号：19で

50

示されるLCDR、または配列番号：17、配列番号：18または配列番号：19に対して少なくとも95%の配列同一性を有する配列で示されるLCDRから選択される1つ以上のCDRを含む、PCSK9抗体またはその抗原結合フラグメントを提供する。少なくとも95%の同一性がある配列は、配列番号：20及び配列番号：21から選択されるHCDR1、または配列番号：22～27から選択されるHCDR2、または配列番号：28～30から選択されるHCDR3;または配列番号：31～34から選択されるLCDR1、または配列番号：35～37から選択されるLCDR2、または配列番号：38～42から選択されるLCDR3のようなCDR領域の親和性成熟化によって得られる。本発明のHCDRは、好ましくは配列番号：21、配列番号：24及び配列番号：16を含み、LCDRは、好ましくは配列番号：17、配列番号：18及び配列番号：19を含む。

【0032】

更に本発明は、上記のPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメントをコードするDNA分子を提供する。

【0033】

更に本発明は、上記のDNA分子を含む発現ベクターを提供する。

【0034】

更に本発明は、上記の発現ベクターで形質転換された宿主細胞を提供する。該宿主細胞が、原核細胞及び真核細胞から成る群より選択され、好ましくは真核細胞であり、より好ましくは哺乳動物細胞である。

【0035】

更に本発明は、上記の宿主細胞を核酸の発現に適した条件下で培養すること、上記のPCSK9抗体をコードする、及び/または宿主細胞からPCSK9抗体を回収することを含む、PCSK9抗体の調製方法を提供する。

【0036】

更に本発明は、治療的有効量の上記PCSK9抗体またはその抗原結合フラグメント、及び1つ以上の薬学的に許容される担体、希釈剤または賦形剤を含有する、医薬組成物を提供する。

【0037】

更に本発明は、PCSK9抗体またはその抗原結合フラグメント、または上記の医薬組成物の、PCSK9媒介性疾患または病態を治療するための医薬品の調製における使用を提供する。該疾患または病態が、好ましくは、コレステロール関連疾患（「血清コレステロール関連疾患」を含む）であり;より好ましくは、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、冠状動脈性心疾患、脳卒中、心血管疾患、アルツハイマー病及び一般的な脂質異常症から成る群より選択され;最も好ましくは、高コレステロール血症、脂質異常症、粥状動脈硬化、CVDまたは冠状動脈性心疾患から選択される。

【0038】

本発明による抗体が診断できる典型的な疾患には、コレステロール関連疾患（「血清コレステロール関連疾患」を含む）が含まれる。これに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、冠状動脈性心疾患、脳卒中、心血管疾患、アルツハイマー病及び一般的な脂質異常症から選択される1つ以上のもの（これらの特徴は、総血清コレステロール、LDL、トリグリセリド、超低密度リポタンパク質（VLDL）の増加及び/またはHDLの低下である。）が含まれる。

【0039】

一方で、本発明は、ヒトにおける高コレステロール血症及び/または脂質異常症、粥状動脈硬化、心血管疾患（CVD）または冠状動脈性心疾患から選択される少なくとも1つの症状を治療または予防する方法を提供する。該方法が、有効量のPCSK9抗体をヒトに投与することを含む。また、本発明は、医薬品の調製における細胞外または循環PCSK9に対する有効量のPCSK9抗体の使用を提供する。ここで、該医薬品が、ヒトにおける高コレステロール血症及び/または脂質異常症、粥状動脈硬化、CVDまたは冠動脈性心疾患から選択される少なくとも1つの症状の治療または予防に用いるものである。

【0040】

10

20

30

40

50

本発明に記載の任意の実施形態またはそれらの組合せは、本発明による任意の及び全てのPCSK9抗体、方法及び使用に適している。

【図面の簡単な説明】

【0041】

【図1】各種濃度のPCSK9抗体(h011-3058、h011-3065、h011-3133、h011-3147、h011-3191)におけるHepG2細胞によるLDL取込みの変化。本結果では、PCSK9抗体がHepG2細胞によるLDL取込みを促進できることが示されている。

【図2】各種濃度のPCSK9抗体(h011-3050、h011-3095、h011-3181、h011-3187、h011-3190)におけるHepG2細胞によるLDL取込みの変化。本結果では、PCSK9抗体がHepG2細胞によるLDL取込みを促進できることが示されている。

【図3】マウス(*:p<0.05、*:p<0.01、vs IgG)に各種PCSK9抗体(h011-3133-WT、h011-3133-YTE、h011-3191、h011-3065)を注射した後の血清中LDL-c濃度の変化。本結果では、PCSK9抗体が過剰発現ヒトPCSK9のマウスにおけるLDL-cの血清中濃度を低下させることが示されている。

【図4】マウス(*:p<0.05、vs IgG、*:p<0.01、vs IgG)に各種PCSK9抗体(h011-3058、h011-3191、h011-3147)を注射した後の血清中LDL-c濃度の変化。本結果では、PCSK9抗体が過剰発現ヒトPCSK9のマウスにおけるLDL-cの血清中濃度を低下させることが示されている。

【図5】マウスに各種PCSK9抗体(h011-3133-WT、h011-3133-YTE、h011-3191)を注射した後の血清中LDL-cの相対濃度の変化(IgG群と比較して)。本結果では、IgG群と比べ、PCSK9抗体が過剰発現ヒトPCSK9のマウスにおけるLDL-cの血清中濃度を低下させることが示されている。

【図6】マウスに各種PCSK9抗体(h011-3058、h011-3191、h011-3147)を注射した後の血清中LDL-cの相対濃度の変化(IgG群と比較して)。本結果では、IgG群と比べ、PCSK9抗体が過剰発現ヒトPCSK9のマウスにおけるLDL-cの血清中濃度を低下させることが示されている。発明の詳細な説明

【0042】

本発明の記載または技術及び方法は、一般的に当業者がよく理解し、通常に使用するものである。例えば、次の文献に記載されている広く使われる方法である。Sambrookら、分子クローニング：実験室マニュアル 3 (2001); Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 分子生物学における最新の実験方法 (F. M. Ausubelら, Ed., (2003)); METHOD SINENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.): PCR2: 実用的アプローチ (PCR2: 実用的方法) (M. J. MacPherson, B. D. Hames and G. R. Taylor Ed. (1995)), Harlow and Lane Ed. (1988); 抗体、実験マニュアル及び動物細胞培養物 (R. I. Freshney Ed. (1987)); オリゴヌクレオチド合成 (M. J. Gait Ed. 1984); 分子生物学方法、Humana Press; 細胞生物学：実験ノート (J. E. Cellis Ed. 1998) Academic Press; 動物細胞の培養 (R. I. Freshney) Ed., 1987); 細胞及び組織培養の紹介 (J. P. Mather and P. E. Roberts, 1998) Plenum Press; 細胞及び組織培養：実験手順 (A. Doyle, J. B. Griffiths and D. G. Newell Ed., 1993-8) J. Wiley and Sons; 実験的免疫学ハンドブック (D. M. Weir and C. C. Blackwell Ed.); 哺乳類細胞のための遺伝子導入ベクター (J. M. Miller and M. P. Calos Ed., 1987); PCR: ポリメラーゼ連鎖反応 (Mullisら, Ed. 1994); 免疫学における現在のプロトコル (J. E. Coliganら, Ed., 1991); 分子生物学におけるショートプロトコル (Wiley and Sons, 1999); 免疫学 (C. A. Janeway and P. Travers, 1997); 抗体 (P. Finch, 1997); 抗体：実践的アプローチ (D. Catty Ed., IRL Press, 1988-1989); モノクローナル抗体：実践的アプローチ (P. Shepherd and C. Dean Ed., Oxford University Press, 2000); 抗体の使用：実験室マニュアル (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); 抗体 (M. Zanetti and J. D. Capra Ed., Harwood Academic Publishers, 1995); 及び癌：腫瘍学の原理及び実践 (V. T. DeVitaら, Ed., J. B. Lippincott Company, (1993)。

[定義]

10

20

30

40

50

【 0 0 4 3 】

本明細書の他の箇所で特に定義されていない限り、ここで使用される全ての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ものと同様な意味を有する。Singletonら、微生物学と分子生物学の辞典、第2版 J. Wiley&Sons (New York, N.Y.1994), and March, 上級有機化学反応、メカニズムと構造、第4版, John Wiley&Sons (New York, N.Y. 1992)。本発明で使用される多くの用語は、当業者にいくつかの指針を提供する。ここに引用される全ての参考文献（特許出願及び出版物を含む）は、参照により完全に組み込まれる。

【 0 0 4 4 】

本明細書を解釈するため、以下の定義が使用され、適宜に単数形で使用される用語は複数形を含むことができ、またその逆も可能である。ここで用いられる用語は、ある実施形態のみを説明するためのものであり、限定を意図するものではないことを理解されたい。以下に記載される定義のいずれかが、ここで参考として援用されるいずれかの文献と矛盾する場合、以下に記載される定義が優先する。

【 0 0 4 5 】

ここで用いる用語「プロタンパク質転換酵素サブチリシン/ケキシシ9型（PCSK9）」、「PCSK9」または「NARC-1」とは、特に断りのない限り、霊長類（例えば、ヒト）及びげっ歯類（例えば、マウス及びラット）のような哺乳類を含む、任意の脊椎動物に由来する任意の天然PCSK9をいう。この用語は、「全長鎖」、未処理のPCSK9、ならびに細胞によって産生または処理された任意な形態のPCSK9を包含する。この用語はまた、PCSK9の天然に存在する変異体、例えば、スプライス変異体または対立遺伝子変異体も包含する。

【 0 0 4 6 】

本明細書及び特許請求の範囲において、免疫グロブリンの重鎖中における残基の番付は、Kabatら、免疫学的観点からのタンパク質配列、第5版、公衆衛生サービス、国立衛生研究所、Bethesda, MD, 1991に記載のEUインデックスに従う。ここに上記文献は参照により組み込まれる。「The EU index as in Kabat」とは、ヒトIgG1EU抗体における残基の付番をいう。

【 0 0 4 7 】

用語「可変領域」または「可変ドメイン」とは、抗体の抗原への結合に関与する抗体重鎖または軽鎖ドメインをいう。天然抗体の重鎖及び軽鎖の可変ドメイン（それぞれVH及びVL）は、一般に類似した構造を有し、各ドメインは4つの保存されたフレームワーク領域（FR）及び3つの超可変領域（CDR）を含む（例えば、Kindt Kubyら、免疫学、第6版、W. H. Freeman and Co., p.91 (2007) を参照）。単一のVHまたはVLドメインは、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、抗原に結合する抗体からのVHまたはVLドメインを用いて、それぞれ相補的なVLまたはVHドメインのライブラリーをスクリーニングすることによって単離できる（例えば、Portolanoら、J. Immunol. 150 : 880-887(1993); Clarksonら、Nature 352:624-628(1991)を参照）。

【 0 0 4 8 】

ここで用いる用語「超可変領域」または「HVR」とは、配列が超可変であり、及び/または構造的に規定されたループ（「超可変ループ」）を形成する抗体可変ドメインの各領域をいう。一般に、天然の4本鎖抗体は6つのCDRを含み、3つはVH（H1、H2、H3）内、3つはVL（L1、L2、L3）内にある。CDRは、一般に超可変ループ及び/または「相補性決定領域」（CDR）からのアミノ酸残基を含み、後者は最高の配列可変性及び/または抗原認識に関与する。例示的な超可変ループは、アミノ酸残基26-32（L1）、50-52（L2）、91-96（L3）、26-32（H1）、53-55（H2）及び96-101（H3）に発生する(Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917(1987))。例示的なCDR（LCDR1、LCDR2、LCDR3、HCDR1、HCDR2及びHCDR3）は、アミノ酸残基L1の24～34、L2の50～56、L3の89～97、H1の31～35B、H2の50～65及びH3の95～102に発生する（Kabatら、免疫学的観点からのタンパク質配列、第5版、公衆衛生サービス、国立衛生研究所、Bethesda, MD (1991)）。VHのCDR1を除いて、CDRは一般に、超可変ループを形成するアミノ酸残基を含む。CDRはまた、抗原と接触する残基である

「特異性決定残基」または「SDR」を含む。SDRは、切断CDRまたはa-CDRと呼ばれるCDR領域内に含まれる。例示的なa-CDR（a-LCDR1、a-LCDR2、a-LCDR3、a-HCDR1、a-HCDR2及びa-HCDR3）は、アミノ酸残基L1の31～34、L2の50～55、H3の31～35B、H2の50～58及びH3の95～102に発生する（Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633(2008)を参照）。特に明記しない限り、可変ドメイン中のCDR残基及び他の残基（例えば、FR残基）は、ここでKabatら（上記）に従って付番される。

【0049】

用語「抗PCSK9抗体」、「抗PCSK9」、「PCSK9抗体」または「PCSK9に結合する抗体」とは、ここで互換的に使用されるが、十分な親和性でPCSK9に結合でき、PCSK9を標的化する間の診断薬及び/または治療薬として使用できる抗体をいう。

10

【0050】

ここで用いる用語「抗体」は、最も広い意味で使用され、所望の抗原結合活性を示す限り、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）及び抗体フラグメントを含む様々な抗体構造を有する。

【0051】

用語「全長鎖抗体」、「無処置抗体」及び「完全抗体」とは、ここで互換的に使用され、本来の抗体構造と実質的に類似した構造を有する抗体またはここで定義されるFc領域を含む重鎖を有する抗体をいう。

【0052】

本発明の抗原結合フラグメントは、Fab、Fab'-SH、Fv、scFvまたは(Fab')₂フラグメントから選択される。

20

【0053】

「抗原結合フラグメント」とは、無処置抗体以外の分子をいい、無処置抗体が結合する抗原に結合する無処置抗体の一部を含む。抗原結合フラグメントの例として、Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂；二重特異性抗体；線状抗体；一本鎖抗体分子（例えば、scFv）；及び抗原結合フラグメントによって形成される多重特異性抗体が含まれるが、これらに限定されない。パパインによる抗体の消化は2つの「Fab」フラグメントと呼ばれる同一な抗原結合フラグメントを生じ、それぞれが単一の抗原結合部位及び「Fc」フラグメントを有する。その名前は容易に結晶化できることを反映している。ペプシン処理は、2つの抗原結合部位を有するF(ab')₂フラグメントを生じ、依然として抗原と架橋結合できる。

30

重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインに加えて、Fabフラグメントはまた、軽鎖の定常ドメイン及び重鎖の第1定常ドメイン（CH1）も含む。Fab'フラグメントは、Fabフラグメントと異なる点として、重鎖CH1ドメインのカルボキシル末端に、抗体ヒンジ領域由来の1つ以上のシステイン残基を含むいくつかの残基が付加されている。ここではFab'-SHがFab'のための名称であり、そこに、定常ドメイン内のシステイン残基が遊離チオール基を運ぶ。元々F(ab')₂抗体フラグメントはFab'フラグメント対として産生され、そこに、ヒンジシステインがFab'フラグメントの間に位置した。抗体フラグメントの他の化学的カップリングも知られている。

【0054】

ここで用語「Fc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末端領域を明確にするために使用される。この用語は、天然配列Fc領域及び変異体Fc領域を含む。1つの実施態様では、ヒトIgG重鎖Fc領域は、Cys226またはPro230から重鎖のカルボキシル末端まで伸長する。しかし、C末端リジン（Lys447）はFc領域に存在しても、または存在しなくてもよい。ここで他に特定されない限り、Fc領域または定常領域におけるアミノ酸残基の付番は、Kabatら、免疫学的観点からのタンパク質配列、第5版、公衆衛生サービス、国立衛生研究所、Bethesda, MD, 1991に記載のEU付番システム（EUインデックスとも呼ばれる）に従う。Fc領域は、抗体のエフェクター機能に必要である。該エフェクター機能には、補体依存性細胞傷害（CDC）を引き起こすこと、貧食及び抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ADCC）を引き起こすこと、及び経細胞質輸送により抗体を細胞バリアを越えて移動させることが含まれる。更に、Fc領域はクラスIgGの抗体の血清半減期の維

