

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2018 年 12 月 20 日 (20.12.2018)



(10) 国际公布号
WO 2018/228406 A1

(51) 国际专利分类号:
C07K 16/40 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
C12N 9/64 (2006.01) *A61P 3/06* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2018/090972

(22) 国际申请日: 2018 年 6 月 13 日 (13.06.2018)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201710447005.2 2017年6月14日 (14.06.2017) CN

(71) 申请人: 江苏恒瑞医药股份有限公司 (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD.) [CN/CN]; 中国江苏省连云港市经济技术开发区昆仑山路7号, Jiangsu 222047 (CN)。上海恒瑞医药有限公司 (SHANGHAI HENGRUI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [CN/CN]; 中国上海市闵行区文井路279号, Shanghai 200245 (CN)。

(72) 发明人: 叶鑫 (YE, Xin); 中国上海市闵行区文井路279号, Shanghai 200245 (CN)。孙乐 (SUN, Le); 中国上海市闵行区文井路279号, Shanghai 200245 (CN)。胡齐悦 (HU, Qiyue); 中国上海市闵行区文井路279号, Shanghai 200245 (CN)。陶维康 (TAO, Weikang); 中国上海市闵行区文井路279号, Shanghai 200245 (CN)。张连山 (ZHANG, Lianshan); 中国上海市闵行区文井路279号, Shanghai 200245 (CN)。

(74) 代理人: 北京戈程知识产权代理有限公司 (GE CHENG & CO., LTD.); 中国北京市东城区东长安街1号东方广场东三办公楼19层, Beijing 100738 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, 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,

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

(54) 发明名称: PCSK9抗体、其抗原结合片段及其医药用途

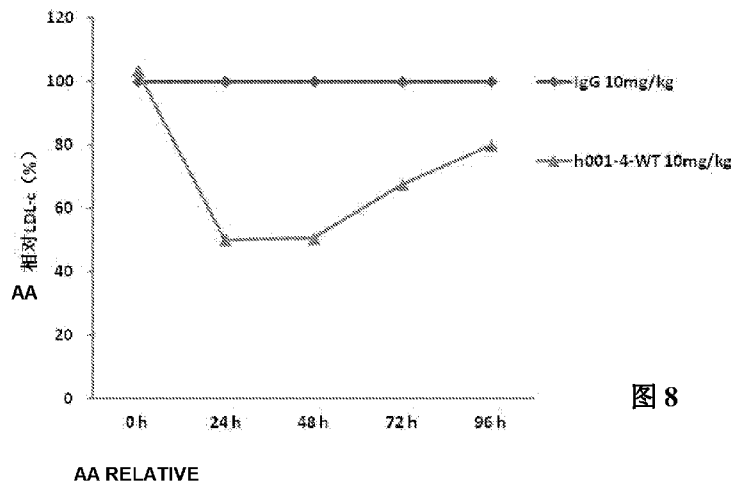


图 8

(57) Abstract: The present invention relates to PCSK9 antibody, an antigen-binding fragment and the medical use thereof. Furthermore, the present invention relates to a chimeric antibody and humanized antibody comprising the CDR region of the PCSK9 antibody, and a pharmaceutical composition comprising the PCSK9 antibody and an antigen-binding fragment thereof, and the use of the same as a hypolipidemic drug. In particular, the present invention relates to the use of a humanized PCSK9 antibody in the preparation of a drug for treating PCSK9-mediated diseases or conditions.

(57) 摘要: 本发明涉及 PCSK9 抗体、其抗原结合片段及其医药用途。进一步地, 本发明涉及包含所述 PCSK9 抗体 CDR 区的嵌合抗体、人源化抗体, 以及包含 PCSK9 抗体及其抗原结合片段的药物组合物, 以及其作为降血脂药物的用途。特别地, 本发明涉及一种人源化的 PCSK9 抗体在制备用于治疗 PCSK9 介导的疾病或病症的药物中的用途。

JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

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

PCSK9 抗体、其抗原结合片段及其医药用途

技术领域

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

背景技术

- 10 高胆固醇血症是一种以血清胆固醇水平升高为主要特征的脂类代谢异常疾病，其主要表现为血清胆固醇水平升高，导致胆固醇在血管聚集，形成动脉粥样硬化。大量的临床及实验研究结果都证实，脂质代谢异常和冠心病的发生、发展有着密切的关系。因此，降低血液中的胆固醇浓度成了目前治疗和预防动脉粥样硬化的一个主要手段。
- 15 目前，临床上调节脂类代谢的药物主要以他汀类为主。立普妥（Lipitor）作为全世界应用最广泛的降胆固醇药物，也是医药史上最畅销药物，通过阻断肝脏生产胆固醇的酶作用，减少胆固醇的产生，增加肝脏从血液中摄取更多的胆固醇，进而减低血液中胆固醇浓度。但是立普妥也有其不足之处，首先，立普妥可以降低 30%-40% 的低密度脂蛋白，但仍然有很多病人的血脂无法降低到有效的浓度
- 20 (低密度脂蛋白浓度<50mg/dL)；其次病人对立普妥的响应率也有人种差异。因此，很多病人需要一个更为有效的降低血脂的药物。

- 家族性高胆固醇血症(Familial hypercholesterolemia, FM)是一种常染色体单基因显性遗传性疾病，其临床特征为血总胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein-cholesterol, LDL-c)显著升高、睑黄瘤、角膜弓以及早发的心血管疾病。低密度脂蛋白受体(LDL receptor, LDLR)基因突变致其缺陷或缺乏，LDL-c 不能顺利转运到肝脏清除，以致血中 LDL-c 水平升高。目前已明确 3 种基因与 FM 的发生有关，它们分别是 LDLR 基因、载脂蛋白 B100 基因和 PCSK9 (proprotein convertase subtilisin/kexin type 9)基因。
- 25

- 前蛋白转化酶枯草溶菌素 9 (proprotein convertase subtilisin/kexin type 9, PCSK9)是一种前蛋白转化酶，属于分泌的枯草杆菌酶家族的蛋白酶 K 亚族。该编码蛋白是作为可溶性酶原合成，在内质网中经过自身催化分子内加工成为有活性的 PCSK9。研究表明，PCSK9 可促进 LDL 受体的降解从而增加血浆中 LDL 胆固醇含量，而 LDL 受体介导肝内的 LDL 胞吞过程，后者是从循环系统清除 LDL 的主要途径。有研究发现，12.5% 的高胆固醇血症(ADH)患者检测有 PCSK9
- 30 基因突变。PCSK9 突变形式多样，根据突变对 PCSK9 调节 LDL-C 水平的不同
- 35

影响可分为两类：功能缺失型和功能获得型。其中功能缺失型突变与低血胆固醇水平有关，有预防冠状动脉粥样硬化性心脏病发生的作用，非洲人群中低胆固醇的 PCSK9 突变率高于其他种族。PCSK9 功能获得型突变体通过增加 PCSK9 的功能、降低 LDLR 的表达而升高血浆胆固醇水平，可以导致严重高胆固醇血症和早发冠状动脉粥样硬化性心脏病。目前发现的 PCSK9 功能获得型突变包括：D374Y、S127R、F216L、N157K、R306S 等。其中，与 PCSK9 野生型相比，D374Y 突变体细胞表面的 LDLR 减少了 36%，S127R 突变有相应减少了 10%。

抗体药物的稳定性是影响抗体成药性的关键因素之一，作为一种基因重组表达的产物，抗体药物在其生产、运输、存储及体内使用的过程中会发生多种物理和化学降解，如二硫键错配、氧化、脱酰胺化、异构化等。从而引起抗体表面电荷基团的改变，间接导致抗体结构转变，最终影响抗体物理化学性质和体内生物学功能。其中，异构化和脱酰胺是抗体分子常见的两种化学降解途径，对抗体的稳定性、生物学功能和生物利用度造成严重影响 (Electrophoresis. 2010 Jun;31(11):1764-72.)。

抗体中天冬氨酸 (Asp) 位点易发生非酶促的翻译后修饰，该修饰使 Asp 经过一个环化的亚酰胺的过程，最终形成异构化的 Asp。目前，Asp 异构化作为常见的蛋白降解途径已经在多种抗体中发现。有文献报道，抗体 CDR 区的 Asp 异构化可显著降低抗体的亲和力和化学稳定性，并最终影响抗体在疾病治疗中的应用潜能。(Biotechnol Bioeng. 2010 Feb 15; 105(3): 515-523; MAbs. 2014 Mar-Apr; 6(2):327-39.)。因此，有目的降低抗体 CDR 区特定位点的 Asp 异构化或突变 Asp 位点，有望成为提高抗体稳定性和功能的手段之一。

目前 PCSK9 作为一个极具潜力的新的靶标已成为高胆固醇血症研究的热点，对于深入了解胆固醇代谢的机制和寻求新的治疗手段有重要意义。有多家跨国制药公司在研发针对 PCSK9 的单克隆抗体，相关的专利有 WO2011111007、WO2011072263、WO2012101251、WO2012088313、WO2013039958、WO2013016648、WO2013008185 等。

本发明提供有着更高亲和力、更高选择性、更高生物活性和化学稳定性的 PCSK9 抗体。

发明内容

本发明提供一种特异性结合 PCSK9 的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段，所述 PCSK9 抗体或其抗原结合片段包含以下 CDR 区：

- i) HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 的序列分别如 SEQ ID NO: 12、13 和 31 所示；
- ii) LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 的序列分别如 SEQ ID NO: 15、16 和 17 所示。

在本发明一个优选的实施方案中，SEQ ID NO: 31 所示的 HCDR3 序列为

QYDYX¹EX²WYFDV, 其中: X¹可选自 D、E、H、M、N 或 Q; X²可选自 D、E、H、M、N 或 Q; 但 X¹与 X²不能同时为 D。

在本发明另一个优选的实施方案中, HCDR3 的序列选自 SEQ ID NO: 38-47 中的任一个所示的序列。

5 在本发明另一个优选的实施方案中, 其中所述的所述 PCSK9 抗体或其抗原结合片段包含包含以下 CDR 区:

a) HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 的序列分别如 SEQ ID NO: 12、13 和 38 所示,

LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 的序列分别如 SEQ ID NO: 15、16 和 17 所示;

b) HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 的序列分别如 SEQ ID NO: 12、13 和 39 所示,

10 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 的序列分别如 SEQ ID NO: 15、16 和 17 所示;

c) HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 的序列分别如 SEQ ID NO: 12、13 和 40 所示,

LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 的序列分别如 SEQ ID NO: 15、16 和 17 所示;

d) HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 的序列分别如 SEQ ID NO: 12、13 和 41 所示,

LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 的序列分别如 SEQ ID NO: 15、16 和 17 所示;

15 e) HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 的序列分别如 SEQ ID NO: 12、13 和 42 所示,

LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 的序列分别如 SEQ ID NO: 15、16 和 17 所示;

f) HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 的序列分别如 SEQ ID NO: 12、13 和 43 所示,

LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 的序列分别如 SEQ ID NO: 15、16 和 17 所示;

g) HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 的序列分别如 SEQ ID NO: 12、13 和 44 所示,

20 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 的序列分别如 SEQ ID NO: 15、16 和 17 所示;

h) HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 的序列分别如 SEQ ID NO: 12、13 和 45 所示,

LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 的序列分别如 SEQ ID NO: 15、16 和 17 所示;

i) HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 的序列分别如 SEQ ID NO: 12、13 和 46 所示,

LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 的序列分别如 SEQ ID NO: 15、16 和 17 所示;

25 或

g) HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 的序列分别如 SEQ ID NO: 12、13 和 47 所示,

LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 的序列分别如 SEQ ID NO: 15、16 和 17 所示。

在本发明另一个优选的实施方案中, 所述的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段为鼠源抗体、嵌合抗体或人源化抗体或鼠源抗体、嵌合抗体或人源化抗体的抗原结合片段。

30 在本发明另一个优选的实施方案中, 所述 PCSK9 抗体的轻链可变区进一步包含鼠源 κ 链或鼠源 κ 链变体的轻链 FR 区; 其中所述 PCSK9 抗体的重链可变区进一步包含鼠源 IgG1 或鼠源 IgG1 变体的重链 FR 区。

在本发明另一个优选的实施方案中, 所述 PCSK9 抗体的轻链进一步包含鼠源 κ 链或鼠源 κ 链变体的轻链恒定区; 其中所述 PCSK9 抗体的重链进一步包

含鼠源 IgG1 或鼠源 IgG1 变体的重链恒定区。

在本发明另一个优选的实施方案中,所述的人源化抗体的重链可变区上的重链 FR 区序列来源于人种系重链 IGHV1-2*02 和 hjh2 的组合序列或其突变序列;所述重链 FR 区序列包含人种系重链 IGHV1-2*02 的 FR1、FR2、FR3 区序列和
5 hjh2 的 FR4 区序列或人种系重链 IGHV1-2*02 的 FR1、FR2、FR3 区序列和 hjh2 的 FR4 区序列的突变序列。

在本发明另一个优选的实施方案中,所述的人源化抗体含有 SEQ ID NO: 32 所示的重链可变区;或 SEQ ID NO: 32 所示的重链可变区的变体;其中所述 SEQ ID NO: 32 所示的重链可变区的变体是在 SEQ ID NO: 32 所示的重链可变区上具有 1-10 个氨基酸的插入、缺失或替换的变体。所述的氨基酸的插入、缺失或替
10 换可以用现有技术,为提高抗体如亲和性、半衰期等性能做的改进,如用亲和力成熟修改 CDR 区的氨基酸,或者用回复突变修改 FR 区的氨基酸。

在本发明另一个优选的实施方案中,所述的人源化抗体的重链 FR 区序列有 0-10 个氨基酸的回复突变,优选为一个或多个选自 T30N、R87T、R72A、T74K、
15 M48I、V68A、M70L、R38K 和 R67K 的氨基酸回复突变。

在本发明另一个优选的实施方案中,所述人源化抗体包含选自 SEQ ID NO: 32-37 中的任一个序列所示的重链可变区。

在本发明另一个优选的实施方案中,所述的人源化抗体的轻链可变区上的轻链 FR 区序列来源于人种系轻链 IGKV1-39*01 和 hjk2.1 的组合序列及其突变序列;所述轻链 FR 区序列包含人种系轻链 IGKV1-39*01 的 FR1、FR2、FR3 区序列和
20 hjk2.1 的 FR4 区序列或人种系轻链 IGKV1-39*01 的 FR1、FR2、FR3 区序列和 hjk2.1 的 FR4 区序列的突变序列。

在本发明另一个优选的实施方案中,所述人源化抗体进一步包含 SEQ ID NO: 24-27 中的任一个序列所示的轻链可变区。

在本发明另一个优选的实施方案中,所述人源化抗体包含重链可变区序列和/或轻链可变区序列,所述重链可变区序列选自 SEQ ID NO: 32-37 所示的任一个序列;所述轻链可变区序列选自 SEQ ID NO: 24-27 所示的任一个序列。

在本发明另一个优选的实施方案中,所述的 PCSK9 抗体包含选自 SEQ ID NO: 32-37 中的任一个序列所示重链可变区和 SEQ ID NO: 24-27 中的任一个序列
30 所示的轻链可变区。

在本发明另一个优选的实施方案中,所述 PCSK9 抗体包含选自 SEQ ID NO: 48-57 中的任一个序列所示的重链可变区和 SEQ ID NO: 24-27 中的任一个序列所示的轻链可变区。

在本发明另一个优选的实施方案中,所述 PCSK9 抗体包含:

35 1) SEQ ID: 48 所示的重链可变区和 SEQ ID: 24 所示的轻链可变区;

