

(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2019-518472

(P2019-518472A)

(43) 公表日 令和1年7月4日(2019.7.4)

(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 5
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63 Z	4 C 0 8 5
C O 7 K 16/40 (2006.01)	C O 7 K 16/40	4 H 0 4 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 32 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2019-503615 (P2019-503615)	(71) 出願人	518354242
(86) (22) 出願日	平成29年4月7日 (2017.4.7)		▲邁▼博斯 (香港) 科技有限公司
(85) 翻訳文提出日	平成30年11月27日 (2018.11.27)		中華人民共和國999077香港特別行政
(86) 国際出願番号	PCT/CN2017/079655		区金鐘紅棉路8号東昌大廈402室
(87) 国際公開番号	W02017/174017	(74) 代理人	110001070
(87) 国際公開日	平成29年10月12日 (2017.10.12)		特許業務法人 S S I N P A T
(31) 優先権主張番号	201610213460.1	(72) 発明者	王少雄
(32) 優先日	平成28年4月7日 (2016.4.7)		中華人民共和國999077香港特別行政
(33) 優先権主張国	中国 (CN)		区金鐘紅棉路8号東昌大廈402室
		Fターム (参考)	4B065 AA01X AA57X AA72X AA90X AB01 BA02 CA25 CA44 CA46 4C085 AA14 CC23 DD62 EE01 GG01 4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 BA70 DA76 EA20 EA50 FA72 FA74 GA26
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 プロタンパク質転換酵素サブチリシンケキシン9型の結合タンパク質及びその使用

(57) 【要約】

本発明は、プロタンパク質転換酵素サブチリシンケキシン9型の結合タンパク質及びその使用に関する。本発明は、独特な相補性決定領域を含有するプロタンパク質転換酵素サブチリシンケキシン9型 (P C S K 9) に特異的に結合する結合タンパク質を提供し、この結合タンパク質はP C S K 9 に特異的に結合し、かつP C S K 9 の機能を効果的に抑制して、血漿中のL D L コレステロールレベルを低減させることができ、P C S K 9 の機能に関連する疾患又はP C S K 9 の機能に影響される疾患の治療に使用される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

結合タンパク質が軽鎖可変領域及び重鎖可変領域を有し、かつ、
前記重鎖可変領域の C D R 1 のアミノ酸配列が、S E Q I D N O : 7 で示されるア
ミノ酸配列のようであり；

前記重鎖可変領域の C D R 2 のアミノ酸配列が、S E Q I D N O : 8 で示されるも
ののようであり；

前記重鎖可変領域の C D R 3 のアミノ酸配列が、S E Q I D N O : 9 又は S E Q
I D N O : 1 3 で示されるアミノ酸配列のようであり；

前記軽鎖可変領域の C D R 1 のアミノ酸配列が、S E Q I D N O : 1 0 で示される 10
もののようであり；

前記軽鎖可変領域の C D R 2 のアミノ酸配列が、S E Q I D N O : 1 1 で示される
もののようであり；

前記軽鎖可変領域の C D R 3 のアミノ酸配列が、S E Q I D N O : 1 2 で示される
もののようである、

ことを特徴とする P C S K 9 に特異的に結合する結合タンパク質。

【請求項 2】

(a) 重鎖可変領域の C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 のアミノ酸配列が、それぞれ
S E Q I D N O : 7、S E Q I D N O : 8、S E Q I D N O : 9 で示される
もののようであり；軽鎖可変領域の C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 のアミノ酸配列が、 20
それぞれ S E Q I D N O : 1 0、S E Q I D N O : 1 1、S E Q I D N O :
1 2 で示されるもののようであり；或いは

(b) 重鎖可変領域の C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 のアミノ酸配列が、それぞれ
S E Q I D N O : 7、S E Q I D N O : 8、S E Q I D N O : 1 3 で示され
るもののようであり；軽鎖可変領域の C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 のアミノ酸配列が
、S E Q I D N O : 1 0、S E Q I D N O : 1 1、S E Q I D N O : 1 2 で
示されるもののようである、ことを特徴とする請求項 1 に記載の P C S K 9 に特異的に結
合する結合タンパク質。

【請求項 3】

重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のアミノ酸配列が、S E Q I D N O : 2 及び S E Q 30
I D N O : 4 で示されるもののようであり；或いは

重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のアミノ酸配列が、S E Q I D N O : 6 及び S E Q
I D N O : 4 で示されるもののようであり；或いは

重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のアミノ酸配列が、S E Q I D N O : 2 2 及び S E
Q I D N O : 2 4 で示されるもののようであり；或いは

重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のアミノ酸配列が、S E Q I D N O : 2 6 及び S E
Q I D N O : 2 4 で示されるもののようである、ことを特徴とする請求項 1 又は 2 に
記載の P C S K 9 に特異的に結合する結合タンパク質。

【請求項 4】

請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の P C S K 9 に特異的に結合する結合タンパク質を 40
コードした核酸。

【請求項 5】

請求項 4 に記載の核酸を含む発現ベクター。

【請求項 6】

請求項 5 に記載の発現ベクターを含む宿主細胞、又は、ゲノムに請求項 4 に記載の核酸
が組み込まれた宿主細胞。

【請求項 7】

P C S K 9 の発現又は活性障害に関連する疾患の診断、治療及び / 又は予防のための医
薬の製造における請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の P C S K 9 に特異的に結合する結
合タンパク質の使用。

【請求項 8】

前記 P C S K 9 の発現又は活性障害に関連する疾患が、高血清コレステロールレベルに関連する疾患を含む、請求項 7 に記載の使用。

【請求項 9】

前記疾患が、高コレステロール血症、冠動脈心疾患、メタボリックシンドローム、急性冠動脈症候群を含む、請求項 8 に記載の使用。

【請求項 10】

有効量の請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の P C S K 9 に特異的に結合する結合タンパク質、及び薬学的に許容される担体を含むことを特徴とする医薬組成物。

【請求項 11】

請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の P C S K 9 に特異的に結合する結合タンパク質、又は、請求項 10 に記載の医薬組成物を含むことを特徴とする P C S K 9 の発現又は活性障害に関連する疾患の治療及び / 又は予防のためのキット。

【請求項 12】

請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の P C S K 9 に特異的に結合する結合タンパク質、及び検出可能な標識体を含むことを特徴とする免疫抱合体。

【請求項 13】

前記検出可能な標識体が、蛍光標識体、発色標識体を含むことを特徴とする請求項 12 に記載の免疫抱合体。

【請求項 14】

請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の P C S K 9 に特異的に結合する結合タンパク質、又は請求項 12 に記載の免疫抱合体を含むことを特徴とする P C S K 9 レベルの検出のための検出キット。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は免疫学分野に属し、具体的に、プロタンパク質転換酵素サブチリシンケキシン 9 型 (P r o p r o t e i n c o n v e r t a s e s u b t i l i s i n k e x i n t y p e 9 , P C S K 9) の結合タンパク質及びその使用に関するものである。

【背景技術】**【0002】**

心血管疾患は、人類の死亡を引き起こす第一の原因である。低密度リボタンパク質コレステロール (L o w - d e n s i t y l i p o p r o t e i n c h o l e s t e r o l , L D L - C) は、心血管疾患を引き起こす主要な原因であると既に証明されていた。L D L - C のこのような作用は、比較的独立し、効果的に制御されることが可能である。過去 20 年間で、スタチン系 (s t a t i n s) の脂質低下薬の使用は、心血管疾患の発病率の低減に成功した。

【0003】

しかし、スタチン系の薬物による治療方法は、必ずしも効果的ではなく、さらに他の脂質低下療法が要求されている。患者の一部、特に家族性高コレステロール血症 (f a m i l i a l h y p e r c h o l e s t e r o l a e m i a F H) の患者は、しばしばスタチン系の薬物に非常に鈍感である。たとえ最高用量のスタチン系薬物を使用しても、これらの患者は、比較的に低レベルの L D L - C を達成するのが困難である。また、スタチン系薬物には、筋肉痛及び横紋筋融解などの副作用があり、患者の一部は、スタチン系薬物を使用できなく、或いは非常に少量のスタチン系薬物を使用して血中脂質レベルを制御する。プロタンパク質転換酵素サブチリシンケキシン 9 型 (P C S K 9) 阻害剤は、まさにそのような新しいタイプの薬物であり、血液中の L D L - C 濃度を制御するための新しい選択を提供する。