40

50

持に重要である (Ward and Ghetie, Ther. Immunol. 2:77-94(1995))。IgG抗体の血清半減期はFcの新生児Fc受容体 (FcRn) への結合と関係していることが研究で発見された。FcRnは膜貫通鎖と可溶性鎖 (2-ミクログロブリン) から成るヘテロ二量体である。米国特許第6,165,745号は、抗体をコードするDNAセグメントに突然変異を導入することにより、生物学的半減期が低下した抗体を産生する方法を開示している。該突然変異は、Fcヒンジドメインの253位、310位、311位、433位または434位でのアミノ酸置換を含む。米国特許第6,277,375B1号は、変異体IgG分子を含む組成物を開示しており、該分子は、野生型IgGと比べ、血清半減期が増加され、該変異体IgG分子が以下のアミノ酸置換を含む：252位でスレオニンをロイシニンに、254位でスレオニンをセリンに、または256位 (M252Y、S254T及びT256E) でスレオニンをフェニルアラニンに置換。また、433位、435位、または436位でのアミノ酸置換を有する変異体IgGも開示されている。米国特許第6,528,624号には、IgG Fc領域を含む抗体変異体が開示され、該変異体が、ヒトIgG Fc領域にの1つ以上のアミノ酸位置：270位、322位、326位、327位、329位、331位、333位及び334位にアミノ酸置換を含む。WO 02/060919 A2には修飾IgGが開示され、これが野生型IgG定常ドメインと関連する1つ以上のアミノ酸修飾を含むIgG定常ドメインを含み、該修飾IgGが、野生型IgG定常ドメインを有するIgGと比べ、増加した半減期を有し、そこに、該1つ以上のアミノ酸修飾が、251位、253位、255位、285位～290位、308位～314位、385位～389位及び428位～435位の1つ以上の位置で行われる。具体的には、ここに記載の「YTE」または「YET突然変異」とは、Fc領域とヒトFcRnとの間の結合を促進し、ヒト血清における抗体の半減期を延長するためのIgG1のFc領域における突然変異の組合せをいう。YTE変異体は、3つの「YTE突然変異」：M252Y、S254T及びT256Eの組合せを含む。残基の番付は、KabatらのIgG重鎖の番付等のようなEU番付システム、(EUインデックスとも呼ばれている) (米国特許第7,658,921号参照) に従う。野生型抗体と比べ、YTE変異体抗体の血清における半減期は大きく延長されている (例えば、Dall'Acquaら、J. Biol. Chem. 281:23514-24(2006) 及び米国特許第7,083,784号)。

10

20

30

40

50

【0055】

「Fv」は、完全な抗原結合部位を含む最小の抗原結合フラグメントである。1つの実施形態では、二本鎖Fvは、1つの重鎖可変ドメイン及び1つ軽鎖可変ドメインから成り、二量体の形成に密接に、かつ非共有結合的に関連する。一本鎖Fv (scFv) では、1つの重鎖可変ドメイン及び1つの軽鎖可変ドメインは、可動性ペプチドリッカーを介して共有結合的に連結でき、これにより、軽鎖及び重鎖が二本鎖Fvのそれと類似した「二量体」構造に随伴できる。このような立体配置の中で、各可変ドメインの3つのCDRが相互作用し、VH-VL二量体の表面上の抗原結合部位を明確にしている。まとめると、6つのCDRは抗体に抗原結合特異性を付与する。しかし、単一の可変ドメイン (または抗原に特異的な3つのCDRのみを含むFvの半分) ても抗原を認識して結合する能力を有し、その親和性は結合部位全体の親和性より低い。

【0056】

「一本鎖Fv」または「scFv」抗原結合フラグメントは抗体のVH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として存在する。一般に、scFvポリペプチドは、更にVHドメインとVLドメインとの間にポリペプチドリッカーを含み、これにより、scFvが抗原結合のために所望の構造を形成できる。scFvの総説については、Pluckthun, モノクローナル抗体の薬理学, vol.113, Rosenberg and Moore ed., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)を参照されたい。

【0057】

用語「キメラ抗体」はマウス抗体の可変領域をヒト抗体の定常領域と融合することによって形成される抗体である。キメラ抗体はマウス抗体誘発免疫応答を緩和することができる。キメラ抗体を確立するには、まず、特定のマウスモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを確立し、マウスハイブリドーマ細胞から可変領域遺伝子をクローニングした後、ヒト抗体の定常領域遺伝子を所望通りにクローニングし、マウス可変領域遺伝子をヒト定常領域遺伝子と結合し、ヒトベクターに挿入できるキメラ遺伝子を形成し、最後に、

キメラ抗体分子は真核または原核生物工業系で発現される。本発明の好ましい実施態様では、PCSK9キメラ抗体の軽鎖は、更にヒト 鎖、 鎖またはそれらの変異体に由来する軽鎖Fc領域を含む。PCSK9キメラ抗体の重鎖は、更にヒトIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4、またはそれらの変異体に由来する重鎖Fc領域を含み、好ましくは、ヒトIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4に由来する重鎖定常領域を含み、または好ましくは、アミノ酸変異（例えば、YTE変異）を介し、延長された血清半減期を有するヒトIgG1、IgG2またはIgG4変異体に由来する重鎖定常領域を含む。

【0058】

「ヒト抗体」は、ヒトまたはヒト細胞から産生された抗体、またはヒト抗体レパートリーを利用した非ヒト起源に由来する抗体のアミノ酸配列に対応するアミノ酸配列、または他のヒト抗体コード配列を有する抗体である。このようなヒト抗体の定義は、特に、非ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体を排除する。

【0059】

「ヒト化」抗体とは、非ヒトCDR由来のアミノ酸残基及びヒトFR由来のアミノ酸残基を含むキメラ抗体をいう。ある実施形態では、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、典型的には2つの実質的に全ての可変ドメインを含み、そこには、全てまたは実質的に全てのCDR（例えば、CDR）が非ヒト抗体のそれらに対応し、全てまたは実質的に全てのFRがヒト抗体のそれらに対応する。場合によって、ヒト化抗体はヒト抗体由来の抗体定常領域の少なくとも一部を含むことができる。「ヒト化形態」、例えば、非ヒト抗体とは、ヒト化された抗体をいう。

【0060】

「フレームワーク」または「FR」とは、超可変領域（HRV）残基以外の可変ドメイン残基をいう。可変ドメイン内のFRは、一般に4つのFRドメイン：FR1、FR2、FR3、及びFR4から成る。従って、HRV及びFR配列はVH（またはVL）の中で一般にFR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4の順で現れる。

【0061】

「ヒトコンセンサスフレームワーク」は、ヒト免疫グロブリンVLまたはVHフレームワーク配列の選択において最も一般的に生じるアミノ酸残基を表すフレームワークである。一般に、ヒト免疫グロブリンVLまたはVH配列は可変ドメイン配列のサブタイプから選択される。一般に、配列のサブタイプは、Kabatら、免疫学的観点からのタンパク質配列、第5版、NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vol.1-3に記載されているサブタイプである。1つの実施形態では、VLについて、サブタイプが前記のKabatらに記載されているサブタイプIである。1つの実施形態では、VHについて、サブタイプが前記のKabatらに記載されているサブタイプIIIである。

【0062】

ここのための「受容体ヒトフレームワーク」は、以下に定義されるようなヒト免疫グロブリンフレームワークまたはヒトコンセンサスフレームワークに由来する軽鎖可変ドメイン（VL）フレームワークまた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むフレームワークである。ヒト免疫グロブリンフレームワークまたはヒトコンセンサスフレームワークに「由来」する受容体ヒトフレームワークは、その同じアミノ酸配列を含んでいてもよく、またはアミノ酸配列変化を含んでいてもよい。いくつかの実施形態では、アミノ酸変化の数は10個以下、9個以下、8個以下、7個以下、6個以下、5個以下、4個以下、3個以下または2個以下である。いくつかの実施形態では、VL受容体ヒトフレームワーク配列は、VLヒト免疫グロブリンフレームワーク配列またはヒトコンセンサスフレームワーク配列と同一である。

【0063】

「親和性」とは、分子（例えば、抗体）の単一の結合部位とその結合相手（例えば、抗原）との間の非共有結合相互作用の総和の強さをいう。他に示されない限り、ここで用いる「結合親和性」とは、結合対（例えば、抗体と抗原）のメンバー間の1:1相互作用を反映する内因的な結合親和性をいう。分子XのそのパートナーYに対する親和性は、一般に解

10

20

30

40

50

離定数(Kd)で表すことができる。親和性は、ここに記載のものを含む当技術分野で公知の一般的な方法で測定することができる。結合親和性の測定に関する具体的な図解や例示の実施形態を以下に記載する。

【0064】

「親和性が成熟された」抗体は、それらの変化を持たない親抗体と比べ、抗原に対する抗体の親和性の改善をもたらす、その1つ以上のCDRにおける1つ以上の変化を有する抗体である。

【0065】

用語「宿主細胞」、「宿主細胞株」及び「宿主細胞培養物」とは、交換可能に使用されるが、外因性核酸が導入された細胞（そのような細胞の子孫を含む）をいう。宿主細胞は、「形質転換体」及び「形質転換細胞」を含み、これは継代の数にかかわらず、主に形質転換された細胞及びそれに由来する子孫を含む。子孫は、核酸含有量が親細胞と完全に同一でなくてもよいが、突然変異を含み得る。最初に形質転換された細胞についてスクリーニングまたは選択されたものと同じ機能または生物学的活性を有する突然変異子孫がここに含まれる。

10

【0066】

「単離された」抗体は、その自然環境中の成分から分離された抗体である。いくつかの実施形態では、抗体は、例えば、電気泳動（例えば、SDS-PAGE、電点電気泳動（IEF）、キャピラリー電気泳動）またはクロマトグラフィー（例えば、イオン交換または逆相HPLC）による測定で、95%または99%以上の純度に精製される。概説や抗体純度の評価方法については、例えば、Flatmanら、J. Chromatogr. B 848:79-87(2007)で参照できる。

20

【0067】

「抗PCSK9抗体をコードする単離された核酸」とは、抗体重鎖及び軽鎖（またはそのフラグメント）をコードする1つ以上の核酸分子をいい、単一のベクターまたは別々のベクターにあるもの、また、宿主細胞の1つ以上の位置に存在するものが含まれる。

【0068】

ここで用いる用語「ベクター」とは、それが連結している別の核酸を増殖させることができる核酸分子をいう。この用語は、自己複製核酸構造としてのベクター、及び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。特定のベクターは、作動可能に連結されている核酸の発現を指示することができる。ここでは、そのようなベクターを「発現ベクター」と称する。

30

【0069】

ここで用いる用語「モノクローナル抗体」とは、実質的に均質な抗体の集団から得られた抗体をいい、即ち、自然に起きる突然変異またはモノクローナル抗体の作製過程に生じる変異体抗体（このような変異体は一般に少量で存在する。）を除いて、集団を含む個々の抗体は同一であり、または同じエピトープに結合している。異なる決定基（エピトープ）に対する異なる抗体を典型的に含むポリクローナル抗体の調製とは対照的に、モノクローナル抗体調製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、抗体の実質的に均質な集団から得られる抗体の特性を示し、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解釈されるべきではない。例えば、本発明に従って用いられるモノクローナル抗体は様々な技術によって産生できる。これらの技術として、ハイブリドーマ法、組換えDNA法、ファージディスプレイ法、及びヒト免疫グロブリン遺伝子座の一部または全てを含むトランスジェニック動物を利用する方法が含まれるが、これらに限定されない。モノクローナル抗体を作製するためのこのような方法及びその他の例示的な方法をここに記載する。

40

【0070】

「ネイキッド抗体」とは、異種部分（例えば、細胞傷害性部分）または放射性標識に結合していない抗体をいう。ネイキッド抗体は、医薬製剤中に存在してもよい。

【0071】

「天然抗体」とは、様々な構造を有する天然に存在する免疫グロブリン分子をいう。例

50

例えば、天然IgG抗体は、約150,000ダルトンを有するヘテロ四量体糖タンパク質であり、ジスルフィド結合を介して2つの同一の重鎖に関連する2つの同一の軽鎖から構成される。各重鎖は、N末端からC末端までに可変領域（VH）（可変重ドメインまたは重鎖可変ドメインとも呼ばれる）を有し、続いて3つの定常ドメイン（CH1、CH2及びCH3）が続く。同様に、各軽鎖は、N末端からC末端までに可変領域（VL）（可変軽ドメインまたは軽鎖可変ドメインとも呼ばれる）ドメインを有し、その後は定常軽（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 ）及びラムダ（ λ ）と呼ばれる2つのタイプのうちの1つに割り当てられ得る。

【0072】

参照ポリペプチド配列に対し、「パーセント（%）アミノ酸配列同一性」は、配列を整列させ、間隙を導入した後に、参照ポリペプチド配列中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百分率として定義され、必要に応じて配列同一性の最大パーセントを達成し、そして配列同一性の一部としての保存的置換を考慮しない。パーセントアミノ酸配列同一性を決定するための整列化は、当業者の範囲内の様々な方法によって達成することができる。例えば、BLAST、BLAST-2、ALIGNまたはMegalign（DNASTAR）ソフトウェア等の公的に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用する。当業者は、比較される配列の全長にわたって最大の整列化を達成するために必要とされる任意のアルゴリズムを含む、アライメントを測定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、この目的には、%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を用いて作成される。該ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムがGenentech, Inc. によって作成され、ソースコードは米国著作権局、ワシントンD.C., 20559にユーザー文書と共に提出されており、米国著作権登録番号TXU510087に登録されている。該ALIGN-2プログラムは、カリフォルニア州サウスサンフランシスコのGenentech, Inc. から公的に入手でき、またはソースコードから収集できる。該ALIGN-2プログラムは、UNIX V4.0Dを含むUNIXオペレーティングシステム用に収集すべきである。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、変化しない。

アミノ酸配列比較のためにALIGN-2が使用される状況では、所与のアミノ酸配列Aの、所与のアミノ酸配列Bに、それと、またはそれに対する%アミノ酸配列同一性（その代わりに、所与のアミノ酸配列Bに、それと、またはそれに対して特定の%アミノ酸配列同一性がある所与のアミノ酸配列Aともいえる）は、以下のように計算する：

X/Y の100倍

ここで、Xが、プログラムのA及びBの整列化における配列整列化プログラムALIGN-2による同一のマッチとして得点されたアミノ酸残基の数であり、Yが、Bにおけるアミノ酸残基の総数である。アミノ酸配列Aの長さがアミノ酸配列Bの長さとは等しくない場合、Bに対するAの%アミノ酸配列同一性は、Aに対するBの%アミノ酸配列同一性と等しくない。特に断らない限り、ここで用いる%アミノ酸配列同一性の値は、全てALIGN-2コンピュータプログラムを用いた、直前のパラグラフに記載されるように得られている。

【0073】

薬剤、例えば医薬製剤の「有効量」とは、所望の治療または予防結果を達成するのに必要な用量及び期間での有効な量をいう。

【0074】

ここで用いる用語「高コレステロール血症」とは、コレステロールのレベルがある所望のレベルを上回っている状態をいう。ある実施形態では、LDL-コレステロールのレベルは、該所望のレベルを上回っている。ある実施形態では、血清LDL-コレステロールのレベルは、該所望のレベルを上回っている。

【0075】

「個体」または「被験者」は哺乳動物である。哺乳動物には、家畜（例えば、ウシ、ヒツジ、ネコ、イヌ及びウマ）、霊長類（例えば、ヒト及びサルのようなヒト以外の霊長類）、ウサギ、及びげっ歯類（例えば、マウス及びラット）が含まれるが、これらに限定されない。ある実施形態では、該個体または被験者はヒトである。

【 0 0 7 6 】

用語「医薬製剤」または「医薬組成物」とは、その中に含まれる活性成分の生物学的活性が有効であるような形態にあって、該製剤の投与対象にとって容認できない程度の毒性である更なる成分を含まない製剤をいう。

【 0 0 7 7 】

「薬学的に許容される担体」とは、被験者に無毒である医薬製剤中の有効成分以外の成分をいう。薬学的に許容される担体には、緩衝剤、賦形剤、安定剤、または保存剤が含まれるが、これらに限定されない。