- 2) SEQ ID: 48 所示的重链可变区和 SEQ ID: 25 所示的轻链可变区;
3) SEQ ID: 48 所示的重链可变区和 SEQ ID: 26 所示的轻链可变区;
4) SEQ ID: 48 所示的重链可变区和 SEQ ID: 27 所示的轻链可变区;
5) SEQ ID: 49 所示的重链可变区和 SEQ ID: 24 所示的轻链可变区;
5 6) SEQ ID: 49 所示的重链可变区和 SEQ ID: 25 所示的轻链可变区;
7) SEQ ID: 49 所示的重链可变区和 SEQ ID: 26 所示的轻链可变区;
8) SEQ ID: 49 所示的重链可变区和 SEQ ID: 27 所示的轻链可变区;
9) SEQ ID: 50 所示的重链可变区和 SEQ ID: 24 所示的轻链可变区;
10) SEQ ID: 50 所示的重链可变区和 SEQ ID: 25 所示的轻链可变区;
10 11) SEQ ID: 50 所示的重链可变区和 SEQ ID: 26 所示的轻链可变区;
12) SEQ ID: 50 所示的重链可变区和 SEQ ID: 27 所示的轻链可变区;
13) SEQ ID: 51 所示的重链可变区和 SEQ ID: 24 所示的轻链可变区;
14) SEQ ID: 51 所示的重链可变区和 SEQ ID: 25 所示的轻链可变区;
15) SEQ ID: 51 所示的重链可变区和 SEQ ID: 26 所示的轻链可变区;
15 16) SEQ ID: 51 所示的重链可变区和 SEQ ID: 27 所示的轻链可变区;
17) SEQ ID: 52 所示的重链可变区和 SEQ ID: 24 所示的轻链可变区;
18) SEQ ID: 52 所示的重链可变区和 SEQ ID: 25 所示的轻链可变区;
19) SEQ ID: 52 所示的重链可变区和 SEQ ID: 26 所示的轻链可变区;
20) SEQ ID: 52 所示的重链可变区和 SEQ ID: 27 所示的轻链可变区;
20 21) SEQ ID: 53 所示的重链可变区和 SEQ ID: 24 所示的轻链可变区;
22) SEQ ID: 53 所示的重链可变区和 SEQ ID: 25 所示的轻链可变区;
23) SEQ ID: 53 所示的重链可变区和 SEQ ID: 26 所示的轻链可变区;
24) SEQ ID: 53 所示的重链可变区和 SEQ ID: 27 所示的轻链可变区;
25) SEQ ID: 54 所示的重链可变区和 SEQ ID: 24 所示的轻链可变区;
25 26) SEQ ID: 54 所示的重链可变区和 SEQ ID: 25 所示的轻链可变区;
27) SEQ ID: 54 所示的重链可变区和 SEQ ID: 26 所示的轻链可变区;
28) SEQ ID: 54 所示的重链可变区和 SEQ ID: 27 所示的轻链可变区;
29) SEQ ID: 55 所示的重链可变区和 SEQ ID: 24 所示的轻链可变区;
30) SEQ ID: 55 所示的重链可变区和 SEQ ID: 25 所示的轻链可变区;
30 31) SEQ ID: 55 所示的重链可变区和 SEQ ID: 26 所示的轻链可变区;
32) SEQ ID: 55 所示的重链可变区和 SEQ ID: 27 所示的轻链可变区;
33) SEQ ID: 56 所示的重链可变区和 SEQ ID: 24 所示的轻链可变区;
34) SEQ ID: 56 所示的重链可变区和 SEQ ID: 25 所示的轻链可变区;
35) SEQ ID: 56 所示的重链可变区和 SEQ ID: 26 所示的轻链可变区;
35 36) SEQ ID: 56 所示的重链可变区和 SEQ ID: 27 所示的轻链可变区;

- 37) SEQ ID: 57 所示的重链可变区和 SEQ ID: 24 所示的轻链可变区;
- 38) SEQ ID: 57 所示的重链可变区和 SEQ ID: 25 所示的轻链可变区;
- 39) SEQ ID: 57 所示的重链可变区和 SEQ ID: 26 所示的轻链可变区; 和
- 40) SEQ ID: 57 所示的重链可变区和 SEQ ID: 27 所示的轻链可变区。

5 在本发明另一个优选的实施方案中, 所述 PCSK9 抗体的重链进一步包含人源 IgG1 或其变体的重链恒定区; 优选氨基酸突变延长抗体在血清中的半衰期的人源 IgG1 变体的重链恒定区, 更优选包含引入 YTE 突变的人源 IgG1 变体的重链恒定区。其中所述 PCSK9 抗体的轻链进一步包含人源 κ 其变体的轻链恒定区。

10 在本发明另一个优选的实施方案中, 所述人源化抗体包含 SEQ ID NO: 28 或 SEQ ID NO: 29 所示的重链恒定区和 SEQ ID NO: 30 所示轻链恒定区。

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

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

本发明进一步提供一种如上所述的 DNA 分子的表达载体。

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

20 本发明进一步提供一种用于生产如上所述的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段的方法, 所述方法包括将如前述项所述的宿主细胞在培养物中进行培养以形成并积累如上所述的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段, 以及从培养物回收所积累的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段。

25 本发明进一步提供一种用于免疫检测或测定人 PCSK9 的方法, 所述方法包括在适合与人 PCSK9 特异性结合的条件下, 使用如上所述的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段特异性结合人 PCSK9 的步骤。

本发明进一步提供一种用于检测或测定人 PCSK9 的试剂, 所述试剂包含如上所述的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段。

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

35 本发明进一步提供一种上述的特异性结合 PCSK9 的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段、或上述的药物组合物治疗 PCSK9 介导的疾病或病症的方法, 所述方法

包括向个体施用有效量的特异性结合 PCSK9 的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段。其中所述的疾病或病症优选为胆固醇相关疾病；更优选为高胆固醇血症、心脏病、代谢综合征、糖尿病、冠状动脉心脏病、卒中、心血管疾病、阿尔茨海默病和一般性的异常脂血症；最优选高胆固醇血症、异常脂血症、动脉粥样硬化、CVD 或冠状动脉心脏病。

本发明进一步提供一种如上所述的特异性结合 PCSK9 的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段或如上所述的药物组合物在制备用于诊断 PCSK9 介导的疾病或病症的试剂中的用途。

可以使用本发明的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段诊断的示例性疾病包括胆固醇相关疾病(其包括“血清胆固醇相关疾病”),其包括以下的任何一种或多种:高胆固醇血症、心脏病、代谢综合征、糖尿病、冠状动脉心脏病、卒中、心血管疾病、阿尔茨海默病和一般性的异常脂血症(其显示为例如提高的总血清胆固醇、提高的 LDL、提高的甘油三酯、提高的极低密度脂蛋白(VLDL)和/或低的 HDL)。

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

本发明提供的特异性结合 PCSK9 的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段进一步具有消除 CDR 区异构化的特性,具有更好的稳定。

附图说明

图 1: 本发明抗体载体构建中的引物设计示意图。

图 2: 本发明抗体载体构建示意图。

图 3: 不同 h001-4-YTE 抗体 HCDR3 区域 D103 位点突变体与野生型 PCSK9 蛋白的结合能力曲线,结果显示 D103 位点的氨基酸替换不影响抗体与野生型 PCSK9 的结合活性。

图 4: 不同 h001-4-YTE 抗体 HCDR3 区域 D105 位点突变体与野生型 PCSK9 蛋白的结合能力曲线,数据结果显示, D105 位点氨基酸替换不影响 PCSK9 抗体与野生型 PCSK9 蛋白的结合能力。

图 5: 不同 h001-4-YTE 抗 PCSK9 抗体浓度中 HepG2 细胞的 LDL 摄取变化。数据结果显示 PCSK9 抗体能够促进 HepG2 细胞摄取 LDL。

图 6: 不同 h001-4-WT 抗 PCSK9 抗体浓度中 HepG2 细胞的 LDL 摄取变化。

数据结果显示 PCSK9 抗体能够促进 HepG2 细胞摄取 LDL。

图 7: 注射 h001-4-WT 抗 PCSK9 抗体的小鼠血清中 LDL-c 浓度随时间变化 (*: $p < 0.05$, vs IgG, **: $p < 0.01$, vs IgG)。数据结果显示 PCSK9 抗体能够降低过表达人 PCSK9 的小鼠血清中 LDL-c 浓度。

5 图 8: 注射 h001-4-WT 抗 PCSK9 抗体的小鼠血清中相对 IgG 组的 LDL-c 浓度变化。数据结果显示相对 IgG 组, PCSK9 抗体能够降低过表达人 PCSK9 的小鼠血清中 LDL-c 浓度。

图 9: 本发明抗体在食蟹猴体内药效及药代检测。附图显示 h001-4-WT 和 h001-4-YTE 均能够明显降低食蟹猴体内 LDL 的含量, 且 h001-4-YTE 的降低持续时间要优于 h001-4-WT。
10

具体实施方式

术语定义

为了更容易理解本发明, 以下具体定义了某些技术和科学术语。除非在本文中另有明确定义, 本文使用的所有其它技术和科学术语都具有本发明所属领域的一般技术人员通常理解的含义。
15

本发明所用氨基酸三字母代码和单字母代码如 J.biol.chem,243,p3558(1968)中所述。

本发明所述的“抗体”指免疫球蛋白, 是由两条相同的重链和两条相同的轻链通过链间二硫键连接而成的四肽链结构。免疫球蛋白重链恒定区的氨基酸组成和排列顺序不同, 故其抗原性也不同。据此, 可将免疫球蛋白分为五类, 或称为免疫球蛋白的同种型, 即 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE, 其相应的重链分别为 μ 链、 δ 链、 γ 链、 α 链、和 ϵ 链。同一类 Ig 根据其铰链区氨基酸组成和重链二硫键的数目和位置的差别, 又可分为不同的亚类, 如 IgG 可分为 IgG1、IgG2、IgG3、
20 IgG4。轻链通过恒定区的不同分为 κ 链或 λ 链。五类 Ig 中每类 Ig 都可以有 κ 链或 λ 链。

在本发明中, 本发明所述的抗体轻链可进一步包含轻链恒定区, 所述的轻链恒定区包含人源或鼠源的 κ 、 λ 链或其变体。

在本发明中, 本发明所述的抗体重链可进一步包含重链恒定区, 所述的重链
30 恒定区包含人源或鼠源的 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 或其变体。

抗体重链和轻链靠近 N 端的约 110 个氨基酸的序列变化很大, 为可变区 (Fv 区); 靠近 C 端的其余氨基酸序列相对稳定, 为恒定区 (Fc 区)。可变区包括 3 个高变区 (HVR) 和 4 个序列相对保守的骨架区 (FR)。3 个高变区决定抗体的特异性, 又称为互补性决定区 (CDR)。每条轻链可变区 (LCVR) 和重链可变区 (HCVR) 由 3 个 CDR 区 4 个 FR 区组成, 从氨基端到羧基端依次排列的顺序
35

为：FR1，CDR1，FR2，CDR2，FR3，CDR3，FR4。轻链的 3 个 CDR 区指 LCDR1、LCDR2、和 LCDR3；重链的 3 个 CDR 区指 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3。本发明所述的抗体或抗原结合片段的 LCVR 区和 HCVR 区的 CDR 氨基酸残基在数量和位置符合已知的 Kabat 编号规则（LCDR1-3，HCDE2-3），或者符合 kabat 和 chothia 的编号规则（HCDR1）。

本发明的抗体包括鼠源抗体、嵌合抗体、人源化抗体，优选人源化抗体。

术语“鼠源抗体”在本发明中为根据本领域知识和技能制备的对人 PCSK9 的单克隆抗体。制备时用 PCSK9 抗原注射试验对象，然后分离表达具有所需序列或功能特性的抗体的杂交瘤。在本发明一个优选的实施方案中，所述的鼠源 PCSK9 抗体或其抗原结合片段，可进一步包含鼠源 κ 、 λ 链或其变体的轻链恒定区，或进一步包含鼠源 IgG1、IgG2、IgG3 或其变体的重链恒定区。

术语“嵌合抗体（chimeric antibody）”，是将鼠源性抗体的可变区与人抗体的恒定区融合而成的抗体，可以减轻鼠源性抗体诱发的免疫应答反应。建立嵌合抗体，要选建立分泌鼠源性特异性单抗的杂交瘤，然后从小鼠杂交瘤细胞中克隆可变区基因，再要据需要克隆人抗体的恒定区基因，将小鼠可变区基因与人恒定区基因连接成嵌合基因后插入人载体中，最后在真核工业系统或原核工业系统中表达嵌合抗体分子。在本发明一个优选的实施方案中，所述的 PCSK9 嵌合抗体的抗体轻链进一步包含人源 κ 、 λ 链或其变体的轻链 Fc 区。所述的 PCSK9 嵌合抗体的抗体重链进一步包含人源 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 或其变体的重链 Fc 区，优选包含人源 IgG1、IgG2 或 IgG4 重链恒定区，或者使用氨基酸突变(如 YTE 突变)后延长抗体在血清中的半衰期的 IgG1、IgG2 或 IgG4 变体。

术语“人源化抗体（humanized antibody）”，也称为 CDR 移植抗体（CDR-grafted antibody），是指将小鼠的 CDR 序列移植到人的抗体可变区框架，即不同类型的人种系抗体构架序列中产生的抗体。可以克服嵌合抗体由于携带大量小鼠蛋白成分，从而诱导的强烈的抗体可变抗体反应。此类构架序列可以从包括种系抗体基因序列的公共 DNA 数据库或公开的参考文献获得。如人重链和轻链可变区基因的种系 DNA 序列可以在“VBase”人种系序列数据库（在因特网 www.mrccpe.com.ac.uk/vbase 可获得），以及在 Kabat, E.A.等人，1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版中找到。为避免免疫原性下降的同时，引起的活性下降，可对所述的人抗体可变区框架序列进行最少反向突变或回复突变，以保持活性。本发明的人源化抗体也包括进一步由噬菌体展示对 CDR 进行亲和力成熟后的人源化抗体。在本发明一个优选的实施方案中，所述的 PCSK9 人源化抗体小鼠的 CDR 序列选自 SEQ ID NO:12, 13, 31, 15, 16 或 17 所示的序列；人的抗体可变区框架经过设计选择，其中所述抗体轻链可变区上的轻链 FR 区序列，来源于人种系轻链 IGKV1-39*01 和 hjk2.1 的组合序列；其中所述抗体重链可变区上的重链 FR 区序列，来源于人种系重链 IGHV1-2*02 和 hjh2 的组合序列。

为避免免疫原性下降的同时，引起的活性下降，可对所述的人抗体可变区可进行最少反向突变，以保持活性。

本发明中所述的“抗原结合片段”，指具有抗原结合活性的 Fab 片段，Fab' 片段，F(ab')₂ 片段，以及与人 PCSK9 结合的 Fv 片段 ScFv 片段；Fv 片段含有抗体重链可变区和轻链可变区，但没有恒定区，并具有全部抗原结合位点的最小抗体片段。一般地，Fv 抗体还包含在 VH 和 VL 结构域之间的多肽接头，且能够形成抗原结合所需的结构。也可以用不同的连接物将两个抗体可变区连接成一条多肽链，称为单链抗体 (single chain antibody) 或单链 Fv (sFv)。本发明的术语“与 PCSK9 结合”，指能与人 PCSK9 相互作用。本发明的术语“抗原结合位点”指抗原上不连续的，由本发明抗体或抗原结合片段识别的三维空间位点。