【0004】

P C S K 9 は、セリンプロテアーゼであり、低密度リボタンパク質受容体 (L o w - d

10

20

30

40

50

ensity lipoprotein receptor, LDLR) のレベルの調節に
関与する。インビトロ実験は、HepG2細胞へのPCSK9の添加後に細胞表面上のLDLRのレベルが低減することを確認した。マウス実験によれば、PCSK9タンパク質のレベルの増加は、肝臓におけるLDLRのタンパク質のレベルを低下させることができると共に、LDLRのレベルは、正常マウスと比較してPCSK9ノックアウトマウスにおいて上昇することを示した。PCSK9は、LDLRに直接結合し、LDLRと共に貪食され、エンドサイトーシス経路全体にわたってPCSK9とLDLRが同時に免疫発光することが示されている。現在、PCSK9による細胞外LDLRの分解についての直接的な証拠がなく、PCSK9により細胞外LDLRタンパク質のレベルを低下させるメカニズムがまだ不明である。

10

【0005】

研究により、PCSK9がLDLの産生の調節において役割を果たすことが確認されている。PCSK9の発現またはアップレギュレーションは、増加したLDLコレステロールの血漿レベルに関連し、PCSK9発現の阻害または欠如は、LDLコレステロールの血漿レベルの低下に関連する。

【0006】

従って、PCSK9の活性及びPCSK9の様々な治療状況において発揮する相応作用を阻害し又は拮抗する、治療に基づくPCSK9拮抗剤、特にPCSK9に特異的に結合するモノクローナル抗体の製造は、非常に重要である。現在、研究されているPCSK9阻害剤は、概して低分子干渉RNA (small interfering RNA, siRNA)、アンチセンスオリゴヌクレオチド (antisense oligonucleotides, ASOs)、モノクローナル抗体、及び新しい技術によって産生された特異的結合する融合タンパク質 (例えば、adnectin技術によって産生された融合タンパク質) を含む。現在、研究されているPCSK9阻害剤は、主にsiRNA系薬物であるRG7652 (Alnylam Pharmaceuticals / The Medicines Company)、Adnectin技術による融合タンパク質であるBMS-962476 (BMS)、ASO系薬物であるALN-PCS02 (Idera Pharmaceuticals)、及び、Bococizumab (Pfizer / Rinat)、LGT-209 (Novartis) などのような抗体系薬物がある。

20

30

【0007】

しかし、動物試験または臨床研究により、いくつかのPCSK9モノクローナル抗体系阻害剤には、特異性、親和性が十分に優れていなく、または副作用があるとの問題が存在することが分かった。よって、当分野において、さらに最適化された新しいPCSK9抗体を製造する必要がある。

【発明の概要】

【0008】

本発明の目的は、プロタンパク質転換酵素サブチリシンケキシン9型 (PCSK9) の結合タンパク質及びその使用を提供することにある。

本発明の第一の態様は、PCSK9に特異的に結合する結合タンパク質を提供し、当該結合タンパク質が軽鎖可変領域及び重鎖可変領域を有し、かつ、

40

前記重鎖可変領域のCDR1のアミノ酸配列が、SEQ ID NO: 7で示されるアミノ酸配列のようであり；

前記重鎖可変領域のCDR2のアミノ酸配列が、SEQ ID NO: 8で示されるもののようであり；

前記重鎖可変領域のCDR3のアミノ酸配列が、SEQ ID NO: 9又はSEQ ID NO: 13で示されるアミノ酸配列のようであり；

前記軽鎖可変領域のCDR1のアミノ酸配列が、SEQ ID NO: 10で示されるもののようであり；

前記軽鎖可変領域のCDR2のアミノ酸配列が、SEQ ID NO: 11で示される

50

もののようであり；

前記軽鎖可変領域のCDR3のアミノ酸配列が、SEQ ID NO：12で示されるもののようである。

【0009】

本発明の一つの好ましい態様において、前記PCSK9に特異的に結合する結合タンパク質は、以下のものから選ばれ、

(a) 重鎖可変領域のCDR1、CDR2及びCDR3のアミノ酸配列が、それぞれSEQ ID NO：7、SEQ ID NO：8、SEQ ID NO：9で示されるもののようであり；軽鎖可変領域のCDR1、CDR2及びCDR3のアミノ酸配列が、それぞれSEQ ID NO：10、SEQ ID NO：11、SEQ ID NO：12で示されるもののようであり；或いは

(b) 重鎖可変領域のCDR1、CDR2及びCDR3のアミノ酸配列が、それぞれSEQ ID NO：7、SEQ ID NO：8、SEQ ID NO：13で示されるもののようであり；軽鎖可変領域のCDR1、CDR2及びCDR3のアミノ酸配列が、SEQ ID NO：10、SEQ ID NO：11、SEQ ID NO：12で示されるもののようである。

【0010】

もう一つの好ましい態様において、前記PCSK9に特異的に結合する結合タンパク質は、その重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のアミノ酸配列が、SEQ ID NO：2及びSEQ ID NO：4で示されるもののようであり；或いはその重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のアミノ酸配列が、SEQ ID NO：6及びSEQ ID NO：8で示されるもののようである。

【0011】

もう一つの好ましい態様において、前記結合タンパク質は、Fab、F(ab')、F(ab')₂、Fv、dAb、Fd、相補性決定領域(CDR)断片、一本鎖抗体(scFv)、二価一本鎖抗体、一本鎖ファージ抗体、二重特異性二本鎖抗体、三本鎖抗体、四本鎖抗体である。

【0012】

もう一つの好ましい態様において、前記結合タンパク質は、モノクローナル抗体である。

もう一つの好ましい態様において、前記結合タンパク質は、その重鎖可変領域及び軽鎖可変領域がそれぞれSEQ ID NO：2(リーダーペプチドを含む)及びSEQ ID NO：4(リーダーペプチドを含む)で示されるアミノ酸配列を有し、或いは、それぞれSEQ ID NO：6(リーダーペプチドを含む)及びSEQ ID NO：4で示されるアミノ酸配列を有し、或いは、その重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のアミノ酸配列がSEQ ID NO：22(リーダーペプチドを含まない)及びSEQ ID NO：24(リーダーペプチドを含まない)で示されるもののようであり、或いは、その重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のアミノ酸配列がSEQ ID NO：26及びSEQ ID NO：24で示されるもののようである。

【0013】

前記結合タンパク質は、その重鎖定常領域がIgG1、IgG2a、IgG2b及びIgG3からなる重鎖タイプの1種の定常領域から選ばられ、その軽鎖定常領域がκ鎖及びλ鎖からなる軽鎖タイプの1種の定常領域から選ばれる。

【0014】

本発明のもう一つの態様は、前記PCSK9に特異的に結合する結合タンパク質をコードした核酸を提供する。

本発明のもう一つの態様は、前記核酸を含む発現ベクターを提供する。

【0015】

本発明のもう一つの態様は、前記発現ベクターを含む宿主細胞、又は、ゲノムに前記核酸が組み込まれた宿主細胞を提供する。

本発明のもう一つの態様は、PCSK9の発現又は活性障害に関連する疾患の診断、治療及び／又は予防のための医薬の製造における前記PCSK9に特異的に結合する結合タンパク質の使用を提供する。

【0016】

好ましい態様において、前記PCSK9の発現又は活性障害に関連する疾患は、高血清コレステロールレベルに関連する疾患を含み、好ましくは、高コレステロール血症、冠動脈心疾患、メタボリックシンドローム、急性冠動脈症候群を含むが、これらに限定されない。