【 0 0 7 8 】

ここで用いる用語PCSK9の「PCSK9活性」または「生物活性」は、PCSK9の任意の生物学的効果を含む。ある実施形態では、PCSK9活性には、基質または受容体と相互作用または結合するPCSK9の能力が含まれる。ある実施形態では、PCSK9の生物学的活性が、LDL受容体（LDLR）に結合するPCSK9の能力である。ある実施形態では、PCSK9活性には、LDLRの利用能を減少または低下させるPCSK9の能力が含まれる。ある実施形態では、PCSK9の生物学的活性には、被験者におけるLDLの量を増加させるPCSK9の能力が含まれる。ある実施形態では、PCSK9の生物学的活性には、被験者におけるLDLに結合するのに利用可能なLDLRの量を減少させるPCSK9の能力が含まれる。ある実施形態では、PCSK9の生物学的活性には、LDLに結合するのに利用可能なLDLRの量を減少させるPCSK9の能力が含まれる。ある実施形態では、PCSK9の生物活性には、PCSK9シグナル伝達から生じる任意の生物学的活性が含まれる。

【 0 0 7 9 】

ここで用いる「治療」とは、治療される個体の自然経過を変える試みにおける臨床的介入をいい、発病予防のため、または臨床病理の過程にも治療を行うことができる。治療の望ましい効果には、疾患の発症または再発の予防、症状の緩和、疾患の直接的または間接的な病理学的結果の減少、疾患の進行速度の低下、疾患状態の緩和または軽減、及び予後の改善が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、本発明の抗体は疾患の発症を遅延させ、または疾患の進行を遅くするために使用される。

[組成物及び方法]

【 0 0 8 0 】

一態様では、本発明は、部分的に、PCSK9抗体の使用によって得られた実験結果に基づいている。得られた結果、抗PCSK9抗体によるPCSK9の生物学的活性を阻害することはLDLRの減少を防止することが示された。更に、この結果では、抗PCSK9抗体の投与は被験者における全LDL-コレステロールのレベルを低下させることが実証された。従って、ここで記載されるように、本発明のPCSK9抗体は、PCSK9関連の病理学的状態（例えば、コレステロール関連障害）を標的とする使用に重要な治療剤及び診断剤を提供する。

【 0 0 8 1 】

ある実施形態では、「コレステロール関連障害」には、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、冠状動脈性心疾患、脳卒中、心臓血管疾患、アルツハイマー病及び一般的な脂質異常症から選択される1つ以上が含まれる。該一般的な脂質異常症の特徴として、例えば、高い総血清コレステロールレベル、高いLDLレベル、高いトリグリセリドレベル、高いVLDLレベル、及び/または低いHDLレベルがある。抗PCSK9抗体が単独、または1つ以上の他の薬剤と組合せて治療できる一次及び二次脂質異常症の例として、これらに限定されないが、メタボリックシンドローム、糖尿病、家族性合併性高脂血症、家族性高トリグリセリド血症、家族性ヘテロ接合性高コレステロール血症、ホモ接合性高コレステロール血症、家族性欠損アポリポタンパク質B-100を含む高コレステロール血症；多価高コレステロール血症；レムナント除去病、肝リパーゼ欠損症；食欲不振、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を含む薬物、ベータ阻害薬及びチアジド利尿薬のいずれかに二次的な脂質異常症；糖尿病性網膜症、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、グリコーゲン貯蔵疾患、肝癌、胆汁うっ滞、先端巨大症、インスリノーマ、単離成長ホルモン欠乏症及びアルコール誘発性

高トリグリセリド血症。また、ここに記載の抗PCSK9抗体は、例えば、冠動脈性心疾患、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、または脳血管疾患及び急性の冠動脈症候群や心筋梗塞の予防または治療に有用である。ある実施形態では、ここに記載の抗PCSK9抗体は、非致命的心臓発作、致命的及び非致命的脳卒中、特定のタイプの心臓手術、心不全による入院、心臓病患者の胸痛、先例性心臓発作、先例性心臓手術、及び/または動脈詰まりの兆候を伴う胸痛のような確立された心臓病による心血管イベントのリスクの低減に有用である。ある実施形態では、ここに記載の抗PCSK9抗体及び方法を用いて再発性心血管イベントのリスクを低減することができる。

【0082】

例示的な抗PCSK9抗体

一態様では、本発明はPCSK9と特異的に結合する単離された抗体を提供する。ある実施形態では、該抗PCSK9抗体がPCSK9の活性を活性化する。

いくつかの実施形態では、該抗PCSK9抗体がヒト化されてもよい。1つの実施形態では、該抗PCSK9抗体が上記実施形態のいずれかで定義されたCDRを含み、更に、ヒト免疫グロブリンフレームワークまたはヒトコンセンサスフレームワークのような受容体ヒトフレームワークを含む。

別の態様では、該抗PCSK9抗体が、配列番号：12及び49～58から選択されるアミノ酸配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性がある重鎖可変ドメイン(VH)を含む。ある実施形態では、該少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の同一性があるVH配列は、参照配列に対する置換（例えば、保存的置換）、挿入または欠失を含むが、前記の配列を含む抗PCSK9抗体は、PCSK9に結合する能力を保持する。ある実施形態では、合計1～10個のアミノ酸が配列番号：12、49～57または58に置換、挿入及び/または欠失されている。ある実施形態では、置換、挿入または欠失は、CDRの外の領域（即ち、FRs）に起きる。場合により、該抗PCSK9抗体が、前記の配列の翻訳後修飾を含む、配列番号：12、49～57または58で示されるVH配列を含む。特定の実施形態では、VHは、(a)配列番号：14、20または21のアミノ酸配列を含むHCDR1；(b)配列番号：15、22～26または27のアミノ酸配列を含むHCDR2；(c)配列番号：16、28～29または30のアミノ酸配列を含むHCDR3から選択される少なくとも1つ、2つ、または3つのCDRを含む。

別の態様では、配列番号：13、59～69または70のアミノ酸配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性がある軽鎖可変ドメイン(VL)を含む、抗PCSK9抗体が提供される。ある実施形態では、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の同一性があるVL配列は、参照配列に対する置換（例えば、保存的置換）、挿入または欠失を含むが、前記の配列を含む抗PCSK9抗体はPCSK9に結合する能力を保持する。ある実施形態では、合計1～10個のアミノ酸は配列番号：13、59～69または70に置換、挿入及び/または欠失されている。ある実施形態では、該置換、挿入または欠失がCDRの外の領域（即ち、FRs）に起きる。場合により、該抗PCSK9抗体が前記配列の翻訳後修飾を含む配列番号：13、15～69または70で示されるVL配列を含む。特定の実施形態では、VLは(a)配列番号：17、31～33または34のアミノ酸配列を含むLCDR1；(b)配列番号：18、35～36または37のアミノ酸配列を含むLCDR2；(c)配列番号：19、38～41または42のアミノ酸配列を含むLCDR3から選択される少なくとも1つ、2つ、または3つのCDRを含む。

別の態様では、上記で提供された実施形態のいずれかに記載のVH及び上記で提供された実施形態のいずれかに記載のVLを含む抗PCSK9抗体が提供される。1つの実施形態では、該抗体が配列番号：12及び配列番号：13にそれぞれ示されるVH及びVL配列、またはそれらの配列の翻訳後修飾を含む。1つの実施形態では、該抗体が配列番号：12及び配列番号：59にそれぞれ示されるVH及びVL配列、またはそれらの配列の翻訳後修飾を含む。1つの実施形態では、該抗体が配列番号：52及び配列番号：13にそれぞれ示されるVH及びVL配列、またはそれらの配列の翻訳後修飾を含む。1つの実施形態では、該抗体が配列番号：54及び配列番号：13にそれぞれ示されるVH及びVL配列、またはそれらの配列の翻訳後修飾を含

10

20

30

40

50

む。1つの実施形態では、該抗体が配列番号：56及び配列番号：65にそれぞれ示されるVH及びVL配列、またはそれらの配列の翻訳後修飾を含む。1つの実施形態では、該抗体が配列番号：56及び配列番号：13にそれぞれ示されるVH及びVL配列、またはそれらの配列の翻訳後修飾を含む。

本発明の更なる態様では、上記実施形態のいずれかによる抗PCSK9抗体はキメラ、ヒト化またはヒト抗体を含むモノクローナル抗体である。1つの実施形態では、該抗PCSK9抗体が抗原結合フラグメントである。例えば、Fv、Fab、Fab'、scFv、二重特異性抗体、またはF(ab')₂フラグメント。もう1つの実施形態では、該抗体が全長鎖抗体である。例えば、無処置のIgG1抗体またはここで定義される他の抗体クラスまたはアイソタイプ。

更なる態様では、上記の実施形態のいずれかによる抗PCSK9抗体は単独でまたは組合せて任意の下記の特徴を有し得る：

1. 抗体親和性

ある実施形態では、ここで提供される抗体の解離定数(K_d)は 1 μM、100 nM、10 nM、1 nM、0.1 nM、0.01 nMまたは 0.001 nM (例えば10E-8M以下、例えば10E-8M ~ 10E-13M、例えば10E-9M ~ 10E-13M) である。

2. 抗原結合フラグメント

ある実施形態では、ここで提供される抗体は抗原結合フラグメントである。抗原結合フラグメントには、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、Fv及びscFvフラグメント、ならびに下記その他のフラグメントが含まれるが、これらに限定されない。特定の抗原結合フラグメントに関する総説については、Hudsonら、Nat. Med. 9:129-134(2003)を参照されたい。scFvフラグメントに関する総説については、例えば、Pluckthun, モノクローナル抗体の薬理学, vol.113, Rosenberg and Moore eds. (Springer-Verlag, New York), p269-315(1994); 国際公開第93/16185号や米国特許第5,571,894号及び第5,587,458号を参照されたい。エピトープ残基と結合するサルベージ受容体を含み、増加したin vivo半減期を有する、Fab及びF(ab')₂フラグメントに関する考察については、米国特許第5,869,046号を参照されたい。

単一ドメイン抗体は、抗体の重鎖可変ドメインの全部または一部、または軽鎖可変ドメインの全部または一部を含む抗原結合フラグメントである。ある実施形態では、単一ドメイン抗体はヒト単一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)。

様々な技術によって抗原結合フラグメントを作製することができる。これには無処置抗体のタンパク質分解消化やここに記載の組換え宿主細胞(例えば、大腸菌またはファージ)による産生が含まれるが、これらに限定されない。

3. キメラ抗体及びヒト化抗体

ある実施形態では、ここで提供される抗体はキメラ抗体である。特定のキメラ抗体は、例えば、米国特許第4,816,567号;及びMorrisonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855(1984)に記載されている。一例では、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、またはサルのような非ヒト霊長類に由来する可変領域)及びヒト定常領域を含む。更なる例では、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化した「クラス交換」抗体である。キメラ抗体にはその抗原結合フラグメントが含まれる。

ある実施形態では、キメラ抗体はヒト化抗体である。典型的には、非ヒト抗体は非ヒト親抗体の特異性及び親和性を保持しながら、ヒトへの免疫原性を低下させるためにヒト化される。一般に、ヒト化抗体はHVR、例えばCDR(またはその一部)が非ヒト抗体に由来する1つ以上の可変ドメインを含み、FR(またはその一部)はヒト抗体配列に由来する。ヒト化抗体は、場合により、ヒト定常領域の少なくとも一部も含む。いくつかの実施形態では、ヒト化抗体中のいくつかのFR残基は、例えば、抗体の特異性または親和性を回復または改善するために、非ヒト抗体由来の対応する残基(例えば、CDR残基が由来する抗体)で置換される。

ヒト化抗体及びその作製方法は、例えば、Almagro and Fransson, Front Biosci. 13:

10

20

30

40

50

1619-1633(2008)に概説され、例えば、Riechmannら、Nature 332 : 323-329(1988); Queenら、Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86:10029-10033(1989); 米国特許第5,821,337号、第7,527,791号、第6,982,321号、及び第7,087,409号; Kashmiriら、Methods 36:25-34(2005)(SDR(a-CDR)移植を記載); Padlan. Mol. Immunol. 28:489-498(1991)(「表面置換」を記載); DaU'Acquaら、Methods 36:43-60(2005)(「FR混合」を記載); Osbournら、Methods 36:61-68(2005)及びKlimkaら、Br. J. Cancer, 83:252-260(2000)(FR混合のための「ガイド選択」アプローチを記載)に更に記載されている。

ヒト化に使用できるヒトフレームワーク領域には、これらに限定されないが、「ベストフィット」法(例えば、SimsらJ. Immunol. 151:2296 (1993)を参照)で選択されたフレームワーク領域; 軽鎖または重鎖可変領域の特定のサブタイプのヒト抗体のコンセンサス配列に由来するフレームワーク領域(例えば、Carterら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285(1992); 及びPrestaら、J. Immunol, 151 :2623 (1993)を参照); ヒト成熟(体細胞性突然変異)フレームワーク領域またはヒト生殖細胞系列フレームワーク領域(例えば、Almagro and Fransson, Front. Bioosci. 13:1619-1633 (2008)を参照); 及びスクリーニングFRライブラリーに由来するフレームワーク領域(例えば、Bacaら、J. Biol. Chem. 272:10678-10684 (1997) 及びRosokら、J. Biol. Chem. 271:22611-22618 (1996)を参照)が含まれる。

4. ライブラリー由来抗体

本発明の抗体は、所望の活性を有する抗体について組合せのライブラリーのスクリーニングによって単離することができる。例えば、ファージディスプレイライブラリーを作製し、所望の結合特性を有する抗体についてそのようなライブラリーをスクリーニングするための様々な方法が、当技術分野において公知である。このような方法は、例えば、Hoogenboomら、分子生物学における方法 178:1-37 (O'Brienら編, Human Press, Totowa, NJ, 2001)で概説され、例えば、McCaffertyら、Nature 348: 552-554; Clacksonら、Nature, 352:624-628(1991); Marksら、J. Mol. Biol. 222:581-597(1992); Marks and Bradbury, 分子生物学における方法, 248:161-175 (Lo, Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhuら、J. Mol. Biol. 338(2):299-310(2004); Leeら、J. Mol. Biol. 340(5):1073-1093(2004); Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(34):12467-12472(2004); 及びLeeら、J. Immunol. Methods 284(1-2):119-132(2004)で更に記載されている。

特定のファージディスプレイ法では、VH及びVL遺伝子のレパートリーを、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって別々にクローニングし、ファージライブラリーでランダムに組み換え、次いで、Winterら、Ann. Rev. Immunol. 12:433-455 (1994)に記載されているように、抗原結合ファージにスクリーニングする。ファージは、典型的には、単鎖Fv(scFv)フラグメントまたはFabフラグメントのいずれかとして、抗原結合フラグメントを提示する。免疫源からのライブラリーは、雑種細胞を構築する必要なく、免疫原に対する高親和性抗体を提供する。あるいは、ナイーブレパートリーは、Griffithsら、EMBO J 12:725-J 12:725-734(1993)に記載されているように、未処置レパートリーをクローン化して(例えば、ヒトから)、ワクチン接種なしで広範囲の非自己及び自己抗原に対する抗体の単一の供給源を提供することができる。最後に、未処置ライブラリーは合成で作製することもできる。Hoogenboom and Winter J. Mol. Biol, 227:381-388(1992)に記載されているように、幹細胞からの再配列されていない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プライマーを用いて高度な可変CDR3領域をコードし、in vitroでの再編成を達成する。ヒト抗体ファージライブラリーを記載する特許公報として、例えば、米国特許第5,750,373号、及び米国特許公開第2005/0079574号、第2005/0119455号、第2005/0266000号、第2007/0117126号、第2007/0160598号、第2007/0237764号、第2007/0292936、及び2009/0002360が含まれる。ここで、ヒト抗体ライブラリーから単離された抗体または抗体フラグメントはヒト抗体またはヒト抗体フラグメントとみなされる。

5. 抗体変異体

ある実施形態では、ここで提供される抗体のアミノ酸配列変異体が熟考される。これは、例えば、結合親和性の改善、血清半減期の延長、及び/または抗体の他の生物学的特性

10

20

30

40

50

に望ましいである。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、またはペプチド合成により調製できる。そのような改変には、例えば、抗体のアミノ酸配列内の残基の欠失及び/または挿入及び/またはそれらの置換が含まれる。最終の構築物を得るには、それが所望の特性、例えば抗原結合を有するならば、欠失、挿入及び置換を任意に組合せることができる。