术语“Fc 区”在本文中用于定义免疫球蛋白重链的 C 端区域，所述区域包含至少一部分的恒定区。该术语包括天然序列 Fc 区和变体 Fc 区。在某些实施方案中，人 IgG 重链 Fc 区从 Cys226 或 Pro230 延伸至重链的羧基端。然而，Fc 区的 C 端赖氨酸(Lys447)可以存在或者可以不存在。除非另外说明，Fc 区或恒定区中的氨基酸残基的编号是根据 EU 编号系统，其也被称为 EU 索引，如在 Kabat 等, Sequences of Proteins of Immunological Interest(免疫学感兴趣的蛋白质的序列), 5th Ed.Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991 中所述。Fc 区域是抗体的效应子功能所必需的。效应子功能包括启动补体依赖的细胞毒性(CDC)、启动吞噬作用和抗体依赖的细胞介导的细胞毒性(ADCC)并通过胞转作用转运抗体通过细胞屏障。此外，Fc 区域对维持 IgG 类抗体的血清半衰期至关重要(Ward 和 Ghetie, Ther. Immunol.2: 77-94(1995))。研究发现 IgG 抗体的血清半衰期由 Fc 和新生 Fc 受体(FcRn)的结合来介导。FcRn 是由跨膜 α 链和可溶性 β 链(β 2-微球蛋白)组成的异源二聚体。美国专利号 6,165,745 公开了一种通过将突变引入编码抗体的 DNA 片段生产物半衰期减少的抗体的方法。该突变包括在 Fc-绞链结构域的位置 253、310、311、433 或 434 处的氨基酸取代。美国专利号 6,277,375B1 公开了含有突变型 IgG 分子的组合物，该分子相对野生型 IgG 血清半衰期增加，其中该突变型 IgG 分子含有以下氨基酸取代：在 252 位苏氨酸取代亮氨酸，在 254 位苏氨酸取代丝氨酸，或在 256 位苏氨酸取代苯丙氨酸(M252Y、S254T 和 T256E)。也公开了在位置 433、435 或 436 处具有氨基酸取代的突变型 IgG。美国专利号 6,528,624 公开了含有 IgG Fc 区域的一种抗体的变体，该变体在人 IgG Fc 区域的一个或多个氨基酸位置(位置 270、322、326、327、329、331、333 和 334)具有氨基酸取代。PCT 公开号 WO 02/060919A2 公开了修饰的 IgG，该修饰的 IgG 包含的 IgG 恒定区相对于野生型 IgG 恒定区含有一个或多个氨基酸修饰，其中该修饰的 IgG 与含有野生型 IgG 恒定区的 IgG 相比增加了半衰期，并且其中一个或多个氨基酸修饰位于以下一个或多个位置：251、

253、255、285-290、308-314、385-389、和 428-435。具体地，本文所述“YTE”或“YET 突变”指 IgG1 的 Fc 区的一个突变组合，用于促进 Fc 区与人 FcRn 的结合，延长抗体在人血清中的半衰期。YTE 突变子包含三个“YTE 突变子”的组合：M252Y、S254T 和 T256E，残基编号是根据 EU 编号系统，其也被称为 EU 索引，如在 Kabat 等(参考 U.S.专利 No.7,658,921 所述)对 IgG 重链进行编号。5 相较于野生型抗体，YTE 突变抗体大大延长了抗体在血清中的半衰期，如 Dall’Acqua 等人, J. Biol. Chem. 281: 23514-24 (2006)和 U.S.专利号 No. 7,083,784。

现有技术中熟知生产和纯化抗体和抗原结合片段的方法，如冷泉港的抗体实验技术指南，5-8 章和 15 章。例如，老鼠可以用人 PCSK9 或其片段免疫，所得10 到的抗体能被复性、纯化，并且可以用常规的方法进行氨基酸测序。抗原结合片段同样可以用常规方法制备。发明所述的抗体或抗原结合片段用基因工程方法在非人源的 CDR 区加上一个或多个人源 FR 区。人 FR 种系序列可以通过比对 IMGT 人类抗体可变区种系基因数据库和 MOE 软件，从 ImMunoGeneTics(IMGT)的网站 <http://imgt.cines.fr> 得到，或者从免疫球蛋白杂志，2001ISBN012441351 上获得。

15 本发明工程化的抗体或抗原结合片段可用常规方法制备和纯化。比如，编码重链和轻链的 cDNA 序列，可以克隆并重组至 GS 表达载体。重组的免疫球蛋白表达载体可以稳定地转染 CHO 细胞。作为一种更推荐的现有技术，哺乳动物类表达系统会导致抗体的糖基化，特别是在 Fc 区的高度保守 N 端位点。通过表达与人 PCSK9 特异性结合的抗体得到稳定的克隆。阳性的克隆在生物反应器的无血清培养基中扩大培养以生产抗体。分泌了抗体的培养液可以用常规技术纯化。20 比如，用含调整过的缓冲液的 A 或 G Sepharose FF 柱进行纯化。洗去非特异性结合的组分。再用 PH 梯度法洗脱结合的抗体，用 SDS-PAGE 检测抗体片段，收集。抗体可用常规方法进行过滤浓缩。可溶的混合物和多聚体，也可以用常规方法去除，比如分子筛、离子交换。得到的产物需立即冷冻，如-70℃，或者冻干。

25 “给予”和“处理”当应用于动物、人、实验受试者、细胞、组织、器官或生物流体时，是指外源性药物、治疗剂、诊断剂或组合物与动物、人、受试者、细胞、组织、器官或生物流体的接触。“给予”和“处理”可以指例如治疗、药物代谢动力学、诊断、研究和实验方法。细胞的处理包括试剂与细胞的接触，以及试剂与流体的接触，其中所述流体与细胞接触。“给予”和“处理”还意指通30 过试剂、诊断、结合组合物或通过另一种细胞体外和离体处理例如细胞。“处理”当应用于人、兽医学或研究受试者时，是指治疗处理、预防或预防性措施，研究和诊断应用。

“治疗”意指给予患者内用或外用治疗剂，例如包含本发明的任一种结合化合物的组合物，所述患者具有一种或多种疾病症状，而已知所述治疗剂对这些症35 状具有治疗作用。通常，在受治疗患者或群体中以有效缓解一种或多种疾病症状

的量给予治疗剂,以诱导这类症状退化或抑制这类症状发展到任何临床可测量的程度。有效缓解任何具体疾病症状的治疗剂的量(也称作“治疗有效量”)可根据多种因素变化,例如患者的疾病状态、年龄和体重,以及药物在患者产生需要疗效的能力。通过医生或其它专业卫生保健人士通常用于评价该症状的严重性或进展状况的任何临床检测方法,可评价疾病症状是否已被减轻。尽管本发明的实施方案(例如治疗方法或制品)在缓解每个目标疾病症状方面可能无效,但是根据本领域已知的任何统计学检验方法如 Student t 检验、卡方检验、依据 Mann 和 Whitney 的 U 检验、Kruskal-Wallis 检验(H 检验)、Jonckheere-Terpstra 检验和 Wilcoxon 检验确定,其在统计学显著数目的患者中应当减轻目标疾病症状。

“保守修饰”或“保守置换或取代”是指具有类似特征(例如电荷、侧链大小、疏水性/亲水性、主链构象和刚性等)的其它氨基酸置换蛋白中的氨基酸,使得可频繁进行改变而不改变蛋白的生物学活性。本领域技术人员知晓,一般而言,多肽的非必需区域中的单个氨基酸置换基本上不改变生物学活性(参见例如 Watson 等(1987) *Molecular Biology of the Gene*, The Benjamin/Cummings Pub.Co., 第 224 页,(第 4 版))。另外,结构或功能类似的氨基酸的置换不大可能破坏生物学活性。

“有效量”包含足以改善或预防医学疾病的症状或病症的量。有效量还意指足以允许或促进诊断的量。用于特定患者或兽医学受试者的有效量可依据以下因素而变化:例如,待治疗的病症、患者的总体健康情况、给药的方法途径和剂量以及副作用严重性。有效量可以是避免显著副作用或毒性作用的最大剂量或给药方案。

“外源性”指根据情况在生物、细胞或人体外产生的物质。“内源性”指根据情况在细胞、生物或人体内产生的物质。

“同源性”是指两个多核苷酸序列之间或两个多肽之间的序列相似性。当两个比较序列中的位置均被相同碱基或氨基酸单体亚基占据时,例如如果两个 DNA 分子的每一个位置都被腺嘌呤占据时,那么所述分子在该位置是同源的。两个序列之间的同源性百分率是两个序列共有的匹配或同源位置数除以比较的位置数 $\times 100$ 的函数。例如,在序列最佳比对时,如果两个序列中的 10 个位置有 6 个匹配或同源,那么两个序列为 60%同源。一般而言,当比对两个序列而得到最大的同源性百分率时进行比较。

本文使用的表述“细胞”、“细胞系”和“细胞培养物”可互换使用,并且所有这类名称都包括后代。因此,单词“转化体”和“转化细胞”包括原代受试细胞和由其衍生的培养物,而不考虑转移数目。还应当理解的是,由于故意或非有意的突变,所有后代在 DNA 含量方面不可能精确相同。包括具有与最初转化细胞中筛选的相同的功能或生物学活性的突变后代。在意指不同名称的情况下,其

由上下文清楚可见。

本文使用的“聚合酶链式反应”或“PCR”是指其中微量的特定部分的核酸、RNA 和/或 DNA 如在例如美国专利号 4,683,195 中所述扩增的程序或技术。一般来说，需要获得来自目标区域末端或之外的序列信息，使得可以设计寡核苷酸引物；这些引物在序列方面与待扩增模板的对应链相同或相似。2 个引物的 5' 末端核苷酸可以与待扩增材料的末端一致。PCR 可用于扩增特定的 RNA 序列、来自总基因组 DNA 的特定 DNA 序列和由总细胞 RNA 转录的 cDNA、噬菌体或质粒序列等。一般参见 Mullis 等(1987) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:263; Erlich 编辑, (1989) PCR TECHNOLOGY (Stockton Press, N.Y.)。本文使用的 PCR 被视为用于扩增核酸测试样品的核酸聚合酶反应法的一个实例，但不是唯一的实例，所述方法包括使用作为引物的已知核酸和核酸聚合酶，以扩增或产生核酸的特定部分。

“任选”或“任选地”意味着随后所描述地事件或环境可以但不必发生，该说明包括该事件或环境发生或不发生的场合。例如，“任选包含 1-3 个抗体重链可变区”意味着特定序列的抗体重链可变区可以但不必须存在。

“药物组合物”表示含有一种或多种本文所述化合物或其生理学上/可药用的盐或前体药物与其他化学组分的混合物，所述其他组分例如生理学/可药用的载体和赋形剂。药物组合物的目的是促进对生物体的给药，利于活性成分的吸收进而发挥生物活性。

实施例与测试例

以下结合实施例进一步描述本发明，但这些实施例并非限制着本发明的范围。本发明实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，如冷泉港的抗体技术实验手册，分子克隆手册；或按照原料或商品制造厂商所建议的条件。未注明具体来源的试剂，为市场购买的常规试剂。

实施例 1、PCSK9 抗原及检测用蛋白的制备

蛋白设计及表达

以人前蛋白转化酶枯草溶菌素9 (人PCSK9, Uniprot号: Q8MBP7)作为本发明PCSK9的模板，设计本发明涉及的抗原及检测用蛋白的氨基酸序列，可选的在 PCSK9蛋白基础上融合不同的标签如his标签或促进免疫的肽段如PADRE肽，分别克隆到pTT5载体上(Biovector, Cat#: 102762)或pTargeT 载体上(promega, A1410)，在293细胞瞬转表达或CHO-S稳定表达，纯化，获得编码本发明抗原及检测用蛋白。

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

MGTVSSRRSWWPLPLLLLLLLLLLGPAGARAQEDEDGDYEELVLALRSEED
GLAEAPEHGTTATFHRCAKDPWRLPGTYVVVLKEETHLSQSERTARRLQAQ

AARRGYLTKILHVFHGLLPGFLVKMSGDLLELALKLPHVDYIEEDSSVFAQSI
 PWNLERITPPRYRADEYQPPDGGSLVEVYLLDTSIQSDHREIEGRVMVTDEN
 VPEEDGTRFHRQASKCDSHGTHLAGVVSGRDAGVAKGASMRSLRVLNCQG
 KGTVSGTLIGLEFIRKSQLVQPVGPLVLLPLAGGYSRVLNAACQRLARAGV
 5 VLVTAAGNFRDDACLYSPASAPEVITVGATNAQDQPVTLGTLGTNFGRCVDL
 FAPGEDIIGASSDCSTCFVSQSGTSQAAAHVAGIAAMMLSAEPELTLAELRQR
 LIHFSKADVINEAWFPEDQRVLTPLNVAALPPSTHGAGWQLFCRTVWSAHSG
 PTRMATAVARCAPDEELLSCSSFSRSGKRRGERMEAQGGKLVCRAHNAFGG
 EGVYAIARCCLLPQANCSVHTAPPAEASMGTRVHCHQQGHVLTGCSHWEV
 10 EDLGTHKPPVLRPRGQPNQCVGHREASIHASCCHAPGLECKVKEHGIPAPQEQ
 VTVACEEGWTLTGCSALPGTSHVLGAYAVDNTCVVRSRDVSTTGSTSEGAV
 TAVAICCRSRHLAQASQELQH~~HHHHH~~

SEQ ID NO: 1

注释：划横线部分为信号肽，斜体部分为 His6-tag（6 组氨酸标签）。

15

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

MGTVSSRRSWPLPLLLLLLLLLLGPAGARAQEDEDEDGDYEELVLALRSEED
 GLAEAPEHGTTATFHRC AKDPWRLPGTYVVVLKEETHLSQSERTARRLQAQ
 20 AARRGYLTKILHVFHGLLPGFLVKMSGDLLELALKLPHVDYIEEDSSVFAQSI
 PWNLERITPPRYRADEYQPPDGGSLVEVYLLDTSIQSDHREIEGRVMVTDEN
 VPEEDGTRFHRQASKCDSHGTHLAGVVSGRDAGVAKGASMRSLRVLNCQG
 KGTVSGTLIGLEFIRKSQLVQPVGPLVLLPLAGGYSRVLNAACQRLARAGV
 VLVTAAGNFRDDACLYSPASAPEVITVGATNAQDQPVTLGTLGTNFGRCVDL
 25 FAPGEDIIGASSDCSTCFVSQSGTSQAAAHVAGIAAMMLSAEPELTLAELRQR
 LIHFSKADVINEAWFPEDQRVLTPLNVAALPPSTHGAGWQLFCRTVWSAHSG
 PTRMATAVARCAPDEELLSCSSFSRSGKRRGERMEAQGGKLVCRAHNAFGG
 EGVYAIARCCLLPQANCSVHTAPPAEASMGTRVHCHQQGHVLTGCSHWEV
 EDLGTHKPPVLRPRGQPNQCVGHREASIHASCCHAPGLECKVKEHGIPAPQEQ
 30 VTVACEEGWTLTGCSALPGTSHVLGAYAVDNTCVVRSRDVSTTGSTSEGAV
 TAVAICCRSRHLAQASQELQGSGAKFVAAWTLKAAAH~~HHHHH~~

SEQ ID NO: 2

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

35

带 TEV 酶切位点的 PCSK9 与 his 标签融合蛋白: PCSK9-TEV-His6, 可通过 TEV 酶切获得 N-PCSK9 (N 端 PCSK9 结构域), 作为免疫原;

MGTVSSRRSWWPLPLLLLLLLLLLGPAGARAQEDEDGDYEELVLALRSEED
GLAEAPEHGTATFHRCAKDPWRLPGTYVVVLKEETHLSQSERTARRLQAQA
5 ARRGYLTKILHVFHGLLPGLVKMSGDLLELALKLPHVDYIEEDSSVFAQSIPW
NLERITPPRYRADEYQPPDGGSLVEVYLLDTSIQSDHREIEGRVMVTDENVPE
EDGTRFHRQASKCDSHGTHLAGVVSGRDAGVAKGASMRSLRVLNCQGKGT
SGTLIGLEFIRKSQLVQPVGPLVLLPLAGGYSRVLNAACQRLARAGVVLVTA
AGNFRDDACLYSPASAPEVITVGATNAQDQPVTLGTLGTNFGRCVDLFAPGED
10 IIGASSDCSTCFVSQSGTSQAAAHVAGIAAMMLSAEPELTLAELRQRLIHFS
AKDVINEAWFPEDQRVLTPLNVAALPPSTHENLYEQGAGWQLFCRTVWSAHS
GPTRMATAVARCAPDEELLSCSSFSRSGKRRGERMEAQGGKLVCRAHNAFGGEGV
YAIARCCLLPQANCSVHTAPPAEASMGTRVHCHQQGHVLTGCSSHWEVEDLG
THKPPVLRPRGQPNQCVGHREASIHASCCHAPGLECKVKEHGIPAPQEQVTV
15 CEEGWTLTGCSALPGTSHVLGAYAVDNTCVVRSRDVSTTGSTSEGAVTAVAIC
CRSRHLAQASQELQH~~HHHHHH~~