【0017】

本発明のもう一つの態様は、有効量の前記PCSK9に特異的に結合する結合タンパク質、及び薬学的に許容される担体を含む医薬組成物を提供する。

本発明のもう一つの態様は、前記PCSK9に特異的に結合する結合タンパク質、又は、前記医薬組成物を含むPCSK9の発現又は活性障害に関連する疾患の治療及び／又は予防のためのキットを提供する。

【0018】

本発明のもう一つの態様は、前記PCSK9に特異的に結合する結合タンパク質、及び検出可能な標識体を含む免疫複合体を提供し、好ましくは、前記検出可能な標識体が蛍光標識体、発色標識体を含む。

【0019】

本発明のもう一つの態様は、前記PCSK9に特異的に結合する結合タンパク質、又は前記免疫複合体を含むPCSK9レベルの検出のための検出キットを提供する。

本発明の他の態様は、本文の公開内容により、当業者にとって自明なものである。

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1A】モノクローナル抗体B9287、B9288がそれぞれに、ヒトPCSK9抗原に対する動力学解析結果を示す。

【図1B】モノクローナル抗体B9287、B9288がそれぞれに、カニクイザルPCSK9抗原に対する動力学解析結果を示す。

【図1C】モノクローナル抗体B9287、B9288がそれぞれに、マウスPCSK9抗原に対する動力学解析結果を示す。

【図2】本発明の抗原結合タンパク質が細胞のLDL吸収を低下させる能力の測定を示す。

【図3】抗PCSK9好適抗体が高脂血症赤毛猿の血清LDLレベルに対する反応を示す。1群毎に7歳以上の雄及び雌のアカゲザルをそれぞれに4頭有し、第0日にて示された用量の抗PCSK9好適抗体又は同等体積の食塩水キャリアーを皮下注射によって投与する。示された時点で血漿サンプルを採取して、血漿LDL量を第0日の血清LDL量と比較する。

【発明を実施するための形態】

【0021】

本発明者は、広範かつ詳細な研究を行ったところ、独特な相補性決定領域(CDR領域)を含有するプロタンパク質転換酵素サブチリシンケキシン9型(Proprotein convertase subtilisin kexin type 9, PCSK9)に特異的に結合する結合タンパク質を得て、これはPCSK9に特異的に結合し、かつPCSK9の機能を効果的に抑制して、血漿中のLDLコレステロールレベルを低減させることができ、PCSK9の機能に関連する疾患又はPCSK9の機能に影響される疾患の治療に使用される。

【0022】

< 結合タンパク質 >

本発明は、PCSK9に特異的に結合することができる結合タンパク質を提供する。本発明の結合タンパク質は、完全な免疫グロブリン分子であってもよく、抗原結合断片であ

10

20

30

40

50

ってもよく、F a b断片、F d断片、F v断片、F (a b ')₂断片、相補性決定領域 (C D R)断片、一本鎖抗体 (s c F v)、ドメイン抗体、二価一本鎖抗体、一本鎖ファージ抗体、二重特異性二本鎖抗体、三本鎖抗体、四本鎖抗体などを含むが、これらに限定されない。

【 0 0 2 3 】

C D R領域は、免疫学において関心のあるタンパク質の配列である。本発明の実施形態において、結合タンパク質は本明細書に開示された2つ、3つ、4つ、5つ又は全6つのC D R領域を含むことができる。好ましくは、本発明の結合タンパク質は、本明細書に開示された少なくとも2つのC D R領域を含む。

【 0 0 2 4 】

本発明のもう一つの態様は、本明細書に記載の結合タンパク質の機能的変異体を含む。変異体は、親結合タンパク質と競合して、P C S K 9に特異的に結合することができれば、当該変異体が本発明の結合タンパク質の機能的変異体であると考えられる。言い換えれば、前記機能的変異体は、依然としてP C S K 9又はその断片に結合することができる。機能的変異体は、一級構造配列が基本的に類似しているが、例えば親結合タンパク質において発現されていないインピトロまたはインピボでの化学的および/または生化学的に修飾された誘導体を含むが、これらに限定されない。このような修飾には、アセチル化、アシル化、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質または脂質誘導体の共有結合、架橋、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、ヒドロキシル化、メチル化、酸化、P E G化、タンパク質分解プロセッシング、リン酸化などが挙げられる。言い換えれば、親結合タンパク質のアミノ酸および/またはヌクレオチド配列における修飾は、前記ヌクレオチド配列によってコードされているか、または前記アミノ酸配列を含む前記結合タンパク質の結合特性に有意に影響しないか、またはそれを変更しなく、つまり、前記結合タンパク質は依然としてその標的部位を認識して結合することができる。

【 0 0 2 5 】

前記機能的変異体は、ヌクレオチドおよびアミノ酸の置換、付加および欠失を含む保存的配列修飾を有してもよい。これらの修飾は、当分野で知られている標準技術、例えば、部位特異的変異誘発およびP C R介在突然変異誘発により導入することができ、かつ天然および非天然ヌクレオチドおよびアミノ酸を含むことができる。

【 0 0 2 6 】

保存的アミノ酸置換は、アミノ酸残基が同様の構造又は化学性質を有する別のアミノ酸残基に置換されることを含む。似ている側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当該分野で既に定義されている。これらのファミリーは、塩基性側鎖アミノ酸 (例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性側鎖アミノ酸 (例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸)、非荷電極性側鎖アミノ酸 (例えば、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン)、非極性側鎖アミノ酸 (例えば、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン)、分岐側鎖アミノ酸 (例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン) および芳香族性側鎖アミノ酸 (例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン) を含む。当業者であれば、上記ファミリー以外の他のアミノ酸残基のファミリー分類方式も使用できることを理解する。また、変異体は、非保存的アミノ酸置換を有することができ、例えば、アミノ酸が、異なる構造又は化学性質を有する他のアミノ酸残基によって置換される。類似している小さな変異は、アミノ酸の欠失又は挿入、又はその両方を含むことができる。免疫学的活性を排除することなく、どのアミノ酸残基が置換、挿入または欠失され得るかを決定するためのガイダンスは、当分野で周知のコンピュータプログラムを用いて見出すことができる。

【 0 0 2 7 】

機能的変異体は、アミノ酸配列がアミノ末端またはカルボキシ末端、またはその両方の端部にあるランケート体を含むことができる。本発明の機能的変異体は、親結合タンパク質と同じかまたは異なる、より高いまたはより低い結合親和性を有し得るが、依然とし

10

20

30

40

50

て P C S K 9 またはその断片に結合することができる。例えば、本発明の機能的変異体は、親結合タンパク質と比較して、P C S K 9 またはその断片に対する結合親和性の増加または減少（好ましくは増加）を有することができる。好ましくは、フレームワーク領域、超可変領域または C D R 領域を含むが、これに限定されない可変領域のアミノ酸配列は修飾される。通常、軽鎖および重鎖可変領域は、3つの C D R を含む3つの超可変領域、およびより保存されている領域、いわゆるフレームワーク領域（F R）を含む。超可変領域は、C D R 由来のアミノ酸残基及び超可変ループ由来のアミノ酸残基を含む。本発明の範囲内の機能的変異体は、本明細書に記載の親結合タンパク質の少なくとも約 50%～約 99%、好ましくは少なくとも約 60%～約 99%、より好ましくは少なくとも約 70%～約 99%、さらにより好ましくは少なくとも約 80%～約 99%、最も好ましくは少なくとも約 90%～約 99%、特に少なくとも約 95%～約 99%、特に少なくとも約 97%～約 99% のアミノ酸配列相同性を有する。G a p または B e s t f i t のような当業者に公知のコンピュータアルゴリズムは、比較のためにアミノ酸配列を最適に配列すること、及び類似または同一のアミノ酸残基を同定することに用いられる。機能的変異体は、当業者に公知の一般的な分子生物学的方法により親分子結合タンパク質またはその一部を改変することによって得ることができ、前記方法は、エラープロード P C R、オリゴヌクレオチド特異的変異誘発、部位特異的変異誘発、重鎖および/または軽鎖シャッフリング法を含むが、これらに限定されない。