置換、挿入、及び削除変異体

ある実施形態では、1つ以上のアミノ酸置換を有する抗体変異体が提供される。置換突然変異誘発の対象となる部位には、CDR及びFRが含まれる。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。より実質的な変化は表1の「例示的置換」の見出しの下に示され、アミノ酸側鎖クラスに関して更に以下に記載する。目的の抗体にアミノ酸置換を導入し、生成物を所望の活性（例えば、抗原結合の保持/改善、免疫原性の低下、または半減期の延長）についてスクリーニングすることができる。

【表1】

オリジナル残基	例示的な置換	好ましい置換
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Glv (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Nle	Leu
Leu (L)	Nle; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Try
Pro (p)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucine	Leu

【0083】

共通の側鎖特性に従ってアミノ酸をグループ分けできる：

- (1) 疎水性：ノルロイシン、Met、Ala、Val、Leu、Ile;
- (2) 中性親水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln;
- (3) 酸性：Asp、Glu;
- (4) 塩基性：His、Lys、Arg;
- (5) 鎖の配向に影響を与える残基：Gly、Pro;
- (6) 芳香族：Trp、Tyr、Phe;

非保存的置換は、これらのクラスのうちの1つのメンバーを別のクラスに交換する必要がある。

1つのタイプの置換変異体は、親抗体（例えば、ヒト化抗体またはヒト抗体）の1つ以上の超可変領域残基を置換することを含む。一般に、生成した更なる研究のために選択された変異体は、親抗体に対してある種の生物学的特性（例えば、親和性の増加、半減期の延長または免疫原性の低下）の修飾（例えば、改善）を有し、及び/または親抗体の特定

の生物学的特性を保持する。例示的な置換変異体は、親和性成熟抗体である。これは、例えば、ここに記載されているファージディスプレイに基づく親和性成熟の技術を用いて容易に作製できる。簡潔に言えば、1つ以上のCDR残基が突然変異し、変異体抗体をファージ上に表示し、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する。

【0084】

抗体の親和性を改善するために、CDRに改変（例えば、置換）を行ってもよい。そのような改変は、CDR「ホットスポット」において、即ち、体細胞成熟の過程で高い頻度で突然変異を受けるコドンによってコードされる残基において行うことができる（例えば、Chowdhury, Methods Mol. Biol. 207:179-196(2008) 及び/またはSDRs (a-CDR) を参照）。得られた変異体VHまたはVLは結合親和性について試験される。二次ライブラリーからの構築及び再選択によって得られた親和性成熟については、例えば、Hoogenboomら、分子生物学における方法 178:1-37 (O'Brienら編, Human Press, Totowa, NJ, (2001)に記載されている。親和性成熟に関するいくつかの実施形態では、様々な方法（例えば、エラープロードPCR、鎖シャッフリング、またはオリゴヌクレオチド指向性突然変異誘発）のいずれかで、成熟のために選択された可変遺伝子に多様性を導入する。その後、二次ライブラリーを作製する。次いで、該ライブラリーをスクリーニングし、所望の親和性を有する任意の抗体変異体を同定する。多様性を導入する別の方法として、いくつかのCDR残基（例えば、一度に4~6残基）がランダム化される、CDR指向アプローチがある。例えば、アラニンスキニング変異誘発またはモデリングを用いて、抗原結合に關与するCDR残基を特異的に同定できる。しばしばCDR-H3及びCDR-L3は標的とされる。

10

20

【0085】

ある実施形態では、置換、挿入、または欠失は、そのような改変が抗体の抗原結合能力を実質的に低下させない限り、1つ以上のCDR内で生じ得る。例えば、結合親和性を実質的に低下させない保存的改変（例えば、ここで提供された保存的置換）をCDRにおいて行うことができる。そのような改変は、CDR「ホットスポット」またはSDRの外にあってもよい。上記で提供される変異体VH及びVL配列のある実施形態では、各CDRは改変されていないか、または1個以下、2個以下または3個以下のアミノ酸置換を含む。

【0086】

Fc領域変異体

ある実施形態では、1個以上のアミノ酸修飾を、ここで提供される抗体のFc領域に導入し、それによりFc領域変異体を生成し、Fc領域のヒトFcRnへの結合を促進し、抗体のヒト血清中の半減期を延長させる。Fc領域変異体は、1つ以上のアミノ酸位置で、アミノ酸修飾（例えば、置換）を含むヒトFc領域配列（例えば、ヒトIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4 Fc領域）を含んでもよい。

30

【0087】

アッセイ

当該分野で公知されている様々なアッセイで、ここで提供される抗PCSK9抗体の物理的/化学的特性及び/または生物学的活性について、同定、スクリーニング、または特徴付けできる。

40

1. 結合アッセイ及び他のアッセイ

一態様では、例えば、ELISA、Western Blotら等の既知の方法で、本発明の抗PCSK9抗体の抗原結合活性について試験する。

2. 活性アッセイ

一態様では、生物学的活性を有する抗PCSK9抗体を同定するためのアッセイが提供される。例えば、PCSK9抗体の生物学的活性として、PCSK9の1つ以上の生物活性を阻害、拮抗、阻害、妨害、調節及び/または低減する能力が含まれる。in vivo及び/またはin vitroでの該生物学的活性を有する抗体も提供される。

【0088】

ある実施形態では、抗PCSK9抗体はヒトPCSK9に結合し、LDLRとの相互作用を防止する。

50

ある実施形態では、本発明は単離された抗PCSK9抗体を提供する。これがPCSK9と特異的に結合し、ここに開示されるHepG2細胞におけるin vitroでのLDLRダウンレギュレーションを測定する際、PCSK9によって媒介されるLDLRレベルに対する効果に拮抗する。

【0089】

本発明の抗体が診断できる典型的な疾患として、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、冠状動脈性心疾患、脳卒中、心血管疾患、アルツハイマー病及び一般的な脂質異常症から選択されるコレステロール関連疾患（「血清コレステロール関連疾患」を含む）がある。一般的な脂質異常症が、例えば、血清総コレステロールの上昇、LDLレベルの上昇、トリグリセリドレベルの上昇、超低密度リポタンパク質（VLDL）レベルの上昇、及び/またはHDLレベルの低下を特徴とする。一態様では、本発明は、有効量の抗PCSK9抗体をヒトへ投与することを含む、ヒトにおける高コレステロール血症、及び/または脂質異常症、粥状動脈硬化症、心血管疾患（CVD）または冠状動脈性心疾患から選択される少なくとも1つの症状を治療または予防する方法を提供する。ある実施形態では、本発明は、被験者における高コレステロール血症、及び/または脂質異常症、粥状動脈硬化症、CVDまたは冠状動脈性心疾患から選択される少なくとも1つの症状の治療または予防に使用するための有効量の抗PCSK9抗体を提供する。更に本発明は、ヒトにおける高コレステロール血症、及び/または脂質異常症、粥状動脈硬化症、CVDまたは冠状動脈性心疾患から選択される少なくとも1つの症状を治療または予防するための医薬品の製造における、細胞外または循環PCSK9に拮抗する有効量の抗PCSK9抗体の使用を提供する。

10

20

【実施例】

【0090】

本発明における方法及び組成物の例は以下の通りである。理解すべきこととして、上記の一般的な記載に従い、他に多くの実施例が実施できる。特定の条件が記載されていない本発明の実施例では、実験は一般に、例えば、抗体技術ラボマニュアル及びCold Spring Harborの分子クローニングマニュアルに記載されている従来の条件、または材料や製品のメーカーが提案した条件で実施される。試薬の供給源を特に示さない場合、試薬は市販の慣用試薬である。

【実施例1】

【0091】

PCSK9抗原及び試験タンパク質の調製

30

UniProtプロタンパク変換酵素サブチリシン/ケキシントイプ9（ヒトPCSK9、Uniprot：Q8MBP7）を本発明中のPCSK9のテンプレートとして用いた。場合によって、hisタグまたはPADREペプチド等免疫化を促進するペプチドのような異なる標識をPCSK9タンパク質に融合させた後、融合タンパク質をpTT5ベクター（Biovector、CAT#：102762）またはpTargetベクター（promega、A1410）にクローニングし、一時的に293細胞で発現されるか、またはCHO-Sに安定に発現される。従来法で精製工程を行い、本発明の抗原及び試験タンパク質を得た。その特定の配列を配列番号：1～9に示した。得られたタンパク質またはその変異体タンパク質（例えば、PCSK9 D374Y変異体、PCSK9-Y）は、抗ヒトPCSK9モノクローナル抗体を調製するためまたライブラリーを選択するための抗原として使用した。

hisタグを有するPCSK9：PCSK9-His6、マウスを免疫するための免疫原または検出試薬として使用。

40

MGTVSSRRS~~WW~~PLPLLLLLLLLLLGPAGARAQEDEDGDYEELVLALRSEEDGLAEAPEHGTTATFHRCADPWRLPGTYVV
VLKEETHLSQSERTARRLQAQAARRGYLTKILHVFHGLLPGLVKMSGDLLELALKLPHVDYIEEDSSVFAQSI PWNLER
ITPPRYRADEYQPPDGGSLVEVYLLDTSIQSDHREIEGRVMVTDGFENVPEEDGTRFHRQASKCDSHGTHLAGVVSGRDAG
VAKGASMRSLRVLNCQKGKTVSGTLIGLEFI RKSQVLQPVGPLVLLPLAGGYSRVLNAAQCRLARAGVVLVTAAGNFRD
DACLYSPASAPEVITVGATNAQDQPVTLGTLGTNFGRCVDLFPAGEDIGASSDCSTCFVSQSGTSQAAAHVAGIAAMML
SAPELTLAELRQRLIHFSAKDVI NEAWFPEDQQRVLTPNLVAALPPSTHGAGWQLFCRTVWSAHS GPTRMATAVARCAPD
EELLSCSSFSRSGKRRGERMEAQGGKLVCRAHNAFGGEGVYAI ARCCLLPQANCSVHTAPPAEASMGTRVHCHQQGHVLT
GCSSHWEEVDLGTHKPPVLRPRGQPNQCVGHREASIHASCCHAPGLECKVKEHGI PAPQEQVTVACEEGWTLTGCSALPG
TSHVLGAYAVDNTCVVRSRDVSTTGSTSEGAVTAVAI CCRSRHLAQASQELQH HHHHHH

50

配列番号：1

注：下線付きの配列はシグナルペプチドであり、斜線部分はHis6-タグ配列である。

PADREペプチド及びhisタグを含むPCSK9：PCSK9-PADRE-His6、免疫原として使用、そこに含まれるPADREペプチドが免疫化を促進できる；

MGTVSSRRSWWPLPLLLLLLLLLLGPAGARAQEDEDGDYEELVLALRSEEDGLAEAPEHGTTATFHRCAKDPWRLPGTYVV
VLKEETHLSQSERTARRLQAQAARRGYLTKILHVFHGLLPGLVKMSGDLELALKLPHVDYIEEDSSVFAQSI
PWNLERITPPRYRADEYQPPDGGSLVEVYLLDTSIQSDHREIEGRVM/MTDFENVPEEDGTRFHRQASKCDSHGTHLAGVVSGRDAG
VAKGASMRSLRVLNCQKGKGTVSGTLIGLEFIRKSQVLQPVGPLVLLPLAGGYSRVLNAACQRLARAGVV/LVTAAGNFRD
DACLYSPASAPEVITVGATNAQDQPVTLGTLGTNFGRCVDL/FAPGEDII GASSDCSTCFVSQSGTSQAAAHVAGIAAMML
SAEPELTLAELRQRLIHFSKADVINAEWFPEDQRVLTPLNVAALPPSTHGAGWQLFCRTVWSAHSGPTRMATAVARCAPD
EELLSCSSFSRSGKRRGERMEAQGGKLVCRAHNAFGGEGVYAIARCCLLPQANCSVHTAPPAEASMGTRVHCHQQGHVLT
GCSSHWEVEDLGTHKPPVLRPRGQPNQCVGHREASIHASCCHAPGLECKVKEHGI PAPQEQVTVACEEGWTLTGCSALPG
TSHVLGAYAVDNTCVVRSRDVSTTGSTSEGAVTAVAI CCRSRHLAQASQELQSGAKFVAAWTLKAAAHHHHHH

10

配列番号：2

注：下線付きの配列はシグナルペプチドであり、二重下線の配列はリンカーであり、点線の配列はPADREペプチドであり、斜線部分はHis6-タグである。

TEV切断部位及びhisタグを含むPCSK9の融合タンパク質：PCSK9-TEV-His6。N-PCSK9（N末端PCSK9ドメイン）はTEV酵素消化後の免疫原として得られる。

20

MGTVSSRRSWWPLPLLLLLLLLLLGPAGARAQEDEDGDYEELVLALRSEEDGLAEAPEHGTTATFHRCAKDPWRLPGTYVV
VLKEETHLSQSERTARRLQAQAARRGYLTKILHVFHGLLPGLVKMSGDLELALKLPHVDYIEEDSSVFAQSI
PWNLERITPPRYRADEYQPPDGGSLVEVYLLDTSIQSDHREIEGRVM/MTDFENVPEEDGTRFHRQASKCDSHGTHLAGVVSGRDAG
VAKGASMRSLRVLNCQKGKGTVSGTLIGLEFIRKSQVLQPVGPLVLLPLAGGYSRVLNAACQRLARAGVV/LVTAAGNFRD
DACLYSPASAPEVITVGATNAQDQPVTLGTLGTNFGRCVDL/FAPGEDII GASSDCSTCFVSQSGTSQAAAHVAGIAAMML
SAEPELTLAELRQRLIHFSKADVINAEWFPEDQRVLTPLNVAALPPSTHENLYFQGAGWQLFCRTVWSAHSGPTRMATAV
ARCAPDEELLSCSSFSRSGKRRGERMEAQGGKLVCRAHNAFGGEGVYAIARCCLLPQANCSVHTAPPAEASMGTRVHCHQ
QGHVLTGCSSHWEVEDLGTHKPPVLRPRGQPNQCVGHREASIHASCCHAPGLECKVKEHGI PAPQEQVTVACEEGWTLTG
CSALPGTSHVLGAYAVDNTCVVRSRDVSTTGSTSEGAVTAVAI CCRSRHLAQASQELQHSHHHHHH

30

配列番号：3

注：下線付きの配列はシグナルペプチドであり、二重下線の配列はTEV切断部位であり、斜線部分はHis6タグである。

his-tag を含むPCSK9-D374Y突然変異体タンパク質：PCSK9-D374Y-His6、検出試薬として；

MGTVSSRRSWWPLPLLLLLLLLLLGPAGARAQEDEDGDYEELVLALRSEEDGLAEAPEHGTTATFHRCAKDPWRLPGTYVV
VLKEETHLSQSERTARRLQAQAARRGYLTKILHVFHGLLPGLVKMSGDLELALKLPHVDYIEEDSSVFAQSI
PWNLERITPPRYRADEYQPPDGGSLVEVYLLDTSIQSDHREIEGRVM/MTDFENVPEEDGTRFHRQASKCDSHGTHLAGVVSGRDAG
VAKGASMRSLRVLNCQKGKGTVSGTLIGLEFIRKSQVLQPVGPLVLLPLAGGYSRVLNAACQRLARAGVV/LVTAAGNFRD
DACLYSPASAPEVITVGATNAQDQPVTLGTLGTNFGRCVDL/FAPGEDII GASSYCSTCFVSQSGTSQAAAHVAGIAAMML
SAEPELTLAELRQRLIHFSKADVINAEWFPEDQRVLTPLNVAALPPSTHGAGWQLFCRTVWSAHSGPTRMATAVARCAPD
EELLSCSSFSRSGKRRGERMEAQGGKLVCRAHNAFGGEGVYAIARCCLLPQANCSVHTAPPAEASMGTRVHCHQQGHVLT
GCSSHWEVEDLGTHKPPVLRPRGQPNQCVGHREASIHASCCHAPGLECKVKEHGI PAPQEQVTVACEEGWTLTGCSALPG
TSHVLGAYAVDNTCVVRSRDVSTTGSTSEGAVTAVAI CCRSRHLAQASQELQHSHHHHHH

40

配列番号：4

注：下線付きの配列はシグナルペプチドであり、斜線部分はHis6タグである。

ペプチドBP15及びhisタグを受容するビオチンが挿入されたPCSK9タンパク質：

PCSK9-BP15-His6。検出試薬として、ビオチンは発現中にBP15ペプチド位置に標識され、in vitroでのビオチン標識を回避し、その結果、起こりうる立体配座変化を回避する。