SEQ ID NO: 3

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

20

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

MGTVSSRRSWWPLPLLLLLLLLLLGPAGARAQEDEDGDYEELVLALRSEED
GLAEAPEHGTATFHRCAKDPWRLPGTYVVVLKEETHLSQSERTARRLQAQ
AARRGYLTKILHVFHGLLPGLVKMSGDLLELALKLPHVDYIEEDSSVFAQSI
25 PWNLERITPPRYRADEYQPPDGGSLVEVYLLDTSIQSDHREIEGRVMVTDENV
VPEEDGTRFHRQASKCDSHGTHLAGVVSGRDAGVAKGASMRSLRVLNCQG
KGTVSGTLIGLEFIRKSQLVQPVGPLVLLPLAGGYSRVLNAACQRLARAGV
VLVTAAGNFRDDACLYSPASAPEVITVGATNAQDQPVTLGTLGTNFGRCVDL
FAPGEDIIGASSYCSTCFVSQSGTSQAAAHVAGIAAMMLSAEPELTLAELRQR
30 LIHFSKDVINEAWFPEDQRVLTPLNVAALPPSTHGAGWQLFCRTVWSAHS
GPTRMATAVARCAPDEELLSCSSFSRSGKRRGERMEAQGGKLVCRAHNAFGG
EGVYAIARCCLLPQANCSVHTAPPAEASMGTRVHCHQQGHVLTGCSSHWEV
EDLGTHKPPVLRPRGQPNQCVGHREASIHASCCHAPGLECKVKEHGIPAPQEQ
VTVACEEGWTLTGCSALPGTSHVLGAYAVDNTCVVRSRDVSTTGSTSEGAV
35 TAVAICCRSRHLAQASQELQH~~HHHHHH~~

SEQ ID NO: 4

注释：划横线部分为信号肽，斜体部分为 His6-tag。

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

MGTVSSRRSWWPLPLLLLLLLLLLPAGARAQEDEDGDYEELVLALRSEED
GLAEAPEHGTATFHRCAKDPWRLPGTYVVVLKEETHLSQSERTARRLQAQ
AARRGYLTKILHVFHGLLPGLVKMSGDLLELALKLPHVDYIEEDSSVFAQSI
10 PWNLERITPPRYRADEYQPPDGGSLVEVYLLDTSIQSDHREIEGRVMVTDEN
VPEEDGTRFHRQASKCDSHGTHLAGVVSGRDAGVAKGASMRSLRVLNCQG
KGTVSGTLIGLEFIRKSQLVQPVGPLVLLPLAGGYSRVLNAACQRLARAGV
VLVTAAGNFRDDACLYSPASAPEVITVGATNAQDQPVTLGTLGTNFGRCVDL
FAPGEDIIGASSDCSTCFVSQSGTSQAAAHVAGIAAMMLSAEPELTLAELRQR
15 LIHFSKDVINEAWFPEDQRVLT PNLVAALPPSTHGAGWQLFCRTVWSAHSG
PTRMATAVARCAPDEELLSCSSFSRSGKRRGERMEAQGGKLV CRAHNAFGG
EGVYAIARCCLLPQANCSVHTAPPAEASMGTRVHCHQQGHVLTGCSHWEV
EDLGTHKPPVLRPRGQPNQCVGHREASIHASCCHAPGLECKVKEHGIPAPQEQ
VTVACEEGWTLTGCSALPGTSHVLGAYAVDNTCVVRSRDVSTTGSTSEGAV
20 TAVAICCRSRHLAQASQELQSGTSGSGLNDIFEAQKIEWHEHHHHHH

SEQ ID NO: 5

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

- PCSK9-Y: 插入生物素接受肽及 his 标签的 PCSK9 D374Y 突变体蛋白:
25 PCSK9-D374Y-BP15-His6, 检测蛋白;
MGTVSSRRSWWPLPLLLLLLLLLLPAGARAQEDEDGDYEELVLALRSEED
GLAEAPEHGTATFHRCAKDPWRLPGTYVVVLKEETHLSQSERTARRLQAQ
AARRGYLTKILHVFHGLLPGLVKMSGDLLELALKLPHVDYIEEDSSVFAQSI
PWNLERITPPRYRADEYQPPDGGSLVEVYLLDTSIQSDHREIEGRVMVTDEN
30 VPEEDGTRFHRQASKCDSHGTHLAGVVSGRDAGVAKGASMRSLRVLNCQG
KGTVSGTLIGLEFIRKSQLVQPVGPLVLLPLAGGYSRVLNAACQRLARAGV
VLVTAAGNFRDDACLYSPASAPEVITVGATNAQDQPVTLGTLGTNFGRCVDL
FAPGEDIIGASSYCSTCFVSQSGTSQAAAHVAGIAAMMLSAEPELTLAELRQR
LIHFSKDVINEAWFPEDQRVLT PNLVAALPPSTHGAGWQLFCRTVWSAHSG
35 PTRMATAVARCAPDEELLSCSSFSRSGKRRGERMEAQGGKLV CRAHNAFGG

EGVYAIARCCLLPQANCSVHTAPPAEASMGTRVHCHQQGHVLTGCSHWEV
EDLGTHKPPVLRPRGQPNQCVGHREASIHASCCHAPGLECKVKEHGIPAPQEQ
VTVACEEGWTLTGCSALPGTSHVLGAYAVDNTCVVRSRDVSTTGSTSEGAV
TAVAICCRSRHLAQASQELQGSTSGSGLNDIFEAQKIEWHEHHHHHH

5

SEQ ID NO: 6

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

带 Flag 标签和 His 标签的 PCSK9 受体蛋白 LDLR 胞外域片段:
LDLR-ECD-Flag-His6, 检测试剂;

10

MGPWGWKLRLWTVALLLAAAGTAVGDRCERNEFQCQDGKCISYKWVCD
GSAECQDGSDDESQETCLSVTCKSGDFSCGGRVNRCPQFWRCQVDCDNGS
DEQGCPPKTCSQDEFRCHDGKCISRQFVCDSDRDCLDGSDEASCPVLTCGPAS
FQCNSSTCIPQLWACDNDPDCEDGSDEWPQRCRGLYVFQGDSSPCSAFEFHC
LSGECIHSSWRCDDGPDCKDKSDEENCAVATCRPDEFQCSGNCIHGSRQCD
15 REYDCKDMSDEVGCVNVTLCGPNKFKCHSGECITLDKVCNMARDCRDWS
DEPIKECGTNECLDNNGGCSHVCNDLKIGYECLCPDGFQLVAQRRCEDIDEC
QDPDTCSQLCVNLEGGYKCQCEEGFQLDPHTKACKAVGSIAYLFFTNRHEVR
KMTLDRSEYTSIPNLRNVVALDTEVASNRIYWSDLSQRMICSTQLDRAHGV
SSYDTVISRDIQAPDGLAVDWIHSNIYWTDVSLGTVSVADTKGVKRKTLFRE
20 NGSKPRAIVVDPVHGFMYWTDWGTAPAKIKKGGVNGVDIYSLVTENIQWPNGI
TLDLLSGRLYWVDSKLHSSIDVNGGNRKILEDEKRLAHPFSLAVFEDKVF
WTDIINEAIFSANRLTGSDVNLLAENLLSPEDMVLFHNLTPRGVNWERTTL
SNGGCQYLCLPAPQINPHSPKFTCACPDGMLLARDMRSCLTEAEAATQET
STVRLKVSSTAVRTQHTTTTRPVPDTSRLPGATPGLTTVEIVTMSHQALGDVAG
25 RGNEKKPSSVRDYKDDDDKHHHHHH

SEQ ID NO: 7

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

LDLR-Fc: 缩短形式的 LDLR 胞外域片段与 hIgG1-Fc 融合蛋白(具有与 PCSK9
30 结合活性): LDLR-sECD-Fc (hIgG1) 作为检测试剂;

MEFGLSWLFLVAILKGVQCGTNECLDNNGGCSHVCNDLKIGYECLCPDGF
QLVAQRRCEDIDECQDPDTCSQLCVNLEGGYKCQCEEGFQLDPHTKACK*EPK*
SSDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
35 *APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ*

*PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
SLSPGK*

SEQ ID NO: 8

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

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

MEFGLSWLFLVAILKGVQCGTNECLDNNGGCSHVCNDLKIGYECLCPDGF
10 OLVAQRRCEDIDEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

15 SEQ ID NO: 9

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

20 实施例 2、PCSK9、LDLR 相关重组蛋白的纯化重组蛋白以及杂交瘤抗体、重组抗体的纯化

1、带 His 标签的重组蛋白的纯化步骤：

将细胞表达上清样品高速离心去除杂质，并将缓冲液换置换为 PBS，加入咪唑至终浓度为 5mM。用含有 5mM 咪唑的 PBS 溶液平衡镍柱，冲洗 2-5 倍柱体积。将置换后的上清样品上 IMAC 柱。用含有 5mM 咪唑的 PBS 溶液冲洗柱子，
25 至 A₂₈₀ 读数降至基线。后用 PBS+10mM 咪唑冲洗层析柱，除去非特异结合的杂蛋白，并收集流出液。再用含有 300mM 咪唑的 PBS 溶液洗脱目的蛋白，并收集洗脱峰。收集的洗脱液浓缩后用凝胶层析 Superdex200 (GE) 进一步纯化，流动相为 PBS。去聚体峰，收集洗脱峰。所得到的蛋白经电泳，肽图，LC-MS 鉴定为正确后分装备用。得到带 His 标签的 PCSK9-His6 (SEQ ID NO: 1)、
30 PCSK9-PADRE-His6 (SEQ ID NO: 2)、PCSK9-TEV-His6 (SEQ ID NO: 3)、PCSK9-D374Y-His6 (SEQ ID NO: 4)、PCSK9-BP15-His6 (SEQ ID NO: 5)、PCSK9-D374Y-BP15-His6 (SEQ ID NO: 6) 用于本发明抗体的免疫原或检测试剂。其中 PCSK9-TEV-His6 纯化后通过 TEV 酶进行酶切，酶切产物再利用 IMAC 柱结合去除 TEV 酶、未酶切完全的 PCSK9-TEV-His6 或切除的带 His 标签的 C
35 端结构域片段，IMAC 流出液中浓缩获得仅留 N 端结构域的 PCSK9 片段 (缩写为 N-pCSK9)，作为免疫原用于小鼠免疫。

2、带 His 标签和 Flag 标签的 LDLR-ECD-Flag-His6 (SEQ ID NO: 7) 重组蛋白的纯化步骤:

将样品高速离心去除杂质, 并浓缩至适当体积。利用 0.5×PBS 平衡 flag 亲和柱, 冲洗 2-5 倍柱体积。将除杂后的细胞表达上清样品上柱。用 0.5×PBS 冲洗柱子, 至 A₂₈₀ 读数降至基线。用含有 0.3M NaCl 的 PBS 冲洗柱子, 冲洗杂蛋白, 并收集。用 0.1M 乙酸(pH3.5-4.0)洗脱目的蛋白, 并收集, 调节 pH 至中性。收集的洗脱液浓缩后用凝胶层析 Superdex200(GE)进一步纯化, 流动相为 PBS。去聚体峰, 收集洗脱峰收集样品经电泳, 肽图, LC-MS 鉴定正确后分装备用。

10 得到带 FLAG/His6 标签的 LDLR-ECD-Flag-His6 (SEQ ID NO: 7), 用于本发明抗体的性能测试。

3、LDLR 的 Fc 融合蛋白的纯化步骤:

将细胞表达上清样品高速离心去除杂质, 浓缩至适当体积后上 Protein A 柱。

15 用 PBS 冲洗柱子, 至 A₂₈₀ 读数降至基线。用 100mM sodium acetate pH3.0 洗脱目的蛋白, 用 1M Tris-HCl 中和。洗脱样品适当浓缩后利用 PBS 平衡好的凝胶层析 Superdex200 (GE) 进一步纯化, 去聚体的峰收集好后分装备用。此方法用来纯化 LDLR-sECD -Fc (hIgG1) (SEQ ID NO: 8) 和 LDLR-ssECD -Fc (hIgG1) (SEQ ID NO: 9)。两者可用作 PCSK9 抗体功能性测试。

20

实施例 3、抗人 PCSK9 杂交瘤单克隆抗体的制备

1、免疫

抗人 PCSK9 单克隆抗体通过免疫小鼠产生。实验用 SJL 白小鼠, 雌性, 6 周龄 (北京维通利华实验动物技术有限公司, 动物生产许可证号: SCXK(京)2012-0001)。饲养环境: SPF 级。小鼠购进后, 实验室环境饲养 1 周, 12/12 小时光/暗周期调节, 温度 20-25 °C; 湿度 40-60 %。将已适应环境的小鼠按两种方案免疫 (A/B), 每组 6-10 只。免疫抗原为带 His 标签的人 PCSK9-His6 (SEQ ID NO: 1)、pCSK9-PADRE-His6(SEQ ID NO: 2)及 N-PCSK9 (SEQ ID NO: 3)。

25

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

30

方案 B 用 Titermax (sigma Lot Num: T2684)与 Alum (Thremo Lot Num: 77161)交叉免疫。抗原与佐剂 (titermax) 比例为 1:1, 抗原与佐剂 (Alum) 比例为 3:1 , 10-20μg/只(首免), 5μg/只 (加强免疫)。第 0 天腹膜内(IP)注射 20 /10μg/只的乳化后抗原, 首免后每周一次, Titermax 和 Alum 交替使用, 共 6-11 周。免疫四周

35

后，根据背部结块和腹部肿胀情况，选择背部或腹膜内注射抗原。

2、细胞融合

选择血清中抗体滴度高（见后面的测试例 1 和 2，结合 PCSK9 的 ELISA 方法）并且滴度趋于平台的小鼠进行脾细胞融合，融合前 72 小时冲刺免疫所选小鼠，PCSK9-His6 10 μ g/只，腹腔注射。采用优化的 PEG 介导的融合步骤将脾淋巴细胞与骨髓瘤细胞 Sp2/0 细胞(ATCC® CRL-8287™)进行融合得到杂交瘤细胞。融合好的杂交瘤细胞用 HAT 完全培养基（含 20%FBS、1 $\times$ HAT 和 1 $\times$ OPI 的 RPMI-1640 培养基）重悬，分装于 96 孔细胞培养板中（1 $\times$ 10⁵/150 μ l/孔），37 $^{\circ}$ C，5%CO₂ 孵育。融合后的第 5 天加入 HAT 完全培养基，50 μ l/孔，37 $^{\circ}$ C，5%CO₂ 孵育。融合后第 7 天~8 天，根据细胞生长密度，全换液，培养基为 HT 完全培养基（含 20%FBS、1 $\times$ HT 和 1 $\times$ OPI 的 RPMI-1640 培养基），200 μ l/孔，37 $^{\circ}$ C，5%CO₂ 孵育。

3、杂交瘤细胞筛选

融合后第 10-11 天，根据细胞生长密度，进行结合 PCSK9 或 PCSK9-Y 的 ELISA 方法检测（见测试例 1 和 2）。并将结合 ELISA 检测的阳性孔细胞进行 PCSK9 或 PCSK9-Y 与 LDLR 结合的阻断 ELISA 检测（见测试例 3 和 4），阳性孔换液，并根据细胞密度及时扩大至 24 孔板中。移入 24 孔板的细胞株经过复测后进行保种和第一次亚克隆。第一次亚克隆筛选（见测试例 1 和 2）为阳性的进行保种，并进行第二次亚克隆。第二次亚克隆为阳性（见测试例 1 和 2）的进行保种和蛋白表达。多次融合获得有阻断 PCSK9 或 PCSK9-Y 与 LDLR 结合效果（见测试例 3 和 4）的杂交瘤细胞。