10

【0028】

本発明の好ましい態様として、前記結合タンパク質はモノクローナル抗体である。抗体の抗原結合特性は、相補性決定領域（C D R）と称される重鎖および軽鎖可変領域に位置する3つの特異的領域によって記述することができ、前記 C D R 領域は可変領域を4つのフレームワーク領域（F R）に分割しており、4つの F R のアミノ酸配列は比較的保存的であり、結合反応に直接関与しない。これらの C D R は、環状構造を形成し、その間の F R によって形成されたβシートが空間的に互いに近接し、重鎖上の C D R および対応する軽鎖上の C D R が抗体の抗原結合部位を構成する。本発明の抗 P C S K 9 モノクローナル抗体の C D R 領域は新規であり、既存の抗 P C S K 9 抗体とは異なる。

20

【0029】

本発明のモノクローナル抗体は、全部がヒト由来であり、免疫原性が低く、安全性が高いという特徴を有する。

30

本発明のもう一つの態様は、少なくとも1種の結合タンパク質、その機能的変異体または免疫複合体をコードした核酸分子を提供する。そのような核酸分子は、例えば、上記のような親和性成熟方法において、クローニングのための中間体として使用することができる。好ましい一実施態様において、前記核酸分子は単離または精製されたものである。D N A 分子の配列は、通常の技術を用いて、またはハイブリドーマ技術を用いて得ることができる。

【0030】

一旦関連配列が得られると、組換え法によって関連配列を大量に得ることができる。これは、通常、上記関連配列をベクターにクローニングし、それを細胞に移し、次いで、通常の方法によって増殖した宿主細胞から関連配列を単離することによって行われる。

40

【0031】

さらに、人工合成の方法により関係配列を合成し、特に断片長さが短い場合に、関連配列を合成することができる。通常、最初に複数の小さな断片を合成し、そしてそれらを連結することによって配列が長い断片を得ることができる。

【0032】

現在、本発明の結合タンパク質（またはその断片、またはその誘導体）をコードする D N A 配列は、化学合成によって完全に得ることができる。その後、当該 D N A 配列を、当分野で公知の様々な既存の D N A 分子（またはベクター）および細胞に導入することができる。さらに、化学合成によって本発明の結合タンパク質の配列に突然変異を導入することもできる。

50

【 0 0 3 3 】

さらに、本発明は、上記の適切なDNA配列、及び適切なプロモーターまたは制御配列を含むベクターにも関する。これらのベクターは、タンパク質を発現できるように適切な宿主細胞を形質転換することに使用され得る。好ましくは、本発明のベクターは、例えば、ウイルスプロモーターを含むプラスミド発現ベクターであり、かつ前記発現ベクターに抗PCSK9モノクローナル抗体重鎖可変領域(VH)と定常領域IgG2(ヒトIgG2由来の定常領域)の融合配列、および軽鎖可変領域とヒトIgLambda(ヒトIgLambda由来の定常領域)の融合配列をそれぞれ挿入した。

【 0 0 3 4 】

宿主細胞は、細菌細胞などの原核細胞、または酵母細胞などの下等真核細胞、または哺乳動物細胞などの高等真核細胞であってもいい。代表的な例は、大腸菌、ストレプトマイセス属(*Streptomyces*)などの細菌細胞；サルモネラティフィウム；酵母などの真菌細胞；植物細胞；ショウジョウバエS2またはSf9などの昆虫細胞；CHO、COS7、NSOまたはBowesメラノーマ細胞などの動物細胞などがある。本発明に特に適用する宿主細胞は、真核宿主細胞、特にCHO細胞、293細胞などの哺乳動物細胞である。

10

【 0 0 3 5 】

必要であれば、組換え結合タンパク質は、その物理的、化学的および他の特性を利用する様々な分離方法によって単離および精製することができる。これらの方法は、当業者にとって周知である。このような方法の例としては、通常のリフォールディング処理、タンパク質沈殿剤による処理(塩析法)、遠心分離、浸透滅菌、超音波処理、超遠心分離、モレキュラーシーブクロマトグラフィー(ゲル濾過)、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)および様々な他の液体クロマトグラフィー技術およびこれらの方法の組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。

20

【 0 0 3 6 】

< 医薬組成物 >

本発明の結合分子は、PCSK9の発現または活性障害に関連する疾患の診断、治療および/または予防のための医薬組成物の製造に使用される。

【 0 0 3 7 】

前記「PCSK9の発現または活性障害に関連する疾患」は、高血清コレステロールレベルに関連する疾患を含む。好ましくは、前記「PCSK9の発現または活性障害に関連する疾患」は、高コレステロール血症、冠動脈心疾患、メタボリックシンドローム、急性冠動脈症候群および関連疾患を含むが、これらに限定されない。前記PCSK9機能は、PCSK9が関与することを必要とするか、またはPCSK9によって激化または強化される任意の活性および機能を指す。前記PCSK9モノクローナル抗体は、種々の診断目的のためにPCSK9を検出および定量することができる。

30

【 0 0 3 8 】

本発明の新規な知見に基づいて、有効量の本発明の結合分子と、薬学的に許容される担体とを含む、PCSK9発現または活性障害に関連する疾患を診断、治療および/または予防するための医薬組成物をも提供する。

40

【 0 0 3 9 】

本明細書で使用される「薬学的に許容される」という用語は、分子本体および組成物が動物またはヒトに適切に投与されるとき、有害な、アレルギーまたは他の不都合な反応を生じないことを意味する。本明細書中で使用される「薬学的に許容される担体」は、本発明の結合分子との相溶性があるべきであり、すなわち、通常の下で組成物の効果を実質的に低下させることなく、本発明の結合分子と混じり合い得る。

【 0 0 4 0 】

薬学的に許容される担体またはその成分として使用されるいくつかの物質の具体的な例は、ラクトース、グルコースおよびスクロースなどの糖；コーンスターチおよびジャガイ

50

モデンプンなどのデンプン；カルボキシメチルセルロースナトリウム、エチルセルロースおよびメチルセルロースなどのセルロースおよびその誘導体；トラガント末；麦芽；ゼラチン；タルク；ステアリン酸およびステアリン酸マグネシウムなどの固体潤滑剤；硫酸カルシウム；落花生油、綿実油、ごま油、オリーブ油、トウモロコシ油、カカオ脂などの植物油；プロピレングリコール、グリセリン、ソルビトール、マンニトールおよびポリエチレングリコールなどのポリオール；アルギン酸；T w e e n（登録商標）などの乳化剤；ラウリル硫酸ナトリウムなどの湿潤剤；着色剤；調味剤；製錠剤、安定剤；酸化防止剤；防腐剤；パイロジェンフリー水；等張食塩水；およびリン酸緩衝液などが挙げられる。

【0041】

本発明の医薬組成物は、必要に応じて種々の剤形に調製することができ、患者の種類、年齢、体重及び一般的な疾患状態、投与方法などの要因に応じて、医師が有効量で投与することができる。投与方法は、例えば、注射または他の治療方式により行うことができる。

10

【0042】

本発明の結合分子は、分離されていないかまたは単離された形態で使用される。さらに、本発明の結合分子は、単独で、または本発明の少なくとも1種の結合分子（またはその変異体もしくは断片）を含む混合物中で使用される。言い換えれば、前記結合分子は、例えば本発明の2種類以上の結合分子、その変異体または断片を含む医薬組成物として組み合わせ使用することができる。例えば、活性が異なるが、相補的な活性を有する結合分子は、所望の予防的、治療的または診断的効果を達成するように単一の治療レジメンで組み合わせることができるが、同じ活性を有する結合分子を、所望の予防、治療または診断効果を達成するように単一の治療レジメンで組み合わせることができる。

20

【0043】

本発明の結合分子または医薬の組み合わせは、ヒトで使用する前に適切な動物モデル系で検出することができる。そのような動物モデル系には、マウス、サルが含まれるが、これらに限定されない。