MGTVSSRRSWWPLPLLLLLLLLLLGPAGARAQEDEDGDYEELVLALRSEEDGLAEAPEHGTTATFHRCAKDPWRLPGTYVV

50

VLKEETHLSQSERTARRLQAQAARRGYLTKI LHV FHGLLPGLV KMSGDLLELAL KLPHVDY I EEDSSVFAQS I PWNLER
 ITPPRYRADEYQPPDGGSLVEVYLLDTS IQSDHRE I EGRVMVTD FENVPEEDGTRFHRQASKCDSHGTHLAGVVSGRDAG
 VAKGASMRSLRVLNQCQKGT VSGTL I GLEF I RKSQ L VQPVG PLV VLLPLAGGYSRVLNAACQRLARAGVVLTAAGNFRD
 DACLYSPASAEV I TVGATNAQDQPVTLGTLGTNFGRCVDL FAPGED I I GASSDCSTCFVSQSGTSQAAAHVAG I AAMML
 SAPELTLAELRQRL I HFSKADV I NEAWFPEDQRVLT PNLVAALPPSTHGAGWQLFCRTVWSAHSGPTRMATAVARCAPD
 EELLSCSSFSRSGKRRGERMEAQGGKLVCRAHNAFGGEGVYA I ARCCLLPQANCSVHTAPPAEASMGTRVHCHQQGHVLT
 GCSSHWEVEDLGTHKPPVLRPRGQPNQCVGHREAS I HASCCHAPGLECKVKEHG I PAPQEQVTVACEEGWTLTGCSALPG
 TSHVLGAYAVDNTCVVRSRDVSTTGSTSEGAVTAVA I CCRSRHLAQASQELQGSTSGSGLND I FEAQK I EWHEHHHHHH
 配列番号：5

注：下線付きの配列はシグナルペプチドであり、二重下線の配列はビオチン受容ペプチド
 であり、斜線部分はHis6-タグである。

10

ペプチドBP15及びhisタグを受容するビオチンが挿入されたPCSK9 D374Y変異体タンパク質
 ：PCSK9-D374Y-BP15-His6、検出タンパク質として：

MGTVSSRRSWWPLPLLLLLLLLLLGPAGARAQEDGDYEELVLALRSEEDGLAEAPEHGTTATFHRCAKDPWRLPGTYVV
 VLKEETHLSQSERTARRLQAQAARRGYLTKI LHV FHGLLPGLV KMSGDLLELAL KLPHVDY I EEDSSVFAQS I PWNLER
 ITPPRYRADEYQPPDGGSLVEVYLLDTS IQSDHRE I EGRVMVTD FENVPEEDGTRFHRQASKCDSHGTHLAGVVSGRDAG
 VAKGASMRSLRVLNQCQKGT VSGTL I GLEF I RKSQ L VQPVG PLV VLLPLAGGYSRVLNAACQRLARAGVVLTAAGNFRD
 DACLYSPASAEV I TVGATNAQDQPVTLGTLGTNFGRCVDL FAPGED I I GASSYCSTCFVSQSGTSQAAAHVAG I AAMML
 SAPELTLAELRQRL I HFSKADV I NEAWFPEDQRVLT PNLVAALPPSTHGAGWQLFCRTVWSAHSGPTRMATAVARCAPD
 EELLSCSSFSRSGKRRGERMEAQGGKLVCRAHNAFGGEGVYA I ARCCLLPQANCSVHTAPPAEASMGTRVHCHQQGHVLT
 GCSSHWEVEDLGTHKPPVLRPRGQPNQCVGHREAS I HASCCHAPGLECKVKEHG I PAPQEQVTVACEEGWTLTGCSALPG
 TSHVLGAYAVDNTCVVRSRDVSTTGSTSEGAVTAVA I CCRSRHLAQASQELQGSTSGSGLND I FEAQK I EWHEHHHHHH
 配列番号：6

注：下線付きの配列はシグナルペプチドであり、二重下線の配列はペプチドを受容するビ
 オチンであり、斜線部分はHis6-タグである。

20

Flagタグ及びHisタグを有するPCSK9受容体タンパク質LDLR細胞外ドメイン：LDLR-ECD-Fl
 ag-His6、検出試薬として：

MGPWGWLKRWTVALLAAAGTAVGDRCERNEFQCQDGKCI SYKWVCDGSAECQDGSDESQETCLSVTCKSGDFSCGGRVN
 RC I PQFWRC DGQVDCDNGSDEQGCPPKTC SQDEF RCHD GKC I SRQFVCDSDRDCLDGSDEASCPVLT CGPASFCNSSTC
 I PQLWACDNDPDCEDGSD EWPQRCRGLYVFQGDSSPCSAFEFHCLSGEC I HSSWRCDGGPDCKDKSDEENCAVATCRPDE
 FQCS DGNC I HGSRQC DREYDCKDMSDEVGCVNVT LCEGPNKFKCHSGEC I TLDKVCNMARDCRDWSDEP I KECGTNECLD
 NNGGCSHVCNDLKI GYECLCPDGFQLVAQRRCED I DECQDPDTC SQLCVNLEGGYKCQCEEGFQLDPHTKACKAVGS I AY
 LFFTNRHEVRKMTLDRSEYTSI I PNLRNVAALDTEVASNR I YWSDLSQRM I CSTQLDRAHGVSSYDTV I SRD I QAPDGLA
 VDW I HSN I YWTD SVLGT VSVADTKGVKRKTLFRENGSKPRA I VDPVHGFM YWTDWGT PAK I KKGGLNGVD I YSLVTEN I
 QWPNG I TLDLLSGRLY WVD SKLHS I SS I DVNNGNRKT I LEDEKRLAHPFSLAVFEDKVFTWD I I NEA I F SANRLTGSDVN
 LLAENLLSPEDMVL FHNLTQPRGVNWCERTT LSNGGCQYLCLPAPQ I NPHSPKFTCACPDGM LLARDMRSC L TEAEAAVA
 TQETSTVRLKVSSTA VRTQHTTTTRVPDTSRLPGATPGLTTVE I VTMSHQALGDVAGRGNEKKPSSVRDYKDDDDKHHHH
 HH

配列番号：7

注：下線付きの配列はシグナルペプチド、二重下線の配列はFlagタグ、斜線部分はHis6-
 タグである。

30

40

短縮型LDLR細胞外ドメインとhlgG1 Fc (PCSK9結合活性を有する)との融合タンパク質：L
 DLR-sECD-Fc (hlgG1)、検出試薬として：

MEFGLSWLFLVA I LKGVQCGTNECLDNNGGCSHVCNDLKI GYECLCPDGFQLVAQRRCED I DECQDPDTC SQLCVNLEGG
YKCQCEEGFQLDPHTKACKEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPKPKDTLM I SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
 WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP I EKT I SKAKGQPREPQVYTLPPSRD
 ELTKNQVSLTCLVKGFYPSD I AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHY

50

TQKSLSLSPGK

配列番号：8

注：下線付きの配列はシグナルペプチドであり、二重下線の配列はPCSK9結合活性を有する切断されたLDLR細胞外ドメイン（LDLR-sECD）であり、斜線部分はhIgG1-Fcである。

更に切断されたLDLR細胞外ドメインとhIgG1 Fc（PCSK9結合活性を有する）との融合タンパク質：LDLR-ssECD-Fc（hIgG1）、検出試薬として；

MEFGLSWLFLVAIIKGVQCGTNECLDNNGGCSHVCNDLKI GYECLCPDGFQLVAQRRCEDIDEPKSSDKTHTCPPCPAPE
LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

配列番号：9

注：下線付きの配列はシグナルペプチドであり、二重下線の配列はPCSK9結合活性を有する更に切断されたLDLR細胞外ドメイン（LDLR-ssECD）であり、斜線部分はhIgG1-Fcである。

。

【実施例 2】

【0092】

抗ヒトPCSK9モノクローナル抗体の調製

マウスを免疫して抗ヒトPCSK9モノクローナル抗体を作製した。実験用SJL白マウス、メス、6週齢（北京維通利華実験動物技術有限公司、動物生産ライセンス番号：SCXK(北京)2012-0001）。

給餌環境：SPFレベル。マウスを購入した後、動物を1週間、12/12時間明/暗サイクル、温度20～25℃、湿度40～60%の実験室に保管した。該環境に順応したマウスを6～10匹/各群で以下の2つのスキーム（A/B）に従って免疫化した。免疫化された抗原はHisタグを有するヒトPCSK9であった：PCSK9-His6（配列番号：1）、PCSK9-PADRE-His6（配列番号：2）及びN-PCSK9（配列番号：3）。

スキームA：フロイント免疫賦活剤（Sigmaロット番号：F5881/F5506）による乳化：完全フロイント免疫賦活剤（CFA）による初回免疫、不完全フロイント免疫賦活剤（IFA）による追加免疫。抗原と免疫賦活剤の比は1：1、100 μg/マウス（初回免疫）、50 μg/マウス（追加免疫）であった。0日目に、マウスに乳化抗原を100 μg/マウスで腹腔内（IP）注射し、初回免疫の後、2週間ごとに1回、合計6～8週間実施した。

スキームB：Titermax（Sigmaロット番号：T2684）及びAlum（Thremoロット番号：77161）による交差免疫。抗原と免疫賦活剤（titermax）の比は1：1であり、抗原と免疫賦活剤（Alum）の比は3：1、10～20 μg/マウス（初回免疫）、5 μg/マウス（追加免疫）であった。0日目に、マウスに乳化抗原を20/10 μg/マウスで腹腔内（IP）注射し、初回免疫の後、1週間に1回、Titermax及びAlumを交互に使用し、合計6～11週間投与した。免疫化の4週間後、背部及び腹部の腫脹状態に応じて、抗原の背部注射または腹腔内注射を選択した。

【実施例 3】

【0093】

ライブラリーの構築

免疫化したマウスの脾臓をフィルターでふるいにかけ、PBSで洗浄した。次にRNAを抽出し、逆転写によりcDNAを得た。Kabat（Kabatら、免疫学的観点からのタンパク質配列、第5版、公衆衛生サービス、国立衛生研究所、Bethesda, MD, (1991)）に従って抗体の残基を付番した。重鎖及び軽鎖は、上流プライマー混合物及び下流プライマー混合物を用いて別々に増幅した。プライマーは、Brocksら 2001に基づいて設計した。SfiI制限部位及び保護塩基を重鎖上流プライマーに組み込み、リンカーの部分配列を下流プライマーに組み込み、重鎖下流プライマーに相補的であったリンカーの部分配列を軽鎖上流プライマーに組み込み、別のSfiI制限部位及び保護塩基を下流プライマーに組み込んだ。増幅したVH及びVLフラグメントをゲル回収により回収し、オーバーラップPCRによりscFv（VH-(G4S)3-V

Lを含む)にスプライスした。ファージミドベクター及びscFvはいずれもsf11で消化され、次いで互いに連結した。大腸菌株SS320はエレクトロ変換された。該ライブラリーの容量は約1E9であった。

【実施例 4】

【0094】

スクリーニング

ヘルパーファージ (NEB、N0315S) を有するファージ粒子に大腸菌ライブラリーをパッケージングした後、液相法によりパニングを行った。ファージを液相中のビオチン化PCSK9に結合させ、ストレプトアビジンビーズで分離した。2ラウンドのパニングの後、ファージELISAアッセイのためにファージからモノクローナル抗体を採取した。アッセイは2つの部分：結合活性及び阻害活性に分けられた。結合活性：ELISAプレートに2 ng/μlのストレプトアビジンでコーティングし、1 ng/μlのビオチン化PCSK9 (配列番号：5) と培養した。1：1阻害緩衝液 (1×PBS+2% スキムミルク) で希釈したファージ上清を加え、最後に抗M13 HRP (GE、27-9421-01) で検出した。阻害活性：ファージ上清の培養中に最終濃度50 ng/μlのLDLR-Fc (配列番号：8) を添加したこと以外は結合活性と同様であった。結合活性の試験から得られたELISA OD45値を、阻害活性の試験から得られたELISA OD45値で割って、その結果が2.0より大きい値を有するクローンを、マウスクローンmAb-011を含めてスクリーニングし、配列決定のため更にスクリーニングした。

10

【実施例 5】

【0095】

キメラ抗体の発現及び同定

選択されたクローン (mAb-011を含む) をIgG1/ キメラ抗体発現ベクターに構築し、哺乳動物細胞で一過的に発現させた。プロテインAアフィニティー精製後、PCSK9 (WT PCSK9、配列番号：5) 及びPCSK9-Y (変異体PCSK9、配列番号：6) の結合活性を試験 (試験例1及び2) し、EC50値を計算した。また、野生型PCSK9及びPCSK9-Yの阻害活性も試験 (試験例3及び4) し、IC50値を計算した。結合活性に関する試験では、ストレプトアビジン被覆プレートを用いて、ビオチン化PCSK9 (またはPCSK9-Y) を培養し、次いで連続的に希釈したキメラ抗体を培養した。阻害活性に関する試験では、LDLR-Fc被覆プレートを用いて、プレートをブロッキングし、連続に希釈したキメラ抗体及びビオチン化PCSK9 (またはビオチン化PCSK9-Y) を同時に培養し、次いで検出のためにストレプトアビジンHRPを培養した。活性のより良いキメラ抗体ch-011 (表2参照) を重要な分子として後のヒト化のためスクリーニングした。

20

30

【表 2】

キメラ抗体の結合活性及び阻害活性

受容体	Ch-011	
	結合活性 EC50 (ug/ml)	阻害活性 IC50 (ug/ml)
PCSK9 WT	0.005	0.263
PCSK9Y 変異体	0.050	3.113

40

本発明でスクリーニングしたPCSK9キメラ抗体ch-011について、PCSK9/PCSK9-Yタンパク質への結合活性を調べた。本結合試験の結果より、ch-011抗体は、PCSK9/PCSK9-Yに対して有効な結合活性を有し、PCSK9に対してより高い結合活性を有することが示された。

本発明でスクリーニングしたPCSK9キメラ抗体ch-011について、LDLRとPCSK9/PCSK9-Yとの結合に対する阻害活性を調べた。本阻害試験の結果より、ch-011抗体はLDLRとPCSK9/PCSK9-Yとの結合に対して有効な阻害活性を有し、LDLRとPCSK9との結合により高い阻害効果を有することが示された。

【実施例 6】

【0096】

50

mAb-011のヒト化及び同定

キメラ抗体実験の結果に基づいてヒト化のためにマウス由来クローンmAb-011を選択した。ヒト化の方針はCDR移植の方針と同様であった。重鎖軽鎖可変領域のヒト生殖系列遺伝子データベースと整列させた後、マウスmAb-011配列と最も相同性の高い生殖系列遺伝子をテンプレートとして選択した。マウス抗体mAb-011のヒト化軽鎖テンプレートはIGKV1-39*01及びhjk4.1であり、ヒト化重鎖テンプレートはIGHV1-2*02及びhjh6.1であり、ヒト化可変領域配列は以下の通りである：

> h011-1 VH (CDR graft)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYT IHWVRQAPGQGLEWMGYINPSSTYTKFNQKFKDRV/TMTRDTSI STAY
MELSRRLRSDDTAVYYCARER IYSNYWFFDVWGQGTTVTVSS

配列番号：10

> h011-1 VL (CDR graft)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCKASQNVYTAVAWYQQKPGKAPKLL IYSASNRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SSLQP
EDFATYYCQQYSSYPYTFGGGTKVEIK

配列番号：11

組合せ（表3）のためCDR移植後に異なる逆突然変異を選択した。設計されたヒト化配列は完全に遺伝子合成され、哺乳動物発現のために重鎖及び軽鎖を互いに組合せた（表4）。タンパク質を精製した後、キメラ抗体の場合と同様に阻害活性に関する試験を行った（方法については試験3及び4を参照、その結果を表5に示す）。いくつかのクローン化タンパク質を選択し、表面プラズモン共鳴（SPR）（Biacore X100、GE、試験5参照）により解離定数を測定した。CM5チップ（GE）上のAmine-Coupling抗Fc-pAb(GE)により試験試料を捕捉した。PCSK9（配列番号：1）またはPCSK9-Y（配列番号：4）は移動相で、ワーキング緩衝液は1X HBS-EP⁺、pH7.4で、再生緩衝液は3M MgCl₂であった。その結果を表6に示す。