通过阻断实验和结合实验筛选得到杂交瘤克隆 mAb-001，用无血清细胞培养法进一步制备抗体，按纯化实例纯化抗体，供在检测例中使用。

4、杂交瘤阳性克隆序列测定

从阳性杂交瘤中克隆序列过程如下。收集对数生长期杂交瘤细胞，用 Trizol（Invitrogen, Cat No. 15596-018）按照试剂盒说明书步骤提取 RNA，用 PrimeScript™ Reverse Transcriptase 试剂盒反转录（Takara, Cat No. 2680A）。将反转录得到的 cDNA 采用 mouse Ig-Primer Set（Novagen, TB326 Rev.B 0503）进行 PCR 扩增后送测序公司测序。得到 mAb-001 的重链和轻链可变区 DNA 序列对应的氨基酸序列，其中测得杂交瘤克隆 mAb-001 的鼠抗可变区序列如下：

> mAb-001 VH

QVHLQQSGAELAKPGASVKLSCKASGYTFNDYWMHWVKERPGQGLEWIGY
INPSSGFTKYHQNFKDKATLTADKSSSTAYMQLSSLTYDDSAVYYCARQYDYDED

WYFDVWGTGTTVTVSS

SEQ ID NO: 10

> mAb-001 VL

5 DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLLNSRTRKNFLAWYQQKPGQSPKL
LIYWASTRESGVDPDRFTGRGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCKQSFNLFTFGSGTK
LEIK

SEQ ID NO: 11

注：顺序为 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4，序列中斜体为 FR 序列，
下划线为 CDR 序列。

10

表1. 各重链及轻链CDR区序列

	重链		轻链	
mAb-001	HCDR1	DYWMH SEQ ID NO: 12	LCDR1	KSSQSLLNSRTRKNFLA SEQ ID NO: 15
	HCDR2	YINPSSGFTKYHQNFK D SEQ ID NO: 13	LCDR2	WASTRES SEQ ID NO: 16
	HCDR3	QYDYDEDWYFDV SEQ ID NO: 14	LCDR3	KQSFNLFT SEQ ID NO: 17

实施例 4、抗人 PCSK9 杂交瘤单克隆抗体的人源化

1、杂交瘤克隆 mAb-001 人源化构架选择

15 通过比对 IMGT 人类抗体重轻链可变区种系基因数据库和 MOE 软件，分别
挑选与 mAb-001 同源性高的重轻链可变区种系基因作为模板，将这两个鼠源抗
体的 CDR 分别移植到相应的人源模板中，形成次序为
FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 的可变区序列。其中氨基酸残基由 Kabat
编号系统确定并注释。

20 鼠源抗体 mAb-001 的人源化轻链模板为 IGKV1-39*01 和 hjk2.1，人源化重链
模板为 IGHV1-2*02 和 hjh2，人源化后得到人源化抗体 h001-1 的可变区序列如
下：

> h001-1 VH

25 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYWMHWVRQAPGQGLEWMGY
INPSSGFTKYHQNFKDRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARQYDYDED
WYFDVWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 18

> h001-1 VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLLNSRTRKNFLAWYQQKPGKAPKL

LIYWASTRESGVPSRFSGSGSGTDFLT~~LT~~ISSLQPEDFATYYCKQSFN~~LFT~~FGQG~~TK~~
LEIK

SEQ ID NO: 24

- 注：顺序为 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4，序列中斜体为 FR 序列，
5 下划线为 CDR 序列。

2、杂交瘤克隆 mAb-001 的模板选择和回复突变设计，见下表 2；杂交瘤克隆回复突变后的人源化序列组合见表 4。

表 2. 杂交瘤克隆回复突变设计

VH		SEQ ID NO	VL		SEQ ID NO
h001_VH.1	Graft	18	h001_VL.1	Graft	24
h001_VH.1A	T30N	19	h001_VL.1A	S66D	25
h001_VH.1B	R87T	20	h001_VL.1B	T5S, S66D	26
h001_VH.1C	T30N, R87T	21	h001_VL.1C	T5S, S66D, Q3V, A49S	27
h001_VH.1D	T30N, R87T, R72A, T74K	22			
h001_VH.1E	T30N, R87T, R72A, T74K, M48I, V68A, M70L, R38K, R67K	23			

- 10 注：如 S66D 表示依照 Kabat 编号系统，将 66 位 S 突变回 D。Grafted 代表鼠抗体 CDR 植入人种系 FR 区序列。

各突变体可变区具体序列如下表 3：

表 3. 各突变体可变区具体序列表

SEQ ID NO	序列
19	<i>QVQLVQSGAEVKKPGASVKV</i> <i>SCKASGYTFNDYWMH</i> <i>WVRQAPGQGL</i> <i>EWMGYINPSSGFTKYHQNF</i> <i>KDRVTMTRDTSISTAYMELSRL</i> <i>RSDDTAVYY</i> <i>CARQYDYDEDWYFDVWGQG</i> <i>TTTVTVSS</i>
20	<i>QVQLVQSGAEVKKPGASVKV</i> <i>SCKASGYTFTDYWMH</i> <i>WVRQAPGQGLE</i> <i>WMGYINPSSGFTKYHQNF</i> <i>KDRVTMTRDTSISTAYMELSRL</i> <i>TSDDTAVYYC</i>

	<u>ARQYDYDEDWYFDVWGQGTTTVTVSS</u>
21	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFNDYWMHWRQAPGQGL</u> <u>EWMGYINPSSGFTKYHQNFKDRVTMTRDTSISTAYMELSRLTSDDTAVYY</u> <u>CARQYDYDEDWYFDVWGQGTTTVTVSS</u>
22	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFNDYWMHWRQAPGQGL</u> <u>EWMGYINPSSGFTKYHQNFKDRVTMTADKSISTAYMELSRLTSDDTAVYY</u> <u>CARQYDYDEDWYFDVWGQGTTTVTVSS</u>
23	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFNDYWMHWRQAPGQGL</u> <u>EWIGYINPSSGFTKYHQNFKDKATLTADKSISTAYMELSRLTSDDTAVYYCA</u> <u>RQYDYDEDWYFDVWGQGTTTVTVSS</u>
25	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLNSRTRKNFLAWYQQKPG</u> <u>KAPKLLIYWASTRESGVPRDFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCKQSE</u> <u>NLFTFGQGTKLEIK</u>
26	<u>DIQMSQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLNSRTRKNFLAWYQQKPG</u> <u>KAPKLLIYWASTRESGVPRDFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCKQSE</u> <u>NLFTFGQGTKLEIK</u>
27	<u>DIVMSQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLNSRTRKNFLAWYQQKPG</u> <u>KSPKLLIYWASTRESGVPRDFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCKQSE</u> <u>NLFTFGQGTKLEIK</u>

注：序列中横线部分为 CDR 区。

表 4. 鼠抗 mAb-001 人源化序列组合

	h001_VL.1	h001_VL.1A	h001_VL.1B	h001_VL.1C
h001_VH.1	h001-1	h001-2	h001-3	h001-4
h001_VH.1A	h001-5	h001-6	h001-7	h001-8
h001_VH.1B	h001-9	h001-10	h001-11	h001-12
h001_VH.1C	h001-13	h001-14	h001-15	h001-16
h001_VH.1D	h001-17	h001-18	h001-19	h001-20
h001_VH.1E	h001-21	h001-22	h001-23	h001-24

注：该表表示各种序列及其突变序列组合所得的人源化抗体可变区部分的组合。如 h001-1 表示，人源化抗体 h001-1 的轻重链分别包含轻链 h001_VL.1、重链 h001_VH.1 所示的轻链和重链可变区。其它类推。

3、将以上的人源化可变区序列组合与来自人IgG的重链恒定区和人kappa链的轻链恒定区连接，进行抗体化，重链恒定区来自人IgG1（如SEQ ID NO: 28），轻链恒定区来自人kappa链（如SEQ ID NO: 30）。得到相应的人源化抗体，进行

结合PCSK9的ELISA方法检测（见测试例1），和结合PCSK9-Y的ELISA方法检测（见测试例2）；并将结合ELISA检测的阳性孔细胞进行PCSK9/LDLR 结合的阻断ELISA检测（见测试例4），和进行PCSK9-Y/LDLR结合的阻断ELISA检测（见测试例3）；结果见表5-8。

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

实施例 5、构建和表达抗人 PCSK9 人源化抗体 IgG1-YTE 形式

10 实施例4抗体选用人重链IgG1/轻链kappa的恒定区与各可变区组合形成全长抗体，还可选用在Fc段做了YTE的IgG1重链恒定区突变来增加对应IgG1抗体在血清中的半衰期（例如将h001-4的重链恒定区替换为进行了YTE突变的重链恒定区变体，序列如SEQ ID NO: 29所示，得到抗体h001-4-YTE，与之相对应地，h001-4也称为h001-4 WT）。同样地，也可选用本领域其它已知的突变来增加抗体性能。重链恒定区序列（人 IgG1）：

15 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT
HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
20 WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 28

重链恒定区序列（IgG1-YTE）：

25 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
30 NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNH
YTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 29

轻链恒定区序列：

35 RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS

QESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
EC

SEQ ID NO: 30

1. 重组嵌合抗体的分子克隆

5 杂交瘤筛选所获得的阳性抗体分子经过测序后，得到可变区编码基因序列。以测序所得序列设计首尾引物，以测序基因为模板，经过 PCR 搭建各抗体 VH/VK 基因片段，再与表达载体 pHr(带信号肽及 hIgG1/hkappa 恒定区基因(CH1-FC/CL)片段)进行同源重组，构建重组嵌合抗体全长表达质粒 VH-CH1-FC-pHr/VL-CL-pHr，形成 h001 嵌合抗体。

10 2. 人源化抗体的分子克隆

人源设计之后的抗体序列，经过密码子优化后产生人密码子偏好的编码基因序列，设计引物 PCR 搭建各抗体 VH/VK 基因片段，再与表达载体 pHr (带信号肽及 hIgG1/hkappa 恒定区基因(CH1-FC/CL)片段)进行同源重组，构建人源化抗体全长表达质粒 VH-CH1-FC-pHr/VL-CL-pHr。

15 3. 重组嵌合抗体以及人源化抗体的表达与纯化

分别表达抗体轻重链的质粒以 1: 1.2 的比例转染 HEK293E 细胞，6 天后收集表达上清，高速离心去除杂质，用 Protein A 柱进行纯化。用 PBS 冲洗柱子，至 A₂₈₀ 读数降至基线。用 pH3.0-pH3.5 的酸性洗脱液洗脱目的蛋白，用 1M Tris-HCl, pH8.0-9.0 中和。洗脱样品适当浓缩后，利用 PBS 平衡好的凝胶层析 Superdex200 (GE) 进一步纯化，以去除聚体，收集单体峰，分装备用。

实施例 6、h001 系列抗体的重链 CDR3 突变体

25 抗体中天冬氨酸异构化是影响抗体化学稳定性的主要因素之一，尤其是抗体 CDR 区部分天冬氨酸异构化修饰，一般选择尽量避免或者突变降低。根据加速稳定性试验和计算机模拟抗体结构及热点预测，发现 h001 系列抗体重链 HCDR3 区 DED 位点（即 D103/E104/D105）中的天冬氨酸容易发生异构化，根据氨基酸性质和计算机抗体结构模拟技术，对上述位点的氨基酸可以进行任意的氨基酸取代，以有效消除或降低该位点的异构化，优选地，h001 系列抗体的重链可变区 CDR3 突变体为：

30 QYDY X¹E X²WYFDV (SEQ ID NO: 31)，其中 X¹ 为 h001 系列抗体的重链可变区第 103 位氨基酸残基，X¹ 可选自 Asp、Glu、His、Met、Asn 或 Gln；X² 为 h001 系列抗体的重链可变区第 105 位氨基酸残基；X² 可选自 Asp、Glu、

His、Met、Asn 或 Gln。但是，X¹、X² 不能同时为 Asp。

进一步地，含上述第 103、105 位突变的 CDR3 与含有不同回复突变的 FR 区可形成如下的重链可变区：

> h001_VH.1-CDR3 突变体 (SEQ ID NO: 32)

5 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYWMHWVRQAPGQGLEWMGYIN
PSSGFTKYHQNFKDRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARQYDYX¹EX²
WYFDVWGQGTTVTSS

> h001_VH.1A-CDR3 突变体 (SEQ ID NO: 33)

10 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFNDYWMHWVRQAPGQGLEWMGYIN
PSSGFTKYHQNFKDRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARQYDYX¹EX²
WYFDVWGQGTTVTSS

> h001_VH.1B-CDR3 突变体 (SEQ ID NO: 34)

15 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYWMHWVRQAPGQGLEWMGYIN
PSSGFTKYHQNFKDRVTMTRDTSISTAYMELSRLTSDDTAVYYCARQYDYX¹EX²
WYFDVWGQGTTVTSS

> h001_VH.1C-CDR3 突变体 (SEQ ID NO: 35)

20 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFNDYWMHWVRQAPGQGLEWMGYIN
PSSGFTKYHQNFKDRVTMTADKSISTAYMELSRLTSDDTAVYYCARQYDYX¹EX²
WYFDVWGQGTTVTSS

> h001_VH.1D-CDR3 突变体 (SEQ ID NO: 36)

25 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFNDYWMHWVRQAPGQGLEWMGYIN
PSSGFTKYHQNFKDRVTMTADKSISTAYMELSRLTSDDTAVYYCARQYDYX¹EX²
WYFDVWGQGTTVTSS

> h001_VH.1E-CDR3 突变体 (SEQ ID NO: 37)

30 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFNDYWMHWVKQAPGQGLEWIGYINP
SSGFTKYHQNFKDKATLTADKSISTAYMELSRLTSDDTAVYYCARQYDYX¹EX²W
YFDVWGQGTTVTSS

示例性地，h001 系列抗体重链的 CDR3 突变体 (SEQ ID NO: 31) 的具体突变形式及 h001 VH.1 的具体突变形式见以下突变体及表 5 和表 6。

表 5. h001 系列抗体重链 CDR3 的突变体序列

突变形式	H001 VH.1 重链 可变区序列	抗体重链 CDR3 序列
D103E	SEQ ID NO: 48	QYDYE <u>ED</u> WYFDV (SEQ ID NO: 38)
D103H	SEQ ID NO: 49	QYDYE <u>HD</u> WYFDV (SEQ ID NO: 39)
D103M	SEQ ID NO: 50	QYDYE <u>MD</u> WYFDV (SEQ ID NO: 40)

D103N	SEQ ID NO: 51	QYDYN <u>NED</u> WYFDV (SEQ ID NO: 41)
D103Q	SEQ ID NO: 52	QYDY <u>QED</u> WYFDV (SEQ ID NO: 42)
D105E	SEQ ID NO: 53	QYDY <u>DEE</u> WYFDV (SEQ ID NO: 43)
D105H	SEQ ID NO: 54	QYDY <u>DEH</u> WYFDV (SEQ ID NO: 44)
D105M	SEQ ID NO: 55	QYDY <u>DEM</u> WYFDV (SEQ ID NO: 45)
D105N	SEQ ID NO: 56	QYDY <u>DEN</u> WYFDV (SEQ ID NO: 46)
D105Q	SEQ ID NO: 57	QYDY <u>DEQ</u> WYFDV (SEQ ID NO: 47)