【0044】

本発明の結合分子の適切な用量範囲は、例えば、0.001～100mg/kg体重、好ましくは0.01～15mg/kg体重である。さらに、例えば、ボーラスを投与してもよく、経時的に複数の分割用量を投与してもよく、または治療状況の緊急性に応じて用量を比例して減少または増加させてもよい。本発明の分子および組成物は、無菌であることが好ましい。これらの分子および組成物を無菌にするための方法は、当該分野で周知である。診断、予防および/または治療のための他の分子は、本発明の結合分子と同様の投与計画で投与することができる。他の分子が別々に投与される場合、本発明の1種もしくは複数種の結合分子または医薬組成物の投与の前、同時、またはその後に患者に投与され得る。ヒト患者への正確な投与計画は、通常、臨床試験中に選択される。

30

【0045】

本発明の結合分子は、臨床医による使用の便宜のために、適切なパッケージに入れてキットを形成することができる。好ましくは、前記キットは、さらに投与方法に関する使用説明書を含むことができる。

40

【0046】

また、本発明は、血清コレステロールレベルを低下させ、患者の高血清コレステロールレベルに関連する疾患を治療または予防する方法を含み、前記方法は、有効量の本発明の少なくとも1種のモノクローナル抗体を患者に投与することを含む。好ましくは、本発明のモノクローナル抗体は、LDLRタンパク質の利用効率を向上させる医薬と組み合わせ投与することができる。前述したLDLRタンパク質の利用効率を向上させる医薬は、アトルバスタチン、セリバスタチン、フルバスタチン、ロバスタチン、メバスタチン、ピタバスタチン、ロスバスタチン、シンバスタチンを含み、またはLDLRタンパク質の利用効率を向上させるための上記の2種類以上の医薬を選択することができる。

【0047】

50

< 免疫抱合体 >

もう一つの態様では、本発明は、本明細書に記載の少なくとも1つの結合タンパク質、及び少なくとも1つの機能性分子（例えば、検出可能な部分／物質の分子）を含む免疫抱合体に関する。前記抗体と前記機能性分子は、共有結合、カップリング、付着、架橋などの方式によって抱合体を構成することができる。本発明の免疫抱合体は、1つ以上の標識を含むことができる。前記標識は、共有結合によって本発明の結合タンパク質に直接的に結合／抱合することもできる。あるいは、前記標識は、1種又は複数種の連結化合物によって前記結合タンパク質に結合／抱合することができる。標識及び結合タンパク質の抱合技術は、当業者に周知である。本発明の免疫抱合体の標識は治療剤であることができる。

【0048】

前記免疫抱合体は、本発明の抗体及び検出可能な標識体を含むことができる。検出可能な標識体には、蛍光標識体、発色標識体が含まれ、例えば、酵素、補欠分子族、蛍光材料、発光材料、生物発光材料、放射性材料、陽電子放出金属、および非放射性常磁性金属イオンが挙げられる。1つ以上の標識体を含むこともできる。検出および／または分析および／または診断のために、抗体を標識するために使用される標識は、免疫組織化学染色（組織）試料、フローサイトメトリーなどのような特定の検出／分析／診断技術および／または方法に依存する。当該分野で公知の検出／分析／診断技術および／または方法に適する標識は、当業者に周知である。

【0049】

また、本発明のヒト結合タンパク質または免疫抱合体は、P C S K 9 タンパク質またはその断片のインビトロ免疫アッセイまたは精製に特に有用な固体支持体に結合させることもできる。そのような固体支持体は、多孔性または非多孔性、平面または非平面である。本発明の結合タンパク質は、精製の便宜のため、標識配列に融合することができる。前記標識配列の例としては、ヘキサヒスチジン標識、ヘマグルチニン（H A）標識、m y c 標識、またはf l a g 標識が挙げられるが、これらに限定されない。或いは、1種の抗体は、別の抗体に抱合して抗体ヘテロ抱合体を形成することができる。

【0050】

本発明の結合タンパク質（抗体）の配列は、リーダーペプチドを含むことができ、またはリーダーペプチドを含んでいなくてもよく、細胞によって発現された場合、成熟した結合タンパク質（抗体）はリーダーペプチドを含まない。

【0051】

< 検出試薬およびキット >

本発明の前記結合分子に基づいて、試験される試料中のP C S K 9 のレベルを簡便、迅速かつ正確に検出するための試薬またはキットを調製することができる。

【0052】

本明細書中で使用したように、用語「試験される試料」は、生物学由来の血液および他の体液試料、生検組織試料または組織培養物などの固体組織試料、またはそれらから誘導される細胞またはその子孫を含む様々な試料タイプを包含する。この用語はまた、タンパク質またはポリヌクレオチドのような特定の成分の試薬による処理、溶解、または富化などの、獲得後の任意の手段によって処理された試料を包含する。

【0053】

従って、本発明は、試験される試料中のP C S K 9 のレベルを検出するための検出キットを提供し、当該検出キットは、本発明のP C S K 9 結合分子またはP C S K 9 結合分子と検出可能な標識体の免疫抱合体を含む。

【0054】

本発明により提供されるP C S K 9 結合分子を得た後、P C S K 9 レベルを特異的に検出するための検出キットを簡便に製造することができる。

検出の便宜のために、前記キットは、本発明の結合分子またはP C S K 9 結合分子と検出可能な標識体を含む免疫抱合体に加えて、他の検出試薬または補助試薬をさらに含むことができる。前記補助試薬は、例えば、E L I S A キットにおいて通常に使用されている

10

20

30

40

50

試薬のいくつかであり、これらの試薬の特性およびそれらの配合方法は、当業者に周知であり、例えば顕色剤、標識物、二次抗体、抗抗体、増感剤などがある。当業者であれば、本発明の結合分子がPCSK9を認識するための試薬として利用される限り、検出キットの様々な変形が本発明に含まれることを理解すべきである。

【0055】

さらに、前記キットには、その中に装填された試薬の使用法を示すための使用説明書が含まれていてもよい。

本発明により提供される結合分子および/またはキットを得た後、種々の免疫学的に関連する方法を使用して、試料中のPCSK9またはその含有量を検出し、それによって試験される試料の供与体にPCSK9の発現または活性障害と関連する疾患が存在するかどうかを知ることができる。

10

【0056】

以下、具体的な実施例に基づいて、本発明をさらに説明する。これらの実施例は、本発明の説明のみに用いられ、本発明の範囲を限定するつもりがないと理解されるべきである。以下の実施例において、具体的な実験方法を特定していないが、通常、J. Sambrookら編著、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」、第三版、科学出版社、2002年に記載のような通常の条件に従って、または製造者に推薦された条件に従って実験を行う。

【0057】

<実施例1> PCSK9モノクローン抗体の最適化とスクリーニング

20

要望に応じたPCSK9抗体を見出すために、本発明者は、広範な研究およびスクリーニングの後、完全ヒトファージライブラリーから優れた性能を有する2株のモノクローナル抗体を得た。それらの可変ドメインの核酸配列およびアミノ酸配列は、以下のように記載されている。

【0058】

(1) モノクローン抗体B9287

リーダーペプチドを含む重鎖可変領域のヌクレオチド配列は、SEQ ID NO: 1のようであり；リーダーペプチドを含まない重鎖可変領域のヌクレオチド配列はSEQ ID NO: 21のようである。

【0059】

リーダーペプチドを含む重鎖可変領域のアミノ酸配列は、SEQ ID NO: 2のようであり；リーダーペプチドを含まない重鎖可変領域のアミノ酸配列は、SEQ ID NO: 22のようである。

30

【0060】

重鎖の各CDR領域のアミノ酸配列：

HCDR1：AFTFD SFGMH (SEQ ID NO: 7)；

HCDR2：LLWSDGSDEYYADSAKG (SEQ ID NO: 8)；

HCDR3：AVGA IYQFYAMD V (SEQ ID NO: 9)。

【0061】

重鎖の各CDR領域のヌクレオチド配列：

40

HCDR1：GCC T T C A C C T T C G A C A G C T T C G G C A T G C A C (SEQ ID NO: 14)；

HCDR2：C T G C T T T G G A G C G A C G G C T C C G A C G A G T A C T A C G C C G A C T C C G C T A A G G G C (SEQ ID NO: 15)；