【表3】

mAb-011 のテンプレート選択及び逆突然変異設計

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

10

20

30

【表 4】

重鎖と軽鎖の組合せ

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

10

20

注：この表は様々な突然変異を組合せて得られた配列を示している。h011-5で示されるように、ヒト化抗体h011-5の上には2つの突然変異（重鎖h011_VH.1A及び軽鎖h011_VL.1A）があった。等々。

ELISA試験を行い、PCSK9またはPCSK9-Yへの結合を検出した（試験1及び2参照）。上記ELISA試験で検出された陽性細胞を更にELISA試験に用い、PCSK9/PCSK9-YのLDLRへの結合に対する阻害を検出した（試験3及び4参照）。軽鎖及び重鎖の組合せは、最終的にh011-VH.1及びh011-VL.1Bとして同定された。ヒト化h011-3の重鎖及び軽鎖可変領域配列は以下の通りであった：

>h011-3 VH

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYTIHWVRQAPGQGLEWMGYINPSSTYTKFNQKFKDRVMTMRDTSISTAY
MELSRLRSDDTAVYYCARERIYSNYWFFDVWGQGTTVTVSS

配列番号：12

>h011-3 VL

DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVYTAVAWYQQKPGKSPKLLIYSASNRYTGVPSPRFSGSGSGTDFTLTISLQPE
EDFATYFCQQYSSYPYTFGGGTKVEIK

配列番号：13

30

【表 5】

LDLR-FC の PCSK9 または PCSK9-Y への結合に対するキメラ
抗体及びヒト化抗体の阻害活性

クローン番号	IC50	
	PCSK9 (ug/ml)	PCSK9-Y (ug/ml)
ch-011	0.2028	3.552
h011-3	0.2055	5.127

10

本発明によりスクリーニングされたPCSK9キメラ抗体またはヒト化抗体の野生型/変異体PCSK9タンパク質への結合試験の結果、h011-3及びch-011抗体は野生型/変異体PCSK9に対して高い結合活性を有し、野生型PCSK9に対するh011-3及びch-011抗体の結合活性はより高いことが示された。

【表 6】

ヒト化後のいくつかの試料の解離定数

20

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

注：ch011：mAb-011キメラ抗体

野生型/変異体PCSK9に対する本発明によりスクリーニングされたPCSK9キメラ抗体またはヒト化抗体のBiacore試験の結果、h011-3及びch-011はより低い平衡解離定数及び高い親和性を有し、h011-3及びch-011は野生型PCSK9に対してより高い親和性を有することが示された。

30

【実施例 7】

【0097】

h011-3の親和性成熟

マウスmAb-011及びそのヒト化抗体h011-3のPCSK9-Yへの親和性が低いため、我々は、h011-3を用いてPCSK9-Yに対する親和性成熟を行うことにした。該親和性成熟にはM13ファージディスプレイ技術を用いた。コドンに基づいたプライマー（プライマーの合成において、単一コドンは野生型コドンとNNKから成る）を採用し、各CDRに突然変異を導入し、別のファージディスプレイライブラリを構築した。CDRの長さに基づいてライブラリーに必要なNNKとライブラリーサイズの比を調整した（表7）。

40

【表 7】

ライブラリーサイズ及びNNK 取込み率

Lib	CDR の長さ	NNK 比	Lib サイズ
H1	5	50%	>2E7
H2	17	20%	>1E8
H3	12	30%	>1E8
L1	11	30%	>1E8
L2	7	50%	>2E7
L3	9	40%	>1E8

10

パニングのため、構築された6つのライブラリーをファージにパッケージングした：液相中のビオチン化PCSK9-Y（配列番号：6）に関連し、ストレプトアビジンで捕獲し、洗浄し、溶出し、次にパニングのために大腸菌に再感染させた。ビオチン化されたPCSK9-Yの濃度はパニングの各ラウンドにおいて10倍減少した。3～4ラウンドのパニングの後、シーケンシング検証のために各ライブラリーから単一のクローンを選択した。CDR領域のアミノ酸残基の濃縮度に応じていくつかのクローンを選択し、哺乳動物細胞における発現のための全長鎖Igを構築した；一方、異なるCDRの濃縮度を有する突然変異については、人工的に組合せ、哺乳動物細胞発現のための全長鎖Igとして構築した（表8～11に示すように）。

20

精製後、クローン化タンパク質をELISAに用い、PCSK9（試験1）及びPCSK9-Y（試験2）への結合を検出した。次に、前記ELISAで検出された陽性細胞をELISA試験に用い、PCSK9-Y/LDLR結合に対する阻害を検出し（試験3）、またPCSK9/LDLR結合に対する阻害を検出した（試験4）。その結果を表12～15に示す。

30

その結果、本発明で得られたPCSK9抗体はPCSK9及びPCSK9-Yと高い結合活性を有し、PCSK9/PCSK9-YのLDLRへの結合を効果的に阻害できることが示された。

【表 8】

濃縮クローン及び人工組合せクローンの CDR 配列

クローン番号	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
h011-3	GYTIH	YINPSSTYT KFNQKFKD	ARERIYSNYW FFDV	KASQNV YTAVA	SASNRY T	QQYSSY PYT
配列番号	14	15	16	17	18	19
h011-3050	-----	e-1----- -----	----- -----	----- -----	----- -	----- ---
配列番号	14	22	16	17	18	19
h011-3058	-----	e----g--- -----	----- -----	----- -----	----- -	----- ---
配列番号	14	23	16	17	18	19
h011-3065	--d--	----- -----	----- -----	----- -----	----- -	----- ---
配列番号	20	15	16	17	18	19
h011-3070	-----	----- -----	---n--f--- ---r	----- -----	----- -	----- ---
配列番号	14	15	28	17	18	19
h011-3073	-----	----- -----	---n--f--- ---r	----- -----	----- -	----- ---
配列番号	14	15	29	17	18	19
h011-3093	-----	----- -----	----- -----	----- -----	emv--- -	----- ---
配列番号	14	15	16	17	35	19
h011-3095	-----	----- -----	----- -----	----- -----	e----- -	----- ---
配列番号	14	15	16	17	36	19
h011-3111	-----	----- -----	----- -----	----- -we-d	----- -	----- ---

10

20

30

40

配列番号	14	15	16	31	18	19
h011-3118	-----	----- -----	----- -----	----- -we-v	----- -	----- ----
配列番号	14	15	16	32	18	19
h011-3120	-----	----- -----	----- -----	----- -----	----- -	---f-wf ----
配列番号	14	15	16	17	18	38
h011-3121	-----	----- -----	----- -----	----- -----	----- -	---l---q -e-
配列番号	14	15	16	17	18	39
h011-3133	--e--	-----a----- -----	----- -----	----- -----	----- -	----- ----
配列番号	21	24	16	17	18	19
h011-3147	-----	e-i----- -----	----- -----	----- -----	----- -	----- ----
配列番号	14	25	16	17	18	19
h011-3174	-----	----- -----	-----f----- -----	----- -----	q----- -	----- ----
配列番号	14	15	30	17	37	19
h011-3181	-----	----- -----	----- -----	----- -----	----- -	---l--- -d-
配列番号	14	15	16	17	18	40
h011-3187	-----	----- -----	----- -----	----- -----	----- -	---l---s -e-
配列番号	14	15	16	17	18	41
h011-3190	-----	e----- -----	----- -----	----- -----	----- -	----- ----
配列番号	14	26	16	17	18	19

10

20

30

40

h011-3191	-----	--v----- -----	----- ----	----- -----	----- -	----- ---
配列番号	14	27	16	17	18	19
h011-3192	-----	----- -----	----- ----	----- --e--	----- -	----- ---
配列番号	14	15	16	33	18	19
h011-3193	-----	----- -----	----- ----	----- ---d	----- -	----- ---
配列番号	14	15	16	34	18	19
h011-3194	-----	----- -----	----- ----	----- -----	----- -	--1--- ---
配列番号	14	15	16	17	18	42
h011-3195	-----	----- -----	-----f----- ----	----- -----	----- -	----- ---
配列番号	14	15	30	17	18	19

10

20

濃縮クローン及び人工組合せクローンのCDR配列 上記表8中の人工組合せクローンのCDR配列を表9に定義してまとめることができる：

【表9】

本発明中の抗体の CDR 配列

クローン 番号	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
h011 3	GYX ¹ IH	X ² IX ³ PSX ⁴ TY TKFNQKFKD	AREX ⁵ IX ⁶ X ⁷ NYW FFDX ⁸	KASQNVYX ₁ X ₂ VX ₃	X ₄ X ₅ X ₆ N RYT	QQX ₇ SX ₈ X ₉ PX ₁₀ T
配列番号	43	44	45	46	47	48

30

X¹はT、DまたはEから選択される；

X²はYまたはEから選択され；X³はN、L、IまたはVから選択され；X⁴はS、GまたはAから選択される；

X⁵はRまたはNから選択され；X⁶はYまたはFから選択され；X⁷はSまたはFから選択され；X⁸はVまたはRから選択される；

X₁はTまたはWから選択され；X₂はAまたはEから選択され；X₃はA、DまたはVから選択される；

X₄はS、EまたはQから選択され；X₅はAまたはMから選択され；X₆はSまたはVから選択される。

X₇はY、FまたはLから選択され；X₈はSまたはWから選択され；X₉はY、F、QまたはSから選択され；X₁₀はY、DまたはEから選択される。

モノクローナル抗体の軽鎖及び重鎖可変領域配列の人工的な組合せを以下の表10に示す。

40

【表 10】

モノクローナル抗体の可変領域配列の組合せ

クローン番号	VH	VL
	配列番号	配列番号
h011-3	12	13
h011-3050	49	13
h011-3058	50	13
h011-3065	51	13
h011-3070	52	13
h011-3073	53	13
h011-3093	12	59
h011-3095	12	60
h011-3111	12	61
h011-3118	12	62
h011-3120	12	63
h011-3121	12	64
h011-3133	54	13
h011-3147	55	13
h011-3174	56	65
h011-3181	12	66
h011-3187	12	67
h011-3190	57	13
h011-3191	58	13
h011-3192	12	68
h011-3193	12	69
h011-3194	12	70
h011-3195	56	13

軽鎖及び重鎖の可変領域配列を表11に示した。

10

20

30

40

【表 1 1】

配列番号	配列
50	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGTYIHWRQAPGGLEWMGEINPSGTYTK FNQKFKDRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARERIYSNYWFFDVWGQGTITV VSS
51	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYDIHWVRQAPGGLEWMGYINPSSTYTK FNQKFKDRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARERIYSNYWFFDVWGQGTITV VSS
52	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGTYIHWRQAPGGLEWMGYINPSSTYTK FNQKFKDRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARENIYFNYWFFDRWGQGTITV VSS
53	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGTYIHWRQAPGGLEWMGYINPSSTYTK FNQKFKDRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARENIFSNYWFFDRWGQGTITV VSS
54	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYEIHWRQAPGGLEWMGYINPSATYTK FNQKFKDRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARERIYSNYWFFDVWGQGTITV VSS
55	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGTYIHWRQAPGGLEWMGEIIPSSTYTK FNQKFKDRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARERIYSNYWFFDVWGQGTITV VSS
56	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGTYIHWRQAPGGLEWMGYINPSSTYTK FNQKFKDRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARERIFSNYWFFDVWGQGTITV VSS
57	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGTYIHWRQAPGGLEWMGEINPSSTYTK FNQKFKDRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARERIYSNYWFFDVWGQGTITV VSS
58	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGTYIHWRQAPGGLEWMGYIVPSSTYTK FNQKFKDRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARERIYSNYWFFDVWGQGTITV VSS

10

20

30

40

59	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVYTAVAWYQQKPGKSPKLLIYEMVNRYTGVP SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYFCQQYSSYPYTFGGGTKVEIK
60	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVYTAVAWYQQKPGKSPKLLIYEASNRYTGVP SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYFCQQYSSYPYTFGGGTKVEIK
61	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVYWEVDWYQQKPGKSPKLLIYSASNRYTGVP SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYFCQQYSSYPYTFGGGTKVEIK
62	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVYWEVWYQQKPGKSPKLLIYSASNRYTGVP SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYFCQQYSSYPYTFGGGTKVEIK
63	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVYTAVAWYQQKPGKSPKLLIYSASNRYTGVP SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYFCQQFSWFPYTFGGGTKVEIK
64	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVYTAVAWYQQKPGKSPKLLIYSASNRYTGVP SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYFCQQQLSSQPETFGGGTKVEIK
65	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVYTAVAWYQQKPGKSPKLLIYQASNRYTGVP SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYFCQQYSSYPYTFGGGTKVEIK
66	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVYTAVAWYQQKPGKSPKLLIYSASNRYTGVP SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYFCQQQLSSYPDTFGGGTKVEIK
67	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVYTAVAWYQQKPGKSPKLLIYSASNRYTGVP SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYFCQQQLSSSPETFGGGTKVEIK
68	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVYTEVAVAWYQQKPGKSPKLLIYSASNRYTGVP SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYFCQQYSSYPYTFGGGTKVEIK
69	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVYTAVDWYQQKPGKSPKLLIYSASNRYTGVP SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYFCQQYSSYPYTFGGGTKVEIK
70	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVYTAVAWYQQKPGKSPKLLIYSASNRYTGVP SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYFCQQQLSSYPYTFGGGTKVEIK

10

20

30

40

50

【実施例 8】

【0098】

抗ヒトPCSK9ヒト化抗体のIgG1及びIgG1-YTEフォーマットの構築及び発現

PCRプライマーを設計し、ヒト化抗体のVH/VK遺伝子フラグメントを構築した。次いで、VH/VK遺伝子フラグメントを発現ベクターpHr（シグナルペプチド及び定常領域遺伝子（CH1-FC/CL）フラグメントを有する）と相同的に組み換え、全長鎖抗体発現ベクターVH-CH1-FC-pHr/VK-CL-pHrを構築した。IgG1-YTE抗体フォーマットは、IgG1抗体フォーマットのポイント突然変異を介して得ることができる。いくつかの抗体フォーマットを設計し、構築した。1)h011-3133-WT：h011-3133-IgG1フォーマット、即ち、ヒト化配列組合せh011-3133；ヒトIgG1由来の重鎖定常領域及びヒト鎖由来の軽鎖定常領域と組合せたもの2)h011-3133-YTE：h011-3133-IgG1-YTEフォーマット、即ち、ヒト化配列組合せh011-3133、変異体ヒトIgG1（YTE変異体）由来の重鎖定常領域とヒト鎖由来の軽鎖定常領域を組合せたもの。変異体ヒトIgG1は突然変異の別のフォーマットであってもよい。

突然変異した抗体のBIAcoreとの親和性について試験した（試験6）。その結果を表16に示した。

h011-3133-IgG1

重鎖：IgG1のアミノ酸配列

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYEIHWWVRQAPGQGLEWMGYINPSATYTKFNQKFKDRVMTMRDTSISTAY
 MELSRRLRSDDTAVYYCARERIYSNYWFFDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
 SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLG
 GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
 KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPP
 VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

配列番号：71

重鎖DNA配列：

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTTCTTGTCGCGATTCTTAAGGGTGTCAGTGCCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGG
 CGCCGAGGTGAAGAAGCCCGGAGCATCTGTGAAGGTGCTTGTAAGGCCTCTGGCTATACCTTTACCGGCTACGAGATCC
 ACTGGGTGCGGCAGGCACCCGGGAGGGCCTGGAGTGATGGGCTACATCAACCCCTCTGCTACCTACACCAAGTTTAAAC
 CAGAAAGTTCAGGACCGGGTGACCATGACCCGGGACACCTCTATCTCTACCGCCTACATGGAGCTGTCTCGGCTGCGGTC
 TGACGACACCGCCGTGTACTACTGCGCACGCGAACGGATCTACTCTAACTACTGGTCTTCGACGTGTGGGGCCAGGGCA
 CCACCGTGACCGTGTCTTCTGCTTCGACCAAGGGCCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGG
 GGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCAGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGCGCCCTGAC
 CAGCGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCA
 GCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCC
 AAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCC
 CCCCCAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACC
 CTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAAC
 AGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTGCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTC
 CAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCC
 TGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATC
 GCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTCTGGACTCCGACGGCTCCTT
 CTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGG
 CTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