表 6. h001_VH.1 的 CDR3 突变体重链可变区序列

h001-VH.1 突变形式	抗体重链可变区序列
h001_VH.1D1 03E	<i>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYWMHWVRQA PGQGLEWMGYINPSSGFTKYHQNFKDRVMTMRDTSISTAYM ELSLRSDDTAVYYCARQYDY<u>EED</u>WYFDVWGQGTTVTVSS</i> (SEQ ID NO: 48)
h001_VH.1D1 03H	<i>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYWMHWVRQA PGQGLEWMGYINPSSGFTKYHQNFKDRVMTMRDTSISTAYM ELSLRSDDTAVYYCARQYDY<u>HED</u>WYFDVWGQGTTVTVSS</i> (SEQ ID NO: 49)
h001_VH.1D1 03M	<i>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYWMHWVRQA PGQGLEWMGYINPSSGFTKYHQNFKDRVMTMRDTSISTAYM ELSLRSDDTAVYYCARQYDY<u>MED</u>WYFDVWGQGTTVTVSS</i> (SEQ ID NO: 50)
h001_VH.1D1 03N	<i>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYWMHWVRQA PGQGLEWMGYINPSSGFTKYHQNFKDRVMTMRDTSISTAYM ELSLRSDDTAVYYCARQYDYN<u>NED</u>WYFDVWGQGTTVTVSS</i> (SEQ ID NO: 51)
h001_VH.1D1 03Q	<i>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYWMHWVRQA PGQGLEWMGYINPSSGFTKYHQNFKDRVMTMRDTSISTAYM ELSLRSDDTAVYYCARQYDY<u>QED</u>WYFDVWGQGTTVTVSS</i> (SEQ ID NO: 52)
h001_VH.1D1 05E	<i>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYWMHWVRQA PGQGLEWMGYINPSSGFTKYHQNFKDRVMTMRDTSISTAYM ELSLRSDDTAVYYCARQYDY<u>DEE</u>WYFDVWGQGTTVTVSS</i> (SEQ ID NO: 53)

h001_VH.1D1 05H	<i>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYWMHWVRQA PGQGLEWMGYINPSSGFTKYHQNFKDRVTMTRDTSISTAYM ELSRLRSDDTAVYYCARQYDYDEHWYFDVWGQGTTVTVSS</i> (SEQ ID NO: 54)
h001_VH.1D1 05M	<i>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYWMHWVRQA PGQGLEWMGYINPSSGFTKYHQNFKDRVTMTRDTSISTAYM ELSRLRSDDTAVYYCARQYDYDEM WYFDVWGQGTTVTVSS</i> (SEQ ID NO: 55)
h001_VH.1D1 05N	<i>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYWMHWVRQA PGQGLEWMGYINPSSGFTKYHQNFKDRVTMTRDTSISTAYM ELSRLRSDDTAVYYCARQYDYDENWYFDVWGQGTTVTVSS</i> (SEQ ID NO: 56)
h001_VH.1D1 05Q	<i>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYWMHWVRQA PGQGLEWMGYINPSSGFTKYHQNFKDRVTMTRDTSISTAYM ELSRLRSDDTAVYYCARQYDYDEQWYFDVWGQGTTVTVSS</i> (SEQ ID NO: 57)

注：序列中横线部分为 CDR 区。

以下用测试方法验证本发明抗体性能及有益效果。

测试例 1、PCSK9 抗体结合野生型 PCSK9 蛋白的 ELISA 实验

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

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

15 本发明嵌合抗体、回复突变后抗体与 PCSK9 的结合力 ELISA 实验, 结果见表 7。

表7. 本发明PCSK9抗体与PCSK9的结合活性测试

克隆号	EC50 (μg/ml)
h001-1	0.0084

h001-2	0.0123
h001-3	0.0113
h001-4	0.012
h001-5	0.0141
h001-6	0.01
h001-7	0.012
h001-8	0.009
h001-9	0.0136
h001-10	0.0176
h001-11	0.0129
h001-12	0.0103
h001-13	0.0071
h001-14	0.0084
h001-15	0.011
h001-16	0.0082
h001-17	0.0114
h001-18	0.0147
h001-19	0.0139
h001-20	0.0126
h001-21	0.0145
h001-22	0.0123
h001-23	0.0118
h001-24	0.0092
Ch-001	0.0084

结果显示，本发明 PCSK9 抗体与 PCSK9 有较高的结合活性。

对于消除抗体 CDR 区中天冬氨酸所带来的异构化问题，示例性地，在一个具体实施方式中，以抗体 h001-4-YTE 为基础，对抗体重链 CDR3 进行突变（h001-4D105H，即在 h001-4-YTE 的基础上对抗体重链可变区 CDR3 中第 105 5 位 D 突变为 H 的突变体，其他突变体命名类推），检测不同 CDR3 突变体与 PCSK9 的结合活性。示例性的突变体如：h001-4-YTE D103E、h001-4-YTE D103H、h001-4-YTE D103M、h001-4-YTE D103N、h001-4-YTE D103Q、h001-4-YTE D105E、h001-4-YTE D105H、h001-4-YTE D105M、h001-4-YTE D105N、h001-4-YTE D105Q 等。小量表达并纯化获得各突变体抗体，参照测试例 1 的实
10 验方法检测各突变体对于野生型 PCSK9 蛋白的结合能力。结果见表 8、图 3 和图 4。

表8. 本发明PCSK9抗体突变体与PCSK9的结合活性测试

克隆号	EC50(nM)
h001-4-YTE	0.229
h001-4-YTE D103H	0.135
h001-4-YTE D103M	0.248
h001-4-YTE D103N	0.070
h001-4-YTE D103Q	0.257
h001-4-YTE D105E	0.148
h001-4-YTE D105H	0.059
h001-4-YTE D105M	0.124
h001-4-YTE D105N	0.065
h001-4-YTE D105Q	0.116

结果显示在抗体重链 CDR3 中对 D103 或 D105 的氨基酸替换仍保持新抗体与野生型 PCSK9 的结合活性。

5 测试例 2、PCSK9 抗体结合 PCSK9-Y 的 ELISA 实验

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

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

本发明嵌合抗体、回复突变后抗体与突变型 PCSK9 的结合力 ELISA 实验, 结果见表 9。

表9. 本发明PCSK9抗体与PCSK9-Y的结合活性测试

克隆号	EC50 (μ g/ml)
h001-1	0.0132
h001-2	0.0157
h001-3	0.0152
h001-4	0.0179
h001-5	0.0152
h001-6	0.0144

h001-7	0.0137
h001-8	0.0165
h001-9	0.0194
h001-10	0.0209
h001-11	0.0170
h001-12	0.0124
h001-13	0.0096
h001-14	0.0112
h001-15	0.0178
h001-16	0.0111
h001-17	0.0161
h001-18	0.0191
h001-19	0.0204
h001-20	0.0170
h001-21	0.0119
h001-22	0.0111
h001-23	0.0125
h001-24	0.0170
Ch-001	0.0132

结果显示，本发明 PCSK9 抗体与 PCSK9-Y 有较高的结合活性。

测试例3、PCSK9抗体对LDLR-FC/ PCSK9-Y结合的阻断

抗 PCSK9 抗体对 LDLR-FC(SEQ ID NO: 8)和 PCSK9-Y(突变型 PCSK9, SEQ ID NO: 6) 结合的阻断能力测试，通过检测在抗体存在的条件下，PCSK9-Y 与 LDLR 结合的量来确定。

用磷酸缓冲液稀释 LDLR-FC，至 2 μ g/ml，包被在 96 孔 ELISA 板（Costar, CAT#3590）上，4 $^{\circ}$ C 放置过夜。洗板后，在 37 $^{\circ}$ C 用 Tris 缓冲液（含 0.9mM 氯化钙、0.05% Tween 20 和 5%脱脂奶粉）封闭 2 小时。洗板，加入生物素标记的 PCSK9-Y（bio-PCSK9-Y，用含 0.9mM 氯化钙、0.05% Tween 20 和 1%脱脂奶粉的 Tris 缓冲液稀释至终浓度 1 μ g/ml），和抗体样品（用含 0.9mM 氯化钙、0.05% Tween 20 和 1%脱脂奶粉的 Tris 缓冲液稀释）的混合液 100 μ l/孔，37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。洗板，加入辣根过氧化物酶-链霉亲和素（sigma, CAT#S2438），37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。再洗板，加入四甲基联苯胺溶液显色。最后加入终止液，在酶标仪上测量 OD450，并计算其 IC50 值。

本发明嵌合抗体、回复突变后抗体对 LDLR-FC/ PCSK9-Y 结合的阻断效果

测试，结果见表 10：

表10. 本发明PCSK9抗体阻断PCSK9-Y与LDLR之间结合的效果测试

克隆号	IC50 (μg/ml)
h001-1	0.5658
h001-2	0.4553
h001-3	0.4749
h001-4	0.5302
h001-5	0.4677
h001-6	0.4374
h001-7	0.5150
h001-8	0.4145
h001-9	0.5203
h001-10	0.5142
Ch-001	0.3915

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

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

测试例4、PCSK9抗体对LDLR-FC/ PCSK9结合的阻断

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

用磷酸缓冲液稀释 LDLR-FC 至 5μg/ml，包被在 96 孔 ELISA 板上，4℃放置
过夜。洗板后，在 37℃用 Tris 缓冲液（含 0.9mM 氯化钙、0.05% Tween 20 和
15 5%脱脂奶粉）封闭 2 小时。洗板，加入生物素标记的 PCSK9 (bio-WT-PCSK9，
用含 0.9mM 氯化钙、0.05% Tween 20 和 1%脱脂奶粉的 Tris 缓冲液稀释至终浓
度 2μg/ml) 和抗体样品（用含 0.9mM 氯化钙、0.05% Tween 20 和 1%脱脂奶粉
的 Tris 缓冲液稀释）的混合液 100μl/孔，37℃孵育 1 小时。洗板，加入辣根过氧
20 化物酶-链霉亲和素 (sigma, CAT#S2438)，37℃孵育 1 小时。再洗板，加入四
甲基联苯胺溶液显色。最后加入终止液，在酶标仪上测量 OD450，并计算其 IC50
值。

本发明嵌合抗体、回复突变后抗体对 LDLR-FC/ PCSK9 结合的阻断效果测
试，结果见表 11。

表11. 本发明PCSK9抗体阻断PCSK9与LDLR之间结合的效果测试

克隆号	IC50 (μg/ml)
h001-1	0.4997
h001-2	0.6750
h001-3	0.7021
h001-4	0.7597
h001-5	4.322
h001-6	0.6620
h001-7	0.6521
h001-8	0.7738
h001-9	0.9230
h001-10	0.8290
Ch-001	0.8363

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

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

测试例5、PCSK9抗体对LDL的摄取实验

- HepG2 细胞(中科院细胞库, #CAT, TCHu72)培养在 DMEM 培养基(Hyclone,
10 #CAT SH30243.01B)中(含 10%胎牛血清, Gibco, #CAT 10099-141)。当细胞覆盖 80-90%时, 消化吹散后计数 1.5×10^4 cells/孔铺于 96 孔板。24 小时后, 更换培养基为 DMEM, 10%无脂蛋白血清 (Millipore, CAT#LP4)。48 小时后, 用磷酸缓冲液洗 2 次, 加入在 4℃预孵育 1 小时的含 PCSK9 (SEQ ID NO: 1, 终浓度 10μg/ml) 和抗体样品 (用培养基稀释至不同浓度) 的混合物, 以及终浓度
15 10μg/ml 的 BODIPY - @LDL (Invitrogen, CAT#L3483), 37℃孵育。6 小时后, 用磷酸缓冲液洗板 2 次, 用酶标仪读取荧光值 (EX485nm/ EM535nm)。然后加入 50μl/孔 CellTiter-Glo®细胞活性发光检测试剂 (Promega, G7571), 读取化学发光值。LDL 摄取结果如图 5, 图 6 所示, 数据结果显示本发明 PCSK9 抗体能够促进 HepG2 细胞摄取 LDL。

20

测试例6、BIAcore检测PCSK9抗体亲和力实验

按照人 Fab 捕获试剂盒 (Cat. # 28-9583-25, GE) 说明书中所述的方法, 将人 Fab 捕获分子共价偶联于 CM5 生物传感芯片 (Cat. # BR-1000-12, GE)上, 从

而亲和捕获待测抗体，然后于芯片表面流经人 PCSK9 抗原（带 His 标签的人 PCSK9: PCSK9-His6, SEQ ID NO: 1），利用 Biacore 仪器实时检测反应信号从而获得结合和解离曲线，通过拟合得到亲和力数值，见表 12。在实验中每个循环解离完成后，用人 Fab 捕获试剂盒（GE）里配置的再生溶液将生物芯片洗净再生。

表12：抗PCSK9抗体的亲和力

固定相	流动相	亲和力 KD (M)
h001-4-WT	人 PCSK9 抗原	2.88E-10
h001-4-YTE		4.91E-10

本发明 PCSK9 抗体与人 PCSK9 抗原有强亲和力。

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

测试例 7、PCSK9 抗体体内药效实验

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

C57Bl/6 小鼠(购自上海西普尔·必凯实验动物有限责任公司)实验室环境适应 5 天，通过尾静脉注射 AAV-PCSK9 病毒(北京本元正阳基因技术有限公司)，注射 4×10^{11} v.g.。注射病毒后于实验前一天禁食过夜，眼眶取血，用 HDL 和 LDL/VLDL 胆固醇定量试剂盒(购自 BioVision 公司, 货号#K613-100)检测 LDL-c，根据 LDL-c 浓度随机分组，每组 6 只小鼠（n=6），进行尾静脉注射给药，内部生产的人 IgG、h001-4-WT 抗体给药剂量为 10 mg/kg（人 IgG、h001-4-WT 抗体用 PBS 配制，浓度为 1 mg/ml）。取血前禁食 6 小时，给药后第 24、48、72、96 小时眼眶取血，37℃放置 1 小时，3500 rpm 离心 10 分钟，取血清保存在-80℃。

最后一次取血清后，把冻存的血清在同一天检测。用 HDL 和 LDL/VLDL 胆固醇定量试剂盒检测血清中 LDL-c 浓度，按照试剂盒说明书操作。

实验结果如图 7 所示，正常小鼠血清 LDL-c 浓度约为 12 mg/dl。注射 AAV8-PCSK9 病毒后，血清中 LDL-c 浓度达平均 40 mg/dl。分组后给药，给药 24 小时后，与人 IgG 组相比，h001-4-WT 组 LDL-c 浓度下降 50%；给药 48 小时后，h001-4-WT 组 LDL-c 浓度下降 49%；给药 72 小时后，h001-4-WT 组 LDL-c 浓度下降 32%；给药 96 小时后，h001-4-WT 组 LDL-c 浓度下降 20%，如表 13 和图 8 所示。

综上，h001-4-WT能够降低过表达人PCSK9的小鼠血清中LDL-c浓度，且药效持续到72小时。

表 13. 各组小鼠血清中 LDL-c 浓度变化

	LDL-c (mg/dl)					%IgG				
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	0h	24h	48h	72h	96h
IgG-10mg/kg	40.0± 2.42	43.6± 4.16	47.4± 3.61	45.6± 3.35	55.8± 6.54	100	100	100	100	100
h001-4-WT-10mg/kg	41.4± 2.01	21.9± 1.21	24.0± 2.49	30.8± 2.17	44.6± 2.37	104	50	51	68	80

5 测试例 8、竞争性实验

在竞争性 ELISA 实验中，我们将一种抗体包板过夜，之后同时加入生物素化的 pCSK9-his 和 50 倍于包板浓度的竞争抗体，包板抗体和溶液中的抗体将竞争性结合抗原，之后检测板上抗原的信号。结果显示，h001-4 和 21B12 (US8030457B2)自身能够竞争性结合抗原外，h001-4 和 21B12 之间无明显竞争结合，提示两者抗原表位的不同，具体结果参见表 14。