HCDR3：G C G G T G G G C G C C A T C T A C C A G T T C T A C G C C A T G G A C G T G (SEQ ID NO: 16)。

【0062】

軽鎖可変領域のヌクレオチド配列は、SEQ ID NO: 3のようであり；リーダーペプチドを含まない軽鎖可変領域のヌクレオチド配列は、SEQ ID NO: 23のようである。

50

【 0 0 6 3 】

軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、SEQ ID NO : 4 のようであり ; リーダーペプチドを含まない軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、SEQ ID NO : 2 4 のようである。

【 0 0 6 4 】

軽鎖の各 C D R 領域のアミノ酸配列 :

L C D R 1 : T G T S S N I G N Q F V S (S E Q I D N O : 1 0) ;

L C D R 2 : E Y N K R P S (S E Q I D N O : 1 1) ;

L C D R 3 : G S W D S S L S G Y V (S E Q I D N O : 1 2) 。

【 0 0 6 5 】

軽鎖の各 C D R 領域のヌクレオチド配列 :

L C D R 1 : A C C G G C A C C T C C T C C A A C A T C G G C A A C C A A T T C G T G T C C (S E Q I D N O : 1 7) ;

L C D R 2 : G A G T A C A A C A A G C G G C C C T C C (S E Q I D N O : 1 8) ;

L C D R 3 : G G C T C C T G G G A C T C T T C C C T G T C C G G C T A T G T G (S E Q I D N O : 1 9) 。

【 0 0 6 6 】

(2) モノクローン抗体 B 9 2 8 8

重鎖のヌクレオチド配列は、SEQ ID NO : 5 のようであり ; リーダーペプチドを含まない重鎖可変領域のヌクレオチド配列は、SEQ ID NO : 2 5 のようである。

【 0 0 6 7 】

重鎖のアミノ酸配列は、SEQ ID NO : 6 のようであり ; リーダーペプチドを含まない重鎖可変領域のヌクレオチド配列は、SEQ ID NO : 2 6 のようである。

【 0 0 6 8 】

重鎖の各 C D R 領域のアミノ酸配列 :

H C D R 1 : A F T F D S F G M H (S E Q I D N O : 7) ;

H C D R 2 : L L W S D G S D E Y Y A D S A K G (S E Q I D N O : 8) ;

H C D R 3 : A V G S I Y Y Y A M D V (S E Q I D N O : 1 3) 。

【 0 0 6 9 】

重鎖の各 C D R 領域のヌクレオチド配列 :

H C D R 1 : G C C T T C A C C T T C G A C A G C T T C G G C A T G C A C (S E Q I D N O : 1 4) ;

H C D R 2 : C T G C T T T G G A G C G A C G G C T C C G A C G A G T A C T A C G C C G A C T C C G C T A A G G G C (S E Q I D N O : 1 5) ;

H C D R 3 : G C G G T G G G C T C C A T C T A C T A C T A C T A C G C C A T G G A C G T G (S E Q I D N O : 2 0) 。

【 0 0 7 0 】

モノクローナル抗体 B 9 2 8 8 の軽鎖ヌクレオチド配列およびアミノ酸配列は、B 9 2 8 7 の軽鎖ヌクレオチド配列およびアミノ酸配列と同じであり、対応する各 C D R 領域も B 9 2 8 7 と同じである。

【 0 0 7 1 】

< 実施例 2 > トランスフェクトされた細胞からの P C S K 9 モノクローナル抗体の調製

前記モノクローナル抗体 B 9 2 8 7 の重鎖ヌクレオチド配列 (S E Q I D N O : 1 ; リーダーペプチドコード配列を含む) の両端に H i n d I I I / N o t I 部位を付加し、これを p C D N A 3 . 1 + プラスミドの対応する部位に挿入し ; 前記モノクローナル抗体 B 9 2 8 7 の軽鎖ヌクレオチド配列 (S E Q I D N O : 3 ; リーダーペプチドコード配列を含む) の両端に H i n d I I I / N o t I 部位を付加し、これを p C D N A 3 . 1 + プラスミドの対応する部位に挿入する。前記モノクローナル抗体 B 9 2 8 7 を発現す

10

20

30

40

50

る組換えプラスミドを得た。

【0072】

前記モノクローナル抗体B9288の重鎖ヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 5; リーダーペプチドコード配列を含む)の両端にHindIII/NotI部位を付加し、これをpCDNA3.1+プラスミドの対応する部位に挿入し; 前記モノクローナル抗体B9288の軽鎖ヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 3)の両端にHindIII/NotI部位を付加し、これをpCDNA3.1+プラスミドの対応する部位に挿入する。前記モノクローナル抗体B9288を発現する組換えプラスミドを得た。

【0073】

(1) 一過性トランスフェクション

上記した前記モノクローナル抗体B9287を発現する組換えプラスミドまたは前記モノクローナル抗体B9288を発現する組換えプラスミドを、リボソーム法により懸濁HEK293細胞に一過的にトランスフェクトした。

【0074】

得られたトランスフェクションされた細胞をExp293 Expression培地で37、8%CO₂、回転数120rpmの条件下で培養した。

トランスフェクション細胞を大量に培養した後、二段階遠心分離(第1段階遠心分離条件10分間、1000g; 第2段階遠心分離条件30分間、10000g)により、細胞および細胞破片を除去することで、上清を得た。清澄化された上清を、Protein Aアフィニティークロマトグラフィーカラムに充填し、3回の溶出(溶出緩衝液が、順次にPB 150mM NaCl pH6.5、20mM Na-citrate 1M NaCl pH5.5、20mM Na-citrate pH5.5である)によって不純物を除去し、pH直線溶出法(開始緩衝液A: 20mM Na-citrate pH5.5; 標的緩衝液B: 20mM Na-citrate pH3.0)によって標的抗体を分離して捕捉した。最後に、限外濾過濃縮工程によって、標的抗体を200mM HEPES、100mM NaCl、50mM NaOAc pH7.0緩衝液に置き換えた。

【0075】

(2) B9287を安定に発現する細胞の電気的トランスフェクション

B9287軽鎖(SEQ ID NO: 23)およびB9287重鎖(SEQ ID NO: 21)を含む構築プラスミド(プラスミドDNA総量20μg)を、 1.0×10^7 個の宿主細胞CHO-K1細胞中に混合し; 当該細胞とプラスミドの混合液をエレクトロポレーター(Gene Pulser II)に入れ、電圧300Vおよび容量950μFの指数関数的な減衰波を用いて細胞とプラスミドの混合液に対して電気ショック同時トランスフェクションにかけた。電気的トランスフェクションが行われた細胞とDNAの混合液を、2mLの宿主細胞基礎培地(EX-CELL(登録商標) Advanced™ CHO Fed-batch Medium、Sigma; 6mM L-グルタミンを含む、Sigma)を含有する6ウェルプレートに加え、細胞を二酸化炭素インキュベーターに入れて37で24時間インキュベートし、その後、培地を選択増殖培地(EX-CELL(登録商標) Advanced™ CHO Fed-batch Medium、Sigma; Puromycin含有、20μg/mL、GIBCOおよび6mM L-glutamine, Sigma)に置き換えて、細胞生存率が90%以上に回復するまで約3週間圧力スクリーニングを行い、CHO-K1ゲノムに組み込まれた重鎖および軽鎖を含むPool細胞系を得た。Pool細胞の生存率が90%以上に回復したとき、125mL振とうフラスコで流加培養し、培養体積が30mLであり、初期細胞濃度が 0.3×10^6 /mLであった。3、5、7、9、11、13日目に添加培地(EX-CELL Advanced CHO feed 1(with glucose)、Sigma)を補充し、サンプルを採取して細胞密度と生存率を測定し、グルコース濃度が3g/Lに低減したときにグルコースを6g/Lになるように添加し、生存率が70%以下に低減したときに培養を停止し、抗体濃度を検出する。