配列番号：72

h011-3133-

軽鎖のアミノ酸配列：軽鎖

DIVMTQSPSSLSASVGDRVITCKASQNVYTAWAYQQKPGKSPKLLIYSASNRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTISLQRP
 EDFATYFCQQYSSYPYTFGGGKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
 ESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

配列番号：73

軽鎖DNA配列：

ATGGACATGCGCGTGCCCGCCAGCTGCTGGGCCTGCTGCTGCTGTGGTTCCCCGGCTCGCGATGCGACATCGTGATGAC
 CCAGTCTCCCTCATCTCTGAGTGCTCTGTTGGCGACCGGGTGACCATCACCTGCAAAGCCTCTCAGAACGTATACACAG
 CCGTGGCCTGGTATCAACAGAAGCCCGGCAAGTCCCCAAGCTGCTGATTTACTCTGCCTCTAACCGGTACACCGGCGTG
 CCCTCTCGGTTCTCTGGCTCTGGTCTGGCACCGACTTCACCCCTGACTATCTTCTCTGACGCCGAGGACTTCGCCAC
 CTACTTCTGCCAGCAGTACTCTTCTTACCCCTACACCTTCGGCGGAGGCACCAAGGTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCTG
 CACCATCTGTCTTCTATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCTGCTGAATAAC
 TTCTATCCCAGAGAGGCCAAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAAGTCCCAGGAGAGTGTACAGA
 GCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCT
 ACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTGA

配列番号：74

h011-3133-IgG1-YTE (軽鎖：h011-3133- 配列番号：73)

重鎖のアミノ酸配列：IgG1-YTE

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYEIHWWVRQAPGQGLEWMGYINPSATYTKFNQKFKDRVMTMRDTSISTAY
 MELSRRLRSDDTAVYYCARERIYSNYWFFDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV

SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV/PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG
GPSVFLFPPKPKDLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

配列番号：75

重鎖DNA配列：

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTTCTTGTCGCGATTCTTAAGGGTGTCCAGTGCCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGG
CGCCGAGGTGAAGAAGCCCGGAGCATCTGTGAAGGTGTCTTGTAAGGCCTCTGGCTATACCTTTACCGGCTACGAGATCC
ACTGGGTGCGGCAGGCACCCGGGAGGGCCTGGAGTGGATGGGCTACATCAACCCCTCTGCTACCTACACCAAGTTTAAAC
CAGAAAGTTCAAGGACCGGGTGACCATGACCCGGGACACCTCTATCTCTACCGCCTACATGGAGCTGTCTCGGCTGCGGTC
TGACGACACCGCCGTGTACTACTGCGCACGCGAACGGATCTACTCTAACTACTGGTTCTTCGACGTGTGGGGCCAGGGCA
CCACCGTGACCGTGTCTTCTGCTTCGACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGG
GGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCGCCCTGAC
CAGCGCGGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCA
GCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCC
AAATCTTGTCACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCC
CCCCAAACCCAAGGACACCCTCTACATCACCCGGGAGCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACC
CTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAAC
AGCACGTACCGTGTGGTACGCGTCCCTACCGTCTGCACCAAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTC
CAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAAACCATCTCCAAGGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCC
TGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATC
GCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAACTACAAGACCACGCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTT
CTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGACAAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGG
CTCTGCACAACCACTACACGCAGAAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

配列番号：76

【試験1】

【0099】

PCSK9に結合するPCSK9抗体のELISA実験

ELISAプレートに固定されたPCSK9に結合する抗体の量を計測することにより、本発明の
抗PCSK9抗体のPCSK9タンパク質（WT PCSK9、配列番号：5）への結合能力を測定した。

ストレプトアビジン（Sigma, CAT # S4762）をPBSで2 μ g/mlに希釈し、4 で終夜96ウ
ェルのELISAプレートに添加した。プレートを洗浄し、次いでトリス緩衝液（0.9 mM CaCl₂、0.05% Tween 20及び5% スキムミルクを含む）を用いて37 で2時間ブロッキングした
。次にプレートを再度洗浄し、ビオチン標識PCSK9（自家調製、0.9 mM CaCl₂、0.05% Twee
n20及び1% スキムミルクを含有するトリス緩衝液で希釈）を100 μ l/ウェルで添加し、37
で1時間培養した。洗浄後、各種濃度に希釈されたPCSK9抗体の試料をプレートに添加し
、37 で1時間培養した。次いで、プレートを再度洗浄し、HRP-ヤギ抗ヒト（H+L）抗体（
Jackson, CAT # 109-035-088）を添加し、37 で1時間培養した。次いで、プレートを洗浄
し、現像のためにテトラメチルベンジジン溶液を添加した。最後に、停止緩衝液を添加
し、マイクロプレートリーダーでOD450値を計測し、EC50を計算した。

本発明によるヒト化及び親和性成熟PCSK9抗体のヒトPCSK9への結合能力を測定するた
めのELISA試験の結果を表12に示す。

【表 1 2】

本発明による PCSK9 抗体の PCSK9 への結合アッセイ

クローン番号	EC50 (μ g/ml)
h011-3050	0.00312
h011-3058	0.00369
h011-3065	0.00539
h011-3070	0.00511
h011-3073	0.00389
h011-3093	0.00381
h011-3095	0.00441
h011-3111	0.00498
h011-3118	0.00351
h011-3120	0.00538
h011-3121	0.00378
h011-3133	0.00435
h011-3147	0.00483
h011-3174	0.00529
h011-3181	0.00221
h011-3187	0.00450
h011-3190	0.00500
h011-3191	0.00631
h011-3192	0.00664
h011-3193	0.00470
h011-3194	0.00469
h011-3195	0.00679
h011-3	0.00719

10

20

30

本データでは、本発明によるヒト化抗体はPCSK9へ優れた結合活性を有することが示された。

40

【試験 2】

【0 1 0 0】

PCSK9-Yに結合するPCSK9抗体のELISA

ELISAプレートに固定されたPCSK9-Yに結合する抗体の量を計測することにより、本発明の抗PCSK9抗体のPCSK9-Yタンパク質（変異体PCSK9、配列番号：6）への結合能力を測定した。

ストレプトアビジン（Sigma, CAT # S4762）をPBSで2 μ g/mlに希釈し、4 で終夜96ウェルのELISAプレートに添加した。プレートを洗浄し、次いでトリス緩衝液（0.9 mM CaCl₂、0.05% Tween 20及び5% スキムミルクを含む）を用いて37 で2時間ブロッキングした。プレートを洗浄し、ビオチン標識PCSK9-Y（自家調製、0.9 mM CaCl₂、0.05% Tween20及

50

び1%スキムミルクを含有するトリス緩衝液で希釈)を100 μ l/ウェルで加え、37℃で1時間培養した。洗浄後、各種濃度に希釈されたPCSK9抗体の試料をプレートに添加し、37℃で1時間培養した。次いで、プレートを再度洗浄し、HRP-ヤギ抗ヒト(H+L)抗体(Jackson, CAT # 109-035-088)を添加し、37℃で1時間培養した。次いで、プレートを洗浄し、現像のためにテトラメチルベンジジン溶液を添加した。最後に、停止緩衝液を添加し、マイクロプレートリーダーでOD450値を計測し、EC50を計算した。

本発明によるヒト化及び親和性成熟PCSK9抗体のヒトPCSK9-Yへの結合能力を測定するためのELISA試験の結果を表13に示す。

【表 1 3】

本発明による PCSK9 抗体の PCSK9-Y への結合アッセイ

クローン番号	EC50 (μ g/ml)
h011-3050	0.00525
h011-3058	0.00606
h011-3065	0.01092
h011-3070	0.01444
h011-3073	0.01227
h011-3093	0.00989
h011-3095	0.01323
h011-3111	0.00681
h011-3118	0.00851
h011-3120	0.00711
h011-3121	0.00695
h011-3133	0.00492
h011-3147	0.00668
h011-3174	0.01123
h011-3181	0.00678
h011-3187	0.00704
h011-3190	0.00478
h011-3191	0.00660
h011-3192	0.12670
h011-3193	0.02210
h011-3194	0.01685
h011-3195	0.02178
h011-3	1.77950

本データでは、本発明によるヒト化抗体はPCSK9-Yへ優れた結合活性を有することが示された。

【試験 3】

【0 1 0 1】

抗PCSK9抗体はLDLR-FC/PCSK9-Yの結合を阻害する

抗体の存在下でLDLRに結合するPCSK9-Yの量を計測することにより、本発明によるPCSK9抗体のLDLR-FCとPCSK9-Y（変異体PCSK9、配列番号：6）との結合に対する阻害能力を測定した。

LDLR-FC（自家調製、配列番号：8の配列を有する）をリン酸塩緩衝液で2 $\mu\text{g/ml}$ に希釈し、4℃で終夜96ウェルのELISAプレートに添加した。プレートを洗浄し、次いで、37℃でトリス緩衝液（0.9 mM CaCl_2 、0.05% Tween 20及び5% スキムミルクを含有）で2時間ブロッキングした。次いで、プレートを洗浄し、ビオチン標識変異型PCSK9（0.9 mM CaCl_2 、0.05% Tween20及び1% スキムミルクを含有するトリス緩衝液で1 $\mu\text{g/ml}$ に希釈）及び抗体試料（0.9mMの CaCl_2 、0.05%のTween 20及び1%のスキムミルクを含有するトリス緩衝液で希釈）の混合物を100 μl /ウェルで添加し、37℃で1時間培養した。次いで、プレートを再度洗浄し、西洋ワサビペルオキシダーゼ-ストレプトアビジン（Sigma, CAT # S2438）を添加し、37℃で1時間培養した。次いで、プレートを洗浄し、現像のためにテトラメチルブレンジジン溶液を添加した。最後に、停止緩衝液を添加し、マイクロプレートリーダーでOD450値を計測し、次いでIC50値を計算した。

本発明によるヒト化及び親和性成熟抗体のLDLR-FC/PCSK9-Yの結合に対する阻害試験の結果を表14に示す。

【表 1 4】

PCSK9 抗体の PCSK9-Y と LDLR の結合に対する阻害試験

クローン番号	IC50 (μ g/ml)
h011-3050	0.123
h011-3058	0.162
h011-3065	0.312
h011-3070	0.228
h011-3073	0.129
h011-3093	0.287
h011-3095	0.391
h011-3111	0.226
h011-3118	0.230
h011-3120	0.213
h011-3121	0.174
h011-3133	0.175
h011-3147	0.173
h011-3174	0.230
h011-3181	0.233
h011-3187	0.156
h011-3190	0.222
h011-3191	0.226
h011-3192	2.360
h011-3193	0.871
h011-3194	0.579
h011-3195	0.689
h011-3	5.489

10

20

30

本データでは、本発明によるPCSK9抗体はPCSK9-YのLDLRへの結合を効果的に阻害できることが示された。

上記方法を用いてLDLR-FCの他のフォーマット（自家調製、配列番号：7または配列番号：9の配列を有する）とPCSK9（配列番号：5）との結合に対する本発明によるPCSK9抗体の阻害効果についても試験した。その結果、本発明によるPCSK9抗体はPCSK9の切断されたLDLRへの結合を効果的に阻害できることが示された。

40

【試験 4】

【0102】

抗PCSK9抗体はLDLR-FC/PCSK9の結合を阻害する

抗体の存在下でLDLRに結合するPCSK9の量を計測することにより、本発明によるPCSK9抗体のLDLR-FC（自家調製、配列番号：8の配列を有する）とPCSK9（配列番号：5）との結合に対する阻害能力について試験した。

LDLR-FCをリン酸塩緩衝液で5 μ g/mlに希釈し、4 で保温した96ウェルのELISAプレー

50

トに終夜添加した。プレートを洗浄し、次いでトリス緩衝液(0.9 mM CaCl_2 、0.05% Tween 20及び5% スキムミルクを含む)を用いて37℃で2時間ブロッキングした。次いで、プレートを洗浄し、ビオチン標識PCSK9(0.9 mM CaCl_2 、0.05% Tween20及び1% スキムミルクを含有するトリス緩衝液で2 $\mu\text{g/ml}$ に希釈)及び抗体試料(0.9 mMの CaCl_2 、0.05%のTween 20及び1%のスキムミルクを含有するトリス緩衝液で希釈)の混合物を100 μl /ウェルで加え、37℃で1時間培養した。次いで、プレートを再度洗浄し、西洋ワサビペルオキシダーゼ-ストレプトアビジン(Sigma, CAT # S2438)を添加し、37℃で1時間培養した。次いで、プレートを洗浄し、現像のためにテトラメチルブレンジジン溶液を添加した。最後に、停止緩衝液を添加し、マイクロプレートリーダーでOD450値を計測し、次いでIC50値を計算した。

本発明のヒト化及び親和性成熟抗体のLDLR-FC/PCSK9の結合に対する阻害試験の結果を表15に示す。

【表 15】

PCSK9 抗体の PCSK9 の LDLR への結合に対する阻害試験

クローン番号	IC50 ($\mu\text{g/ml}$)
h011-3050	0.598
h011-3058	0.542
h011-3065	0.730
h011-3070	0.629
h011-3073	0.604
h011-3093	0.706
h011-3095	0.582
h011-3111	1.224
h011-3118	1.042
h011-3120	0.911
h011-3121	0.662
h011-3133	0.495
h011-3147	0.567
h011-3174	1.671
h011-3181	0.857
h011-3187	0.666
h011-3190	0.837
h011-3191	0.740
h011-3192	0.698
h011-3193	0.621
h011-3194	0.628
h011-3195	2.252
h011-3	0.681

本データでは、本発明によるPCSK9抗体はPCSK9のLDLRへの結合を効果的に阻害できることが示された。

上記の方法を用いて他のLDLR-FCのフォーマット（自家調製、配列番号：7または配列番号：9の配列を有する）のPCSK9（配列番号：5）への結合に対する本発明によるPCSK9抗体の阻害効果についても試験した。その結果、本発明によるPCSK9抗体はPCSK9の切断されたLDLRフォーマットへの結合を効果的に阻害できることが示された。

【試験5】

【0103】

PCSK9抗体のLDL取込み

HepG2細胞（中国科学院細胞バンク、#CAT、TCHu72）をDMEM培地（Hyclone、#CAT SH302 43.01B）（10%FBS、Gibco、#CAT 10099-141を含有する）中で培養した。細胞がプレートの80～90%を覆う際に、細胞を吹き飛ばして温浸し、カウントした。 1.5×10^4 細胞/ウェルを96ウェルプレートに蒔いた。24時間後、培地をDMEM及びリポタンパク質を含まない10%血清（Millipore、CAT#LP4）と交換した。48時間後、プレートをPBS緩衝液で2回洗浄し、次いで4℃で1時間プレ培養した、PCSK9（配列番号：1、最終濃度10 $\mu\text{g/ml}$ ）と抗体試料（培地で各種濃度に希釈したもの）の混合物及び最終濃度10 $\mu\text{g/ml}$ のBODIPY-（登録商標）LDL（Invitrogen、CAT#L3483）を添加し、37℃で6時間培養した。その後、プレートをPBS緩衝液で2回洗浄した。マイクロプレートリーダー（EX485 nm/EM535 nm）で蛍光値を読み取り、次いでCellTiter-Glo（登録商標）細胞活性発光検出試薬（Promega、G7571）を50 μl /ウェルで添加し、化学発光値を読み取った。LDL取込みの結果を図1及び2に示したが、これには本発明によるPCSK9抗体はHepG2細胞によるLDL取込みを促進できることが示された。

【試験6】

【0104】

PCSK9抗体親和性のためのBIAcoreアッセイ

ヒトFab捕捉キット（CAT#28-9583-25、GE）の取扱い説明書に記載の方法に従って、ヒトFab捕捉分子をCM5パイオチップ（CAT#BR-1000-12、GE）に共有結合させ、これにより本発明のPCSK9抗体が親和性捕捉された。次いで、ヒトPCSK9抗原（Hisタグを有するPCSK9：PCSK9-His6、配列番号：1）をパイオチップの表面に流し、Biacore装置を用いて反応シグナルをリアルタイムで検出し、関連曲線及び解離曲線を得た。最後に、フィッティングし、以下の表16に示されている親和性の値を得た。解離の各サイクルが終了した後、パイオチップを洗浄し、ヒトFab捕捉キット（GE）において再生溶液で再生した。