表. 14

IR (%)	h001-4	21B12
h001-4	95.97	0.42
21B12	3.86	97.78

测试例 9、食蟹猴体内药效及药代检测

为考察本发明的抗体在体内的作用效果及代谢情况，尝试了在食蟹猴体内给药实验，分别给药 h001-4-WT 及 h001-4-YTE。采用静脉注射给药，剂量选择 3mg/kg，每组 3 只雄性食蟹猴。约 2~4 ml/分钟，缓慢推注。通过不同时间点取血检测脂蛋白尤其是低密度脂蛋白（LDL）及血清中抗体浓度，其中脂蛋白检测点为给药前和给药后 1、4、8、12、16、20、24、28 天，PK 采血点为给药前、给药后 15 分钟、30 分钟、1 小时、3 小时、8 小时、12 小时、24 小时、48 小时、72、96、120 小时、144 小时、168 小时、336 小时、504 小时、672 小时。

试验结果显示（图 9）h001-4-WT 和 h001-4-YTE 均能够明显降低食蟹猴体内 LDL 的含量，且 h001-4-YTE 的降低持续时间要优于 h001-4-WT。

药代取血点血清样品通过 ELISA 检测其中 h001-4-WT 和 h001-4-YTE 的含量，方法参考测试例 1 所述，结果显示 h001-4-WT 在食蟹猴体内半衰期为 4 天，

而 h001-4-YTE 在食蟹猴体内半衰期为 7.3 天, YTE 相比 WT 具有明显延长的体内半衰期。

测试例 10、PCSK9 抗体异构化水平检测

- 5 PCSK9 抗体在缓冲液中放置 40 度加速若干时间后, 取出约 30 μ g, 加入高浓度盐酸胍变性, 然后加入 DTT 还原二硫键, 再置换到 20mM His 缓冲液中(pH 6.0), 加入 trypsin 胰酶, 37 $^{\circ}$ C 反应过夜。使用 Q-Exactive 质谱仪依赖数据的采集 (data-dependent acquisition) 模式采集肽段的一级和二级 MS, 利用 Pepfinder 软件
- 10 比对理论序列, 设置天冬酰胺的脱酰胺、甲硫氨酸的氧化和天冬氨酸的异构为可变修饰, 特异性酶切位点为 K 和 R。谱图分析完成后, 导出发生修饰和未发生修饰的肽段列表, 根据各自的强度计算位点发生修饰的比例。

示例性的, 通过 LC-MS 分析比较发现 h001-4-YTE D103N、h001-4-YTE D105E 或 h001-4-YTE D105N 突变能够有效降低或消除异构化修饰的发生, 结果如表 15 所示。

15 表 15: PCSK9 突变抗体的异构化水平

样品编号	0 天异构化%	7 天异构化%	14 天异构化%
h001-4YTE	7.54	23.22	35.54
h001-4-YTE D105N	1.07	27.92	31.78
h001-4-YTE D105E	6.23	5.68	7.74
h001-4-YTE D103N	0	0	0

权利要求书：

1. 一种特异性结合 PCSK9 的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段，所述 PCSK9 抗体或其抗原结合片段包含如下的 CDR 区：

- 5 i) HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 的序列分别如 SEQ ID NO: 12、13 和 31 所示；
 ii) LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 的序列分别如 SEQ ID NO: 15、16 和 17 所示；
 其中 SEQ ID NO: 31 所示的 HCDR3 序列为 QYDYX¹EX²WYFDV，其中：
 X¹ 选自 D、E、H、M、N 或 Q；
 X² 选自 D、E、H、M、N 或 Q；
10 但 X¹ 与 X² 不能同时为 D。

2. 根据权利要求 1 所述的特异性结合 PCSK9 的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段，其中所述的 HCDR3 选自 SEQ ID NO: 38-47 中的任一个所示的序列。

- 15 3. 根据权利要求 1 或 2 所述的特异性结合 PCSK9 的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段，其中所述的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段为鼠源抗体、嵌合抗体或人源化抗体或鼠源抗体、嵌合抗体或人源化抗体的抗原结合片段。

- 20 4. 根据权利要求 3 所述的特异性结合 PCSK9 的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段，其中所述 PCSK9 抗体的轻链可变区进一步包含鼠源 κ 链或鼠源 κ 链变体的轻链 FR 区；其中所述 PCSK9 抗体的重链可变区进一步包含鼠源 IgG1 或鼠源 IgG1 变体的重链 FR 区。

- 25 5. 根据权利要求 3 所述的特异性结合 PCSK9 的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段，其中所述 PCSK9 抗体的轻链进一步包含鼠源 κ 链或鼠源 κ 链变体的轻链恒定区；其中所述 PCSK9 抗体的重链进一步包含鼠源 IgG1 或鼠源 IgG1 变体的重链恒定区。

- 30 6. 根据权利要求 3 所述的特异性结合 PCSK9 的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段，其中所述的人源化抗体的重链可变区上的重链 FR 区序列来源于人种系重链 IGHV1-2*02 和 hjh2 的组合序列或其突变序列；所述人源化抗体包含人种系重链 IGHV1-2*02 的 FR1、FR2、FR3 区序列和 hjh2 的 FR4 区序列或人种系重链 IGHV1-2*02 的 FR1、FR2、FR3 区序列和 hjh2 的 FR4 区序列的突变序列。

- 35 7. 根据权利要求 6 所述的特异性结合 PCSK9 的 PCSK9 抗体或其抗原结合

片段，其中所述人源化抗体含有如 SEQ ID NO: 32 所示的重链可变区或其变体，其中所述变体是在 SEQ ID NO: 32 所示的重链可变区上具有 1-10 个氨基酸的插入、缺失或替换。

5 8. 根据权利要求 7 所述的特异性结合 PCSK9 的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段，其中所述变体是在 SEQ ID NO: 32 所示的重链可变区的 FR 区上具有 1-10 个氨基酸的回复突变；优选的，所述回复突变选自 T30N、R87T、R72A、T74K、M48I、V68A、M70L、R38K 和 R67K 的氨基酸回复突变中的一个或多个。

10 9. 根据权利要求 8 所述的特异性结合 PCSK9 的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段，其中所述人源化抗体包含选自 SEQ ID NO: 32-37 中的任一个序列所示的重链可变区。

15 10. 根据权利要求 3 所述的特异性结合 PCSK9 的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段，其中所述的人源化抗体的轻链可变区上的轻链 FR 区序列来源于人种系轻链 IGKV1-39*01 和 hjk2.1 的组合序列或其突变序列；所述的人源化抗体包含人种系轻链 IGKV1-39*01 的 FR1、FR2、FR3 区序列和 hjk2.1 的 FR4 区序列或人种系轻链 IGKV1-39*01 的 FR1、FR2、FR3 区序列和 hjk2.1 的 FR4 区序列的突变序列。

20 11. 根据权利要求 10 所述的特异性结合 PCSK9 的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段，其中所述人源化抗体包含选自 SEQ ID NO: 24-27 中的任一个序列所示的轻链可变区。

25 12. 根据权利要求 3 所述的特异性结合 PCSK9 的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段，其中所述人源化抗体包含重链可变区序列和轻链可变区序列，所述重链可变区序列选自 SEQ ID NO: 32-37 中的任一个所示的序列；所述轻链可变区序列选自 SEQ ID NO: 24-27 中的任一个所示的序列。

30 13. 根据权利要求 3 所述的特异性结合 PCSK9 的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段，其中所述的 PCSK9 抗体包含选自 SEQ ID NO: 48-57 中的任一个序列所示重链可变区和 SEQ ID NO: 24-27 中的任一个序列所示的轻链可变区。

35 14. 根据权利要求 3-13 任一项所述的特异性结合 PCSK9 的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段，其中所述 PCSK9 抗体的重链进一步包含人源 IgG1 或其变体的重

链恒定区，优选包含使用氨基酸突变延长抗体在血清中的半衰期的人源 IgG1 变体的重链恒定区，更优选包含引入 YTE 突变的人源 IgG1 变体的重链恒定区；其中所述 PCSK9 抗体的轻链进一步包含人源 κ 或其变体的轻链恒定区。

5 15. 根据权利要求 14 所述的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段，其中所述人源化抗体包含 SEQ ID NO:28 或 29 所示的重链恒定区和 SEQ ID NO: 30 序列所示的轻链恒定区。

16. 一种药物组合物，其含有治疗有效量的根据权利要求 1 至 15 任一项所述的特异性结合 PCSK9 的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段，以及一种或多种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

17. 一种 DNA 分子，其编码根据权利要求 1-15 任一项所述的特异性结合 PCSK9 的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段。

15

18. 一种表达载体，其含有根据权利要求 17 所述的 DNA 分子。

19. 一种用根据权利要求 18 所述的表达载体转化的宿主细胞，所述宿主细胞选自原核细胞和真核细胞，优选为真核细胞，更优选哺乳动物细胞。

20

20. 如权利要求 1 至 15 任一项所述的特异性结合 PCSK9 的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段、或如权利要求 16 所述的药物组合物治疗 PCSK9 介导的疾病或病症的方法，所述方法包括向个体施用有效量的特异性结合 PCSK9 的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段；其中所述的 PCSK9 介导的疾病或病症优选为胆固醇相关疾病；更优选为高胆固醇血症、心脏病、代谢综合征、糖尿病、冠状动脉心脏病、卒中、心血管疾病、阿尔茨海默病和一般性的异常脂血症；最优选高胆固醇血症、异常脂血症、动脉粥样硬化、CVD 或冠状动脉心脏病。

25

21. 用于生产如权利要求 1 至 15 任一项所述的特异性结合 PCSK9 的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段的方法，所述方法包括将权利要求 19 所述的宿主细胞在培养物中进行培养以形成并积累权利要求 1 至 15 任一项所述的特异性结合 PCSK9 的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段，以及从培养物中回收所积累的所述 PCSK9 抗体或其抗原结合片段。

30

22. 用于免疫检测或测定 PCSK9 的方法，所述方法包括使用权利要求 1 至

35

15 任一项所述的特异性结合 PCSK9 的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段检测 PCSK9 的步骤。

23. 用于检测或测定人 PCSK9 的试剂，所述试剂包含权利要求 1 至 15 任一
- 5 项所述的特异性结合 PCSK9 的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段。