10

20

30

40

50

【 0 0 7 6 】

(3) B 9 2 8 7 トランスフェクタントを安定に発現する半固体クローニングおよび E L I S A スクリーニング

抗体濃度が比較的に高い P o o l 細胞を選択してモノクローナルスクリーニングを行い、50 - 200 個の P o o l 細胞を含有する細胞懸濁液を 10 mL 半固体培地 (C l o n e M e d i a C H O G r o w t h A w i t h L - G l n , M o l e c u l a r d e v i c e s) と均一に混合した後に、100 mm 培養皿に敷き広げて、37℃、5% CO₂ インキュベーターで 14 日間培養し、中程度の細胞群落を採取して、200 μL の選択培地を含む 96 ウェルプレートに移して、4 - 5 日間で培養し、細胞懸濁液をブローし、均一に混合し、2 枚の 96 ウェルプレートに平均に分け、それぞれ新鮮な培地を補充して 200 μL の培養系にした。そのうち、1 枚のプレートについて通常の液体交換と増殖を行い、液体交換と増殖を行うときに、細胞懸濁液をブローし、均一に混合し、培地 100 μL を採取して捨てて、100 μL の新鮮な培地を添加し、このように繰り返した。他の 1 枚のプレートについて、液体交換を行わず、10 日間連続的に培養し、細胞上清を採取して E L I S A 検出を行った。OD 値に基づいて細胞株を選択して、増殖及びサブクローニングスクリーニングを行った。第 1 ラウンドの半固体スクリーニングによって得られた好ましい細胞株を、0.5 細胞 / ウェルの密度で 96 ウェル細胞プレートに敷広げた。7 日後、単一細胞クローンが特定のスクリーニングスケールまで増殖するまで細胞を観察し、単一細胞集落のみを有するウェルを単一細胞ウェルとして選択した。96 ウェル培養プレートの単一細胞ウェルの培地 (適切に希釈することができる) を被覆 E L I S A プレートに移し、E L I S A スクリーニング分析を行い、T O P 3 単一細胞系までスクリーニングし、流加培養して発現量を確認した。

10

20

【 0 0 7 7 】

< 実施例 3 > P C S K 9 モノクローナル抗体の生物分析の特性評価

(1) キャピラリー電気泳動 (C E - S D S)

抗体について、L a b C h i p G X I I システムによって、キャピラリー電気泳動による分析を行った。結果により、還元および非還元の条件下で、本発明の P C S K 9 モノクローナル抗体 (リーダーペプチドを含まない、以下同様) の試料のピーク純度百分率および分子量は、表 1 (非還元条件) および表 2 (還元条件) に示されると分かる。

30

【 0 0 7 8 】

【 表 1 】

ID#	主ピーク純度% (非還元条件)	分子量 (kDa)
B9287	77.4%	177.67
B9288	80.4%	178.05

40

【 0 0 7 9 】

【表 2】

ID#	主ピーク純度% (還元条件)	分子量 (kDa)
B9287	35.4%, 63.5%	36.82, 65.35
B9288	36.7%, 63.3%	36.80, 65.72

10

【0080】

(2) モレキュラーシーブ液体クロマトグラフィー (SE-HPLC)

モノクローナル抗体を0.2 μmフィルター (Thomson、カタログ番号25535-100) で濾過し、MABPac SEC-1カラム (Thermo、カタログ番号07469620) にロードした。移動相緩衝液は50 mMリン酸ナトリウム、300 mM塩化ナトリウム、pH 6.2であり、流速は0.2 ml / 分間であった。ピーク計算はChemStationソフトウェアを使用して統合された。本発明のPCSK9モノクローナル抗体の主ピークおよび凝集ピークの百分率を表3に示す。

【0081】

【表 3】

20

ID#	主ピーク純度%	凝集ピーク純度%
B9287	>99.9%	<0.01%
B9288	>99.9%	<0.01%

【0082】

(3) 示差走査熱量測定法によるタンパク質安定性の評価

示差走査熱量測定法 (DSC) は、試料と基準温度との間の熱の差を温度の関数として測定する技術である。示差走査熱量測定法は、50 %タンパク質変性 (T_m) における温度 / 融解温度を含む、複数のタンパク質の特性を測定するために使用することができ、これがタンパク質の安定性を評価する方法である。

検出される抗体を1 mg / mlの濃度でNano DSCサンプルチャンバーに装填し、温度を1 / 分間の速度で25 から100 まで昇温した。実施前に正確な開始温度を保証するために、サンプルを測定する前に、予め15分間で走査した。緩衝液のみのサンプルの数値をサンプルデータから差し引き、Nano DSCソフトウェアを使用してT_mを計算した。結果を表4に示した。

【0083】

【表 4】

40

ID#	T _m (°C)
B9287	63°C, 74°C
B9288	61°C, 73°C

【0084】

< 実施例 4 > 抗体とPCSK9との結合の特性評価

ヒト、マウスまたはカニクイザルのPCSK9に対してPCSK9モノクローナル抗体の結合能力は、Octet Red 96システム (ForteBio) を用いて評価し

50

た。抗ヒトIgG Fc (AHC) の動力的グレードのバイオセンサー (Fortebio、#18-5063) を、pH 1.7でのグリシン前処理の後、アッセイ緩衝液に浸漬した。検出されるPCSK9モノクローナル抗体は、 $10\mu\text{g/ml}$ の濃度でAHCバイオセンサーに120秒間固定された。次いで、PCSK9モノクローナル抗体がロードされたAHCバイオセンサーは、異なる濃度のヒトPCSK9抗原 (GeneBank AX127530.1)、マウスPCSK9抗原 (NCBI NM_153565.2) またはカニクイザルPCSK9抗原 (NCBI NM_001112660.1) 及び緩衝液に浸漬された。分析物カラムの最終希釈点は、緩衝液とロードされたバイオセンサーとの間の非特異的結合を検出するための検出緩衝液のみを含む。抗原と抗体の結合は、80秒から120秒まで検出され、続いて120秒から180秒まで解離した。検出緩衝液で60秒のベースラインを決定した。抗PCSK9のモノクローナル抗体の親和性曲線は、1:1で結合する動態センシング1価結合モデルを用いてフィッティングさせたものである。動態分析を図1および表5に示した。

【0085】

【表5】

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

【0086】

< 実施例5 > 細胞LDL吸収アッセイ

ヒトHepG2細胞を、黒色、透明の96ウェルプレート (Costar) における、10% FBSを補充したDMEM培地 (Mediatech、Inc) に、 5×10^4 細胞/ウェルの濃度で敷広げて、37 (5% CO₂) で一晩インキュベートした。PCSK9と抗体との複合体を形成するために、 $20\mu\text{g/ml}$ のヒトPCSK9を、吸収緩衝液 (10% FBSを含むDMEM) で希釈した種々の濃度の抗体、または緩衝液単独 (対照) と共に室温で1時間インキュベートした。細胞上清を除去した後、PCSK9/抗体の混合物を添加し、続いて吸収緩衝液中で最終濃度 $8\mu\text{g/ml}$ に希釈したDil-LDL (Invitrogen) を添加した。37 (5% CO₂) で16~18時間インキュベートした後、細胞をPBSで徹底的に洗浄し、細胞蛍光シグナルをTECAN M1000 554nm (励起) および571nm (発射) によって検出した。

【0087】

細胞吸収アッセイの結果を図2に示した。すなわち、PCSK9モノクローナル抗体のIC50値を測定し、具体的には数値が3.94nM (B9287) および1.46nM (B9288) pM (図2) であった。

【0088】

以上の結果から、本発明の抗原結合タンパク質は、細胞のLDL吸収を低減する優れた能力を有することが示された。

【 0 0 8 9 】

< 実施例 6 > アカゲザル体内における P C S K 9 モノクローナル抗体の血中 L D L レベルへの影響

高脂血症アカゲザルで、P C S K 9 モノクローナル抗体 B 9 2 8 7 が非霊長類動物疾患モデルの体内における血清 L D L を低減する効果について試験した。7 歳以上の高脂血症の 4 頭のアカゲザルに、ビヒクル (P B S + 0 . 0 1 % T w e e n 2 0) または 3 m g / k g の用量で P C S K 9 モノクローナル抗体 B 9 2 8 7 を第 0 日に 1 回皮下注射した。それぞれ、第 0、1、3、5、7、9、11、14 日で一晚絶食後の血清 L D L レベルについて分析した。