【表16】

PCSK9モノクローナル抗体の親和性

静止期	移動相	親和性(M)
h011-3133-WT	huPCSK9	$< 5.26\text{E-}11$
h011-3133-YTE		$< 5.18\text{E-}11$

本結果では、本発明のPCSK9抗体はヒトPCSK9抗原に対して強い親和性を有することが実証された。

同じ方法を用いてPCSK9-Y（配列番号：4）に対するPCSK9抗体の親和性を測定した。その結果、本発明のPCSK9抗体はPCSK9-Y抗原に対して強い親和性を有することが実証された。

【試験7】

【0105】

薬力学試験：PCSK9抗体はin vivoでLDL-cを減少させた

PCSK9過剰発現マウスモデルを構築し、マウスに尾静脈を介してPCSK9抗体を注射した。本発明によるPCSK9抗体のPCSK9過剰発現マウスにおけるin vivoでのLDL-cレベルを低下させる効果を評価した。ブランク対照として、ヒトIgG（混合正常ヒト血清から、従来のア

フィニティークロマトグラフィーにより精製したヒト免疫グロブリン。例えば、プロテインA等)を使用した。

C57Bl/6マウス(Shanghai Sippr-BK Laboratory Animal Co., Ltd.から購入)を実験室環境で5日間順応させ、 4×10^{11} v.g.のAAV-PCSK9ウイルス(Benyuan Zhengyang Gene Technology Co., Ltd.)を尾静脈より投与した。ウイルス注射の10日後、マウスを終夜絶食させた。その後、眼瞼から血液を採取し、HDL及びLDL/VLDLコレステロール定量キット(Bio Visionから購入、CAT#K613-100)でLDL-cを測定した。LDL-c濃度に応じてマウスを無作為に群分け(6匹/群($n = 6$))、尾静脈注射により抗体を投与した。自家調製のヒトIgG及びPCSK9抗体を10 mg/kgの用量で投与した(ヒトIgG及びPCSK9抗体はいずれもPBS中に1 mg/mlの濃度で調製した)。採血前にマウスを終夜絶食させた。投与24時間後、48時間後及び72時間後に眼瞼から採血し、37℃で1時間保温し、3500 rpmで10分間遠心分離し、血清を-80℃で保存した。

10

最後の血清を集めた後、同じ日に全ての凍結血清についてを試験した。HDL及びLDL/VLDLコレステロール定量キットを用い、取扱説明書に従って血清におけるLDL-c濃度を測定した。

討論：

1. 薬力学試験：h011-3133群のPCSK9抗体はin vivoでLDL-cレベルを低下させた。

AAV8-PCSK9ウイルス注射の10日後に、血清におけるLDL-cの平均濃度は53 mg/dlであった。各群に抗体を投与した24時間後に、h011-3133-WT、h011-3133-YTE、h011-3191、h011-3065のPCSK9抗体群のLDL-c濃度は、IgG群と比べてそれぞれ62%、40%、56%及び56%低下した。投用量10 mg/kgの各抗体投与群では血清中のLDL-c濃度が有意に低下し、各抗体投与群の間には有意差はなかった。抗体投与の48時間後に、h011-3133-WT群のLDL-c濃度はIgG群と比べて18%減少し、IgG群との有意差はなかった。他の群はIgG群に匹敵した。抗体投与の72時間後に、各群におけるLDL-c濃度は、IgG群のそれに匹敵した。その結果を図3、表17及び図5に示す。各試料の投与後の異なる時点における血清中LDL-cの絶対値を図3に示す。IgG群における値を100%対照として用い、同じ時点でのIgG投与群に対する抗体投与群の血清中LDL-c含有量の百分率を図5に示した。

20

図4において、正常マウスの血清におけるLDL-cの濃度は約6 mg/dlである。AAV8-PCSK9ウイルスを注射した34日後に、血清におけるLDL-cの平均濃度は33 mg/dlであった。マウスを群分けし、直ちに投与した。投与24時間後に、h011-3058、h011-3191、h011-3147群のLDL-c濃度は、IgG群と比べてそれぞれ49%、40%及び29%減少した。投用量10 mg/kgで、h011-3058、h011-3191、h011-3147群では血清中のLDL-c濃度は有意に低下し、抗体投与群の間には有意差はなかった。投与48時間後に、h011-3058、h011-3191、h011-3147群のLDL-c濃度はIgG群と比べてそれぞれ12%、11%及び9%減少し、IgG群との有意差はなかった。投与72時間後に、各群におけるLDL-c濃度はIgG群のそれに匹敵した。その結果を図4、表18及び図6に示す。各試料の投与後の異なる時点における血清中LDL-cの絶対値を図4に示す。IgG群における値を100%対照として用い、同じ時点でのIgG投与群に対する抗体投与群の血清中LDL-c含有量の百分率を図6に示した。

30

まとめとして、本実験においてh011-3133-WT、h011-3133-YTE、h011-3191、h011-3065、h011-3058及びh011-3147はいずれもヒトPCSK9過剰発現マウスの血清におけるLDL-cの濃度を低下させることができた。

40

【表 17】

マウス血清における LDL-c 濃度の変化

LDL-c (mg/dl)					%IgG			
Unit (10 mg/kg)	0 h	24 h	48 h	72 h	0 h	24 h	48 h	72 h
IgG	52.4±2 .47	65.4±2 .66	58.3±3 .71	55.7±4 .51	100	100	100	100
h011-3133-WT	52.8±2 .12	24.6±1 .09	47.7±8 .38	55.0±6 .35	101	38	82	99
h011-3133-YTE	52.9±2 .08	39.0±4 .40	68.5±4 .85	59.4±3 .36	101	60	118	107
h011-3191	52.9±2 .15	28.7±4 .04	72.2±7 .39	73.2±2 .66	101	44	124	131
h011-3065	54.3±6 .30	28.6±3 .78	53.4±4 .09	54.1±5 .21	104	44	92	97

10

【表 18】

マウス血清における LDL-c 濃度の変化

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

20

30

【試験 8】

【0106】

競合実験

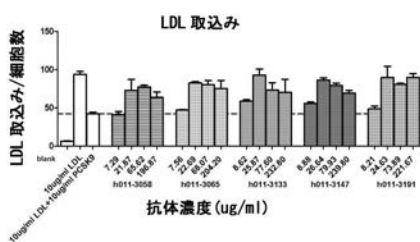
競合ELISA実験では、プレートを一つの抗体で終夜コーティングした。次いで、ビオチン-PCSK9-his及びコーティング抗体より50倍高濃度の競合抗体を添加した。コーティング抗体は競合抗体と競合して抗原に結合することになる。次いで、プレートにおける抗原シグナルを測定した。その結果、h011-3133-YTE及び21B12 (US8030457B2) は競合して抗原と結合できるが、2つの抗体の間には競合結合は明らかではないことが示された。これにより、2つの抗体の抗原エピトープは異なることが示唆された。

40

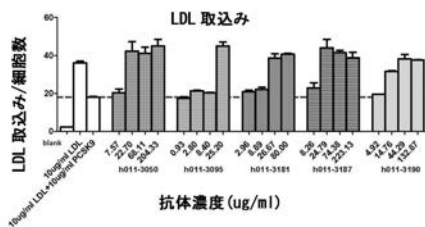
IR (%)	h011-3133-YTE	21B12
h011-3133-YTE	96.17	-0.28
21B12	3.01	97.78

明確化のため図面及び実施例を用いて本発明を詳細に説明したが、これらの説明及び実施例は本発明の範囲を限定するものと解釈されるべきではない。ここで引用される全ての特許及び科学文献の開示は、それらの全体が参照により組み込まれる。

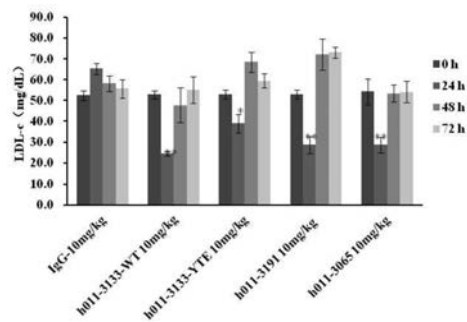
【 図 1 】



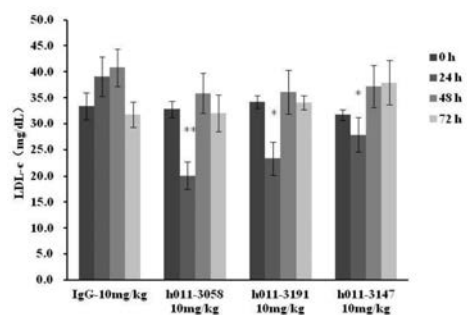
【 圖 2 】



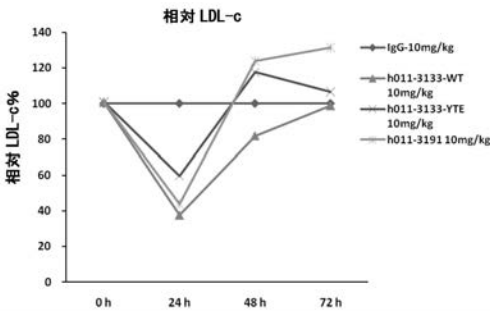
【 図 3 】



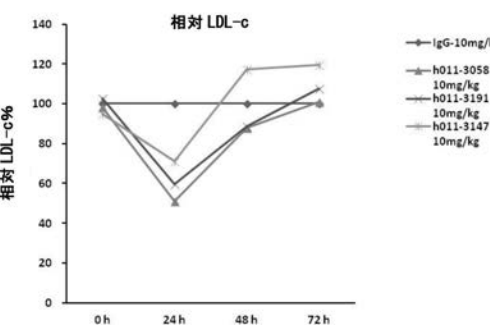
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



【 配 列 表 】

2019509714000001.app

【 国际調查報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2016/112075
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C07K 16/40 (2006.01) i; C07K 16/46 (2006.01) i; C12N 15/13 (2006.01) i; A61K 39/395 (2006.01) i; A61P 3/10 (2006.01) i; A61P 9/00 (2006.01) i; A61P 9/10 (2006.01) i; A61P 25/28 (2006.01) i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K, C12N, A61K, A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNMED; CPRSABS; CNABS; TWMED; DWPI; HKABS; TWABS; CNTXT; EPTXT; WOTXT; JPTXT; NCBI; CNKI; National Bio-Sequence Database of Chinese Patent; Genbank; EMBL; ISI Web of Knowledge; PCSK9, PCSK9 antibody, high-cholesterol, low density lipoprotein, pcsk9, antibody, proprotein convertases, LDLR, autosomal dominant hypercholesterolemia, SEQ ID NOs: 1-70		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 102844332 A (RINAT NEUROSCIENCE CORP.; PFIZER INC.), 26 December 2012 (26.12.2012), the whole document	1-28
A	WO 2015128287 A1 (AFFIRIS AG), 03 September 2015 (03.09.2015), the whole document	1-28
A	XIAO, Wenhui et al., "Structure and Function of PCSK9", CHINESE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, vol.25, no.3, 31 March 2009 (31.03.2009), pages 213-218	1-28
A	CHENG, Yanli et al., "pcsk9 Gene Mutation and Cholesterolemia", CHINESE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, vol.23, no.3, 31 March 2007 (31.03.2007), pages 172-176	1-28
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 21 March 2017 (21.03.2017)		Date of mailing of the international search report 29 March 2017 (29.03.2017)
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451		Authorized officer LI, Lan Telephone No.: (86-10) 62088404

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2016/112075**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:
- a. (means)
- ☐ on paper
- ☒ in electronic form
- b. (time)
- ☒ in the international application as filed
- ☐ together with the international application in electronic form
- ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2016/112075

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

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2016/112075

A. 主题的分类

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

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C07K, C12N, A61K, A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNMED; CPRSABS; CNABS; TWMED; DWPI; HKABS; TWABS; CNTXT; EPTXT; WOTXT; JPTXT; NCBI; CNKI; 中国专利生物序列检索系统; Genbank; EMBL; ISI Web of Knowledge; PCSK9, PCSK9抗体, 前蛋白转化酶, 高胆固醇, 低密度脂蛋白, pcsk9, antibody, proprotein convertases, LDLR, autosomal dominant hypercholesterolemia, SEQ ID NOs:1-70

C. 相关文件

类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 102844332 A (瑞纳神经科学公司 辉瑞大药厂) 2012年 12月 26日 (2012 - 12 - 26) 全文	1-28
A	WO 2015128287 A1 (AFFIRIS AG) 2015年 9月 3日 (2015 - 09 - 03) 全文	1-28
A	肖文虎 等. "PCSK9结构与功能" 中国生物化学与分子生物学报, 第25卷, 第3期, 2009年 3月 31日 (2009 - 03 - 31), 第213-218页	1-28
A	程艳丽 等. "pcsk9基因突变与胆固醇血症" 中国生物化学与分子生物学报, 第23卷, 第3期, 2007年 3月 31日 (2007 - 03 - 31), 第172-176页	1-28

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2017年 3月 21日

国际检索报告邮寄日期

2017年 3月 29日

ISA/CN的名称和邮寄地址

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

授权官员

李岚

传真号 (86-10) 62019451

电话号码 (86-10) 62088404

表 PCT/ISA/210 (第2页) (2009年7月)

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2016/112075

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1. c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何对要求保护的发明必要的核苷酸和/或氨基酸序列，国际检索是在下列基础上进行的：
- a. (提交提供)
- ☐ 纸件形式
- ☒ 电子形式
- b. (提交时间)
- ☒ 含在申请提交时的国际申请中
- ☐ 以电子形式与国际申请一起提交
- ☐ 为检索之用随后提交本单位
2. ☐ 另外，在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下，提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的申请中的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围（如适用）的所需声明。
3. 补充意见：

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2016/112075

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

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)

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 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 P 3/06 (2006.01)	A 6 1 P 3/06	
A 6 1 P 3/00 (2006.01)	A 6 1 P 3/00	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,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,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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . U N I X

2 . T W E E N

(71)出願人 508209602

シャanghai ヘンルイ ファーマスーティカル カンパニー リミテッド

SHANGHAI HENGRUI PHARMACEUTICAL CO., LTD.

中華人民共和国 シャanghai, ミンシン・ディストリクト, ウェンジン・ロード No. 279

(74)代理人 100153394

弁理士 謝 卓峰

(74)代理人 100145056

弁理士 當別當 健司

(74)代理人 100116311

弁理士 元山 忠行

(72)発明者 チュ、シアンドン

中華人民共和国 200245 シャanghai ミンハン・ディストリクト ウェンジン・ロード No. 279

(72)発明者 イエ、シン

中華人民共和国 200245 シャanghai ミンハン・ディストリクト ウェンジン・ロード No. 279

(72)発明者 ジン、ホウホン

中華人民共和国 200245 シャanghai ミンハン・ディストリクト ウェンジン・ロード No. 279

(72)発明者 ツエイ、ドンピン

中華人民共和国 200245 シャanghai ミンハン・ディストリクト ウェンジン・ロード No. 279

(72)発明者 フ、チーユエ

中華人民共和国 200245 シャンハイ ミンハン・ディストリクト ウェンジン・ロード
No. 279

(72)発明者 タオ、ウェイカン

中華人民共和国 200245 シャンハイ ミンハン・ディストリクト ウェンジン・ロード
No. 279

(72)発明者 ジャン、リエンシャン

中華人民共和国 200245 シャンハイ ミンハン・ディストリクト ウェンジン・ロード
No. 279

(72)発明者 スン、ピアオヤン

中華人民共和国 222047 ジェンス リエンユンガン エコノミック・アンド・テクノロジー
カル・ディベロップメント・ゾーン クンルンシャン ロード No. 7

F ターム(参考) 4B064 AG27 CA10 CA19 CE12 DA01 DA13

4B065 AA90X AB01 AC14 BA02 CA25 CA44 CA46

4C085 AA14 AA15 AA16 BB36 CC23 EE01

4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 DA76 EA27 EA50 FA74 GA26