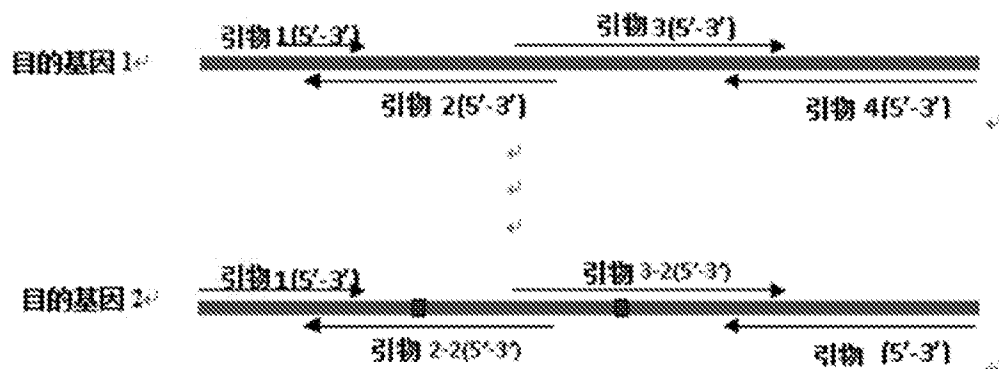


图 1

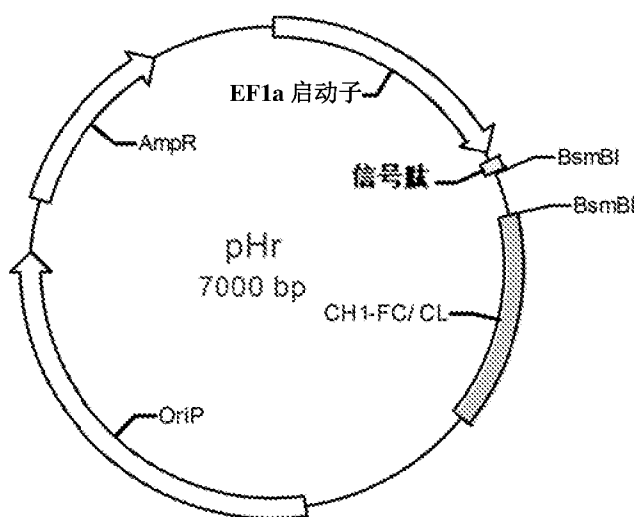


图 2

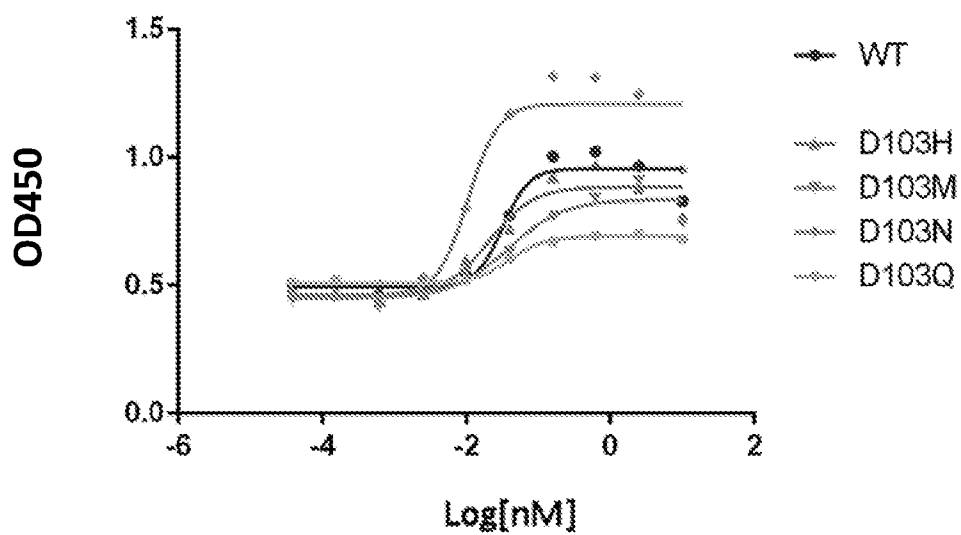


图 3

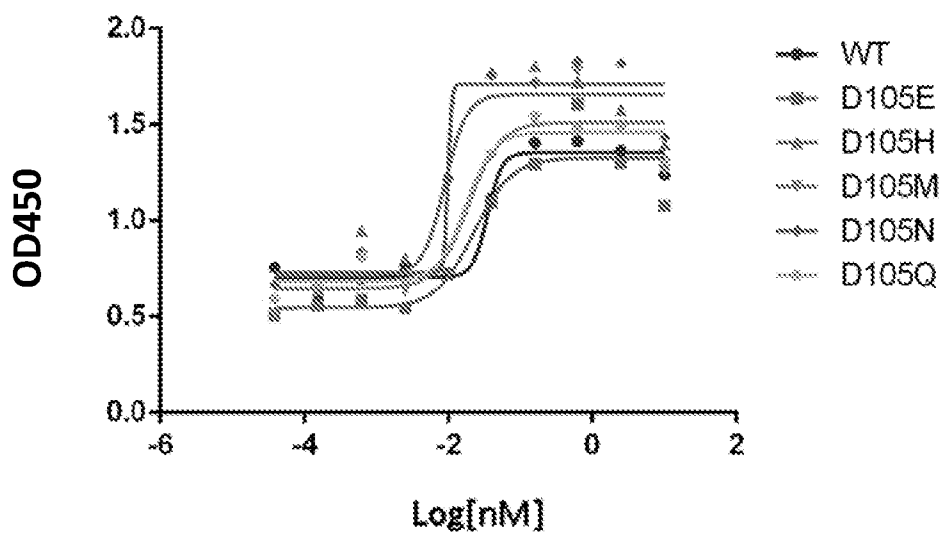


图 4

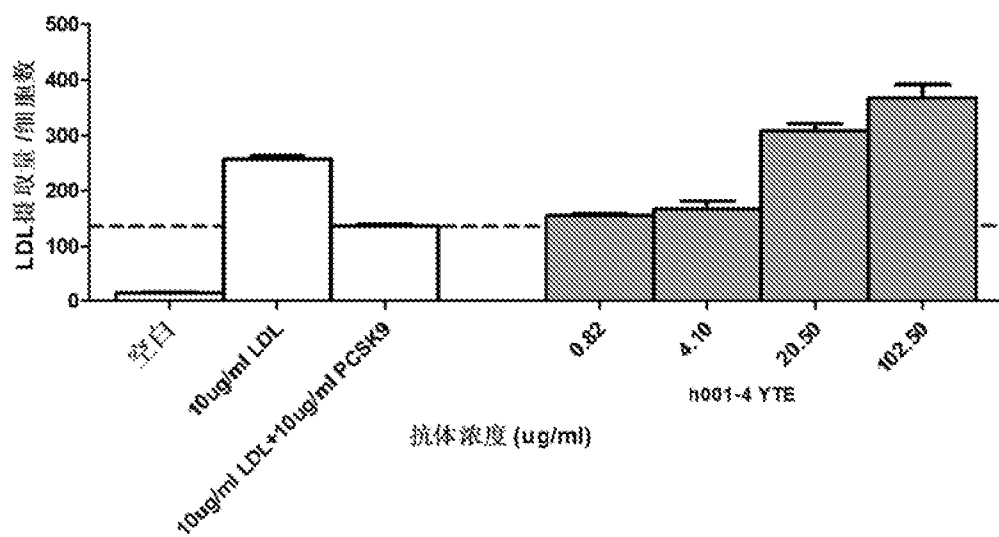


图 5

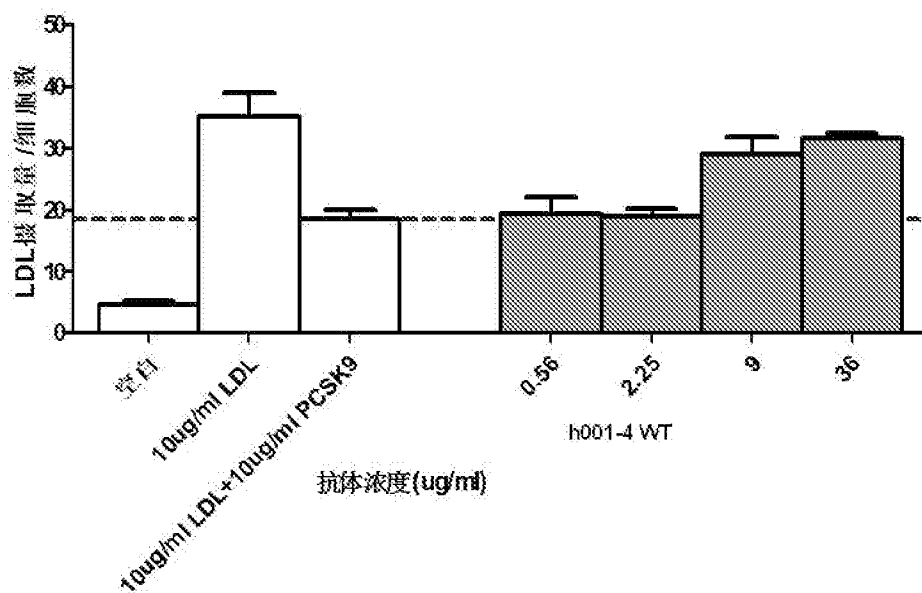


图 6

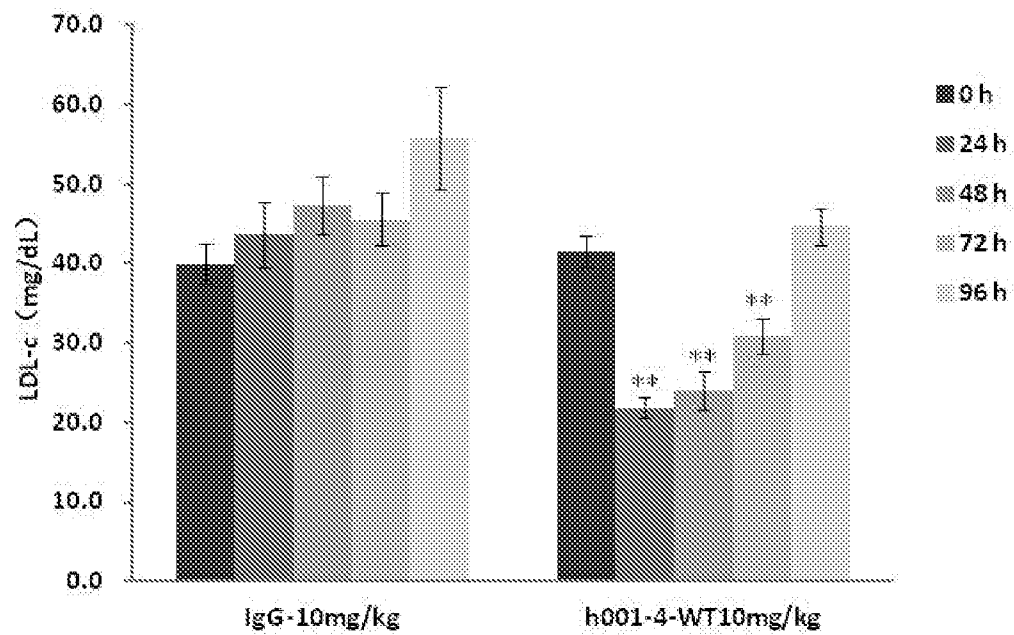


图 7

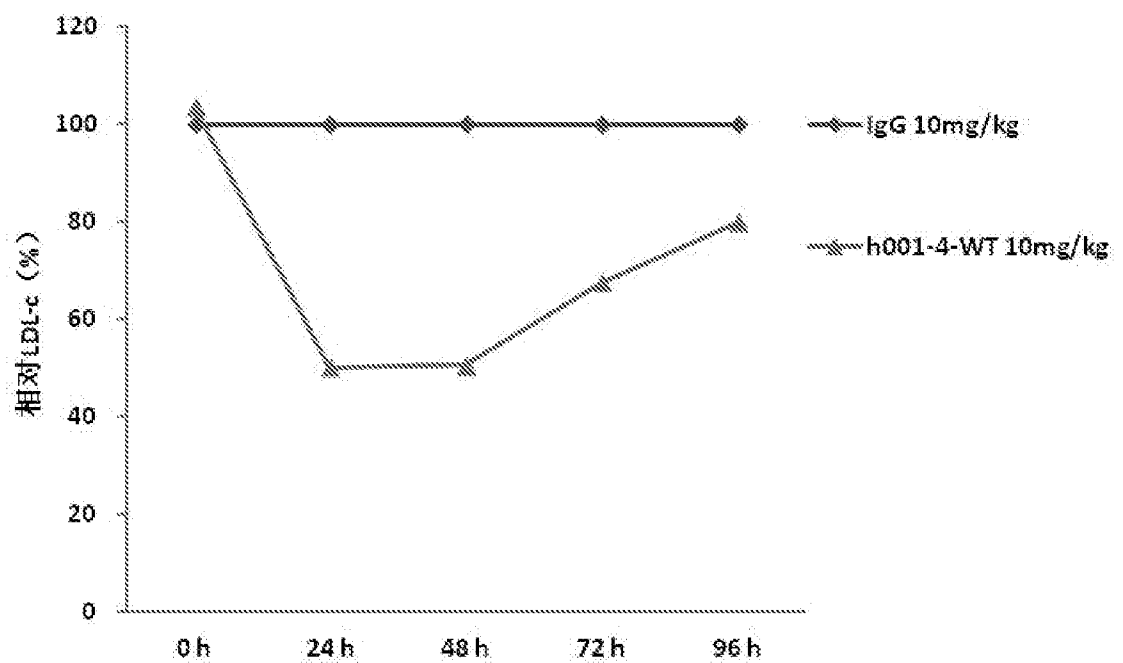


图 8

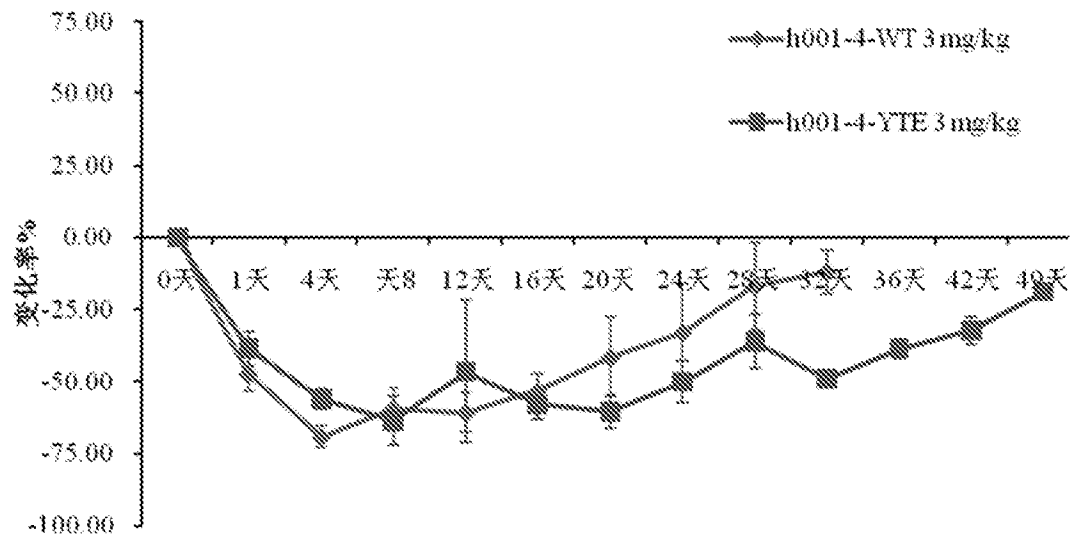


图 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/090972

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/40(2006.01)i; C12N 9/64(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 3/06(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)

CNABS; CNTXT; VEN; USTXT; WOTXT; EPTXT; CNKI; ISI WEB OF SCIENCE; GENBANK; EMBL; STN; NATIONAL BIO-SEQUENCE DATABASE OF CHINESE PATENT: 江苏恒瑞医药股份有限公司, 上海恒瑞医药有限公司, 叶鑫, 孙乐, 胡齐悦, 陶维康, 张连山, PCSK9, 前蛋白转化酶枯草溶菌素9, 抗体, 抗原, 结合片段, 表达载体, 序列, 胆固醇, 血脂, 轻链, 重链, 突变体, 亲和力, 化学稳定性, 生物活性, 选择性, PCSK9, proprotein convertase subtilisin. kexin type 9, antibody, light chain, heavy chain, HC, LC, CDR, LDL, SEQ ID Nos: 10-57

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 106554420 A (SHANGHAI UNION BIOPHARM CO., LTD.) 05 April 2017 (2017-04-05) entire document	1-23
A	CN 106589127 A (JUCHUAN BIOPHARMACEUTICAL) 26 April 2017 (2017-04-26) entire document	1-23
A	CN 106810609 A (JUNMENG BIOSCIENCES CO., LTD.) 09 June 2017 (2017-06-09) entire document	1-23
A	CN 106749670 A (BEIJING ORIENTAL 100 TAI BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 31 May 2017 (2017-05-31) entire document	1-23
A	WO 2017088782 A1 (JUNM-N JUNMENG BIOSCIENCES CO., LTD. ET AL.) 01 June 2017 (2017-06-01) entire document	1-23

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

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 August 2018

Date of mailing of the international search report

24 August 2018

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

Telephone No.

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

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

1. ☒ Claims Nos.: **20**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
 - [1] The subject matter of claim 20 is a method for treating a PCSK9 mediated disease or disorder. The method relates to a method for treatment a living human or animal body, which falls within the subject matter set out in PCT Rule 39.1(iv), for which an international search is not required. The amendment reasonably expected with respect to claim 20 is:
 - [2] a PCSK9 antibody or an antigen-binding fragment thereof specifically binding to PCSK9 as claimed in any one of claims 1-15, and the use of a pharmaceutical composition in the preparation of medications for treating a PCSK9 mediated disease or disorder as claimed in claim 16, wherein the PCSK9 mediated disease or disorder is preferably chosen from cholesterol-related diseases, more preferably hypercholesteremia, cardiopathy, metabolic syndrome, diabetes, coronary heart disease, apoplexy, angiocardopathy, Alzheimer disease and general dyslipidemia, and most preferably hypercholesteremia, dyslipidemia, atherosclerosis, CVD or coronary heart diseases.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2018/090972

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	106554420	A	05 April 2017	None			
CN	106589127	A	26 April 2017	WO	2017063593	A1	20 April 2017
CN	106810609	A	09 June 2017	None			
CN	106749670	A	31 May 2017	CN	106749670	B	12 June 2018
WO	2017088782	A1	01 June 2017	HK	1235065	A0	02 March 2018

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2018/090972

A. 主题的分类 C07K 16/40(2006.01)i; C12N 9/64(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 3/06(2006.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) C07K; C12N; A61K; A61P 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNABS;CNTXT;VEN;USTXT;WOTXT;EPTXT;CNKI;ISI Web of Science; GenBank;EMBL;STN;中国专利生物序列检索系统: 江苏恒瑞医药股份有限公司, 上海恒瑞医药有限公司, 叶鑫, 孙乐, 胡齐悦, 陶维康, 张连山, PCSK9, 前蛋白转化酶枯草溶菌素9, 抗体, 抗原, 结合片段, 表达载体, 序列, 胆固醇, 血脂, 轻链, 重链, 突变体, 亲和力, 化学稳定性, 生物活性, 选择性, PCSK9, proprotein convertase subtilisin.kexin type 9, antibody, light chain, heavy chain, HC, LC, CDR, LDL, SEQ ID NOs: 10-57		
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 106554420 A (上海众合医药科技股份有限公司) 2017年 4月 5日 (2017 - 04 - 05) 全文	1-23
A	CN 106589127 A (钜川生物医药) 2017年 4月 26日 (2017 - 04 - 26) 全文	1-23
A	CN 106810609 A (苏州君盟生物医药科技有限公司) 2017年 6月 9日 (2017 - 06 - 09) 全文	1-23
A	CN 106749670 A (北京东方百泰生物科技有限公司) 2017年 5月 31日 (2017 - 05 - 31) 全文	1-23
A	WO 2017088782 A1 (JUNM-N JUNMENG BIOSCIENCES CO LTD 等) 2017年 6月 1日 (2017 - 06 - 01) 全文	1-23
☐ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期		国际检索报告邮寄日期
2018年 8月 10日		2018年 8月 24日
ISA/CN的名称和邮寄地址		受权官员
中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		徐寅 电话号码 (86-512)88996475

第II栏

某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☒ 权利要求： 20
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] 权利要求20的主题是治疗PCSK9介导的疾病或病症的方法，该方法涉及对有生命的人体或动物体的治疗方法，属于PCT细则39.1定义的不要求国际检索单位检索的主题。针对权利要求20合理预期的修改如下：
[2] 如权利要求1至15任一项所述的特异性结合PCSK9的PCSK9抗体或其抗原结合片段、或如权利要求16所述的药物组合物在制备治疗PCSK9介导的疾病或病症的药物中的应用，其中所述的PCSK9介导的疾病或病症优选为胆固醇相关疾病；更优选为高胆固醇血症、心脏病、代谢综合征、糖尿病、冠状动脉心脏病、卒中、心血管疾病、阿尔茨海默病和一般性的异常脂血症；最优选高胆固醇血症、异常脂血症、动脉粥样硬化、CVD或冠状动脉心脏病。
2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：
3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2018/090972

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	106554420	A	2017年 4月 5日	无			
CN	106589127	A	2017年 4月 26日	WO	2017063593	A1	2017年 4月 20日
CN	106810609	A	2017年 6月 9日	无			
CN	106749670	A	2017年 5月 31日	CN	106749670	B	2018年 6月 12日
WO	2017088782	A1	2017年 6月 1日	HK	1235065	A0	2018年 3月 2日