【 0 0 9 0 】

10

結果を図 3 に示した。3 m g / k g の P C S K 9 モノクローナル抗体 B 9 2 8 7 を 1 回注射したすべて 4 頭の動物において、血清 L D L (5 0 % 以上) の有意な低減が生じた。

また、本発明者は同様に、高脂血症アカゲザルにおいて、P C S K 9 モノクローナル抗体 B 9 2 8 8 が体内血清 L D L を低減する効果について試験した。この結果は、P C S K 9 モノクローナル抗体 B 9 2 8 8 が、アカゲザルにおける血清 L D L レベルを有意に低減させたことをも実証した。

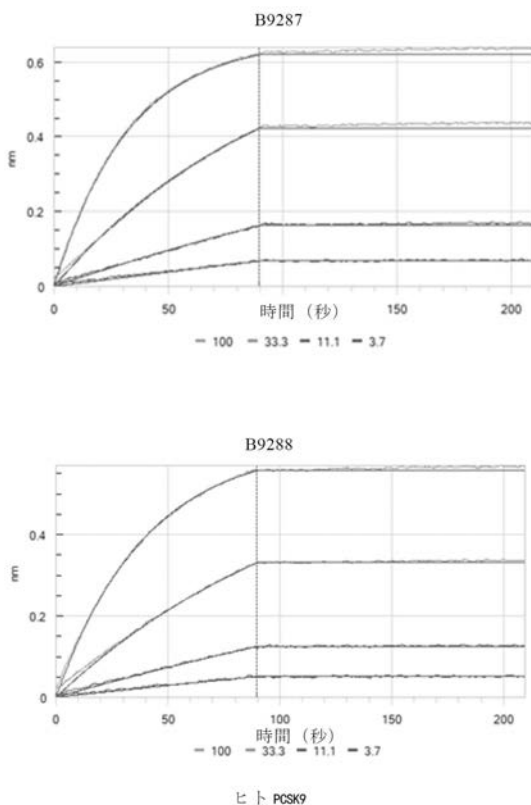
【 0 0 9 1 】

従って、P C S K 9 抗体は、非ヒト霊長類動物疾患モデルにおける血清 L D L レベルを低下させる。

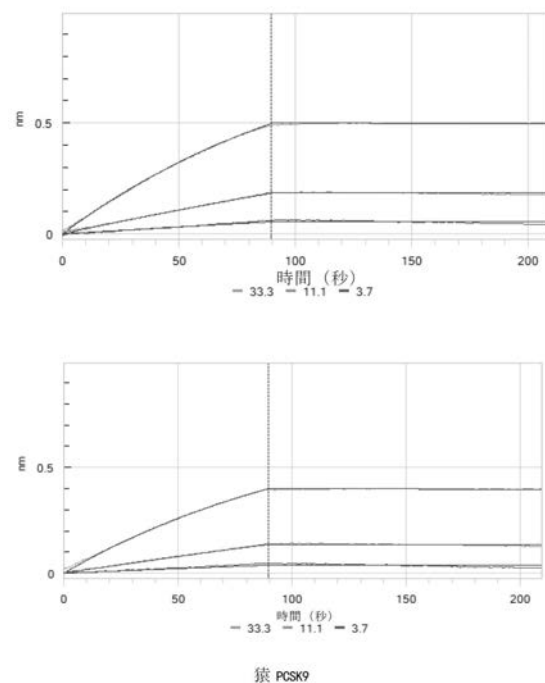
本発明に言及されている全ての文献は、文献毎に参照として別々に引用されるように、その内容が参照により本出願に組み込まれる。さらに、本発明の上記開示内容を読んだ後に、当業者は、本発明に対して様々な修正および変更をすることができ、これらの同等の形式も本願に添付の特許請求の範囲により限定される範囲に落ちると理解されるべきである。

20

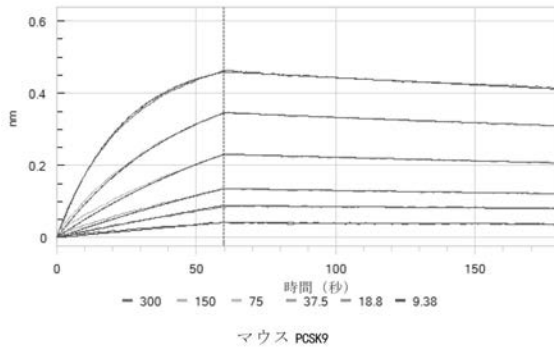
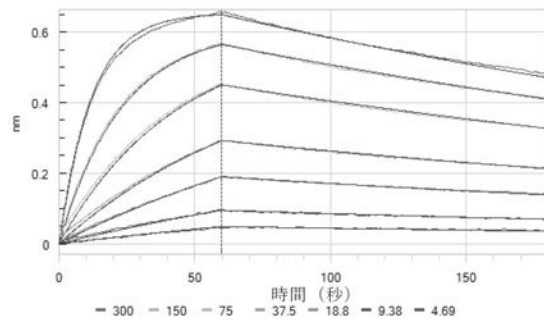
【 図 1 A 】



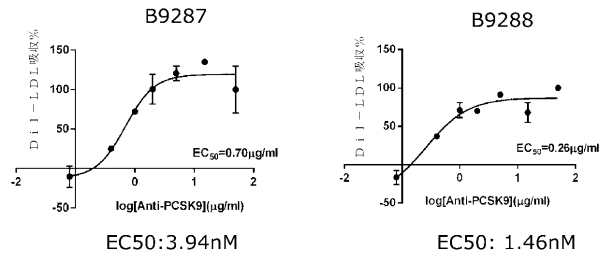
【 図 1 B 】



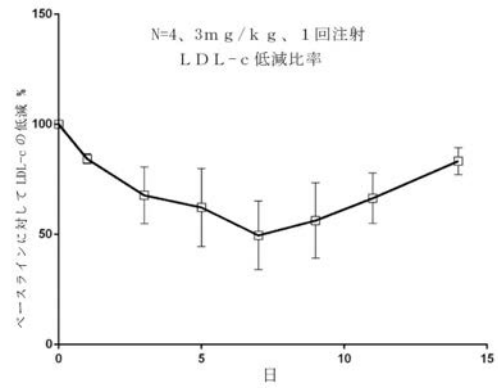
【図 1 C】



【図 2】



【図 3】



【配列表】

2019518472000001.app

【 国际調查報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2017/079655		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K 16/40 (2006.01) i; C12N 15/13 (2006.01) i; A61K 39/395 (2006.01) i; A61P 9/00 (2006.01) i; A61P 9/10 (2006.01) i; A61P 7/02 (2006.01) i; G01N 33/577 (2006.01) i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
B. FIELDS SEARCHED				
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K; C12N; A61K; A61P; G01N				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched				
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNABS; CPRSABS; CPEA; DWPI; SIPOABS; CNTXT; EPTXT; USTXT; WOTXT; GENBANK; EMBL-EBI; CNKI; GOOGLE; PubMed; ISI Web of Knowledge; MABSPACE (HONG KONG) TECHNOLOGY CO., LTD.; WANG, Shaoxiong; binding protein, bacteriophage library, IC50, EC50, PCSK9, Proprotein convertase subtilisin, inhibit+, ligand, bind+, antibody+, antagonist, SEQ ID NOs: 1-26				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
X	CN 104583237 A (ALDERBIO HOLDINGS LLC), 29 April 2015 (29.04.2015), claims 1-139, 174-182, 260-375 and 404-405	1-14		
X	CN 102333542 A (RINAT NEUROSCIENCE CORP. et al.), 25 January 2012 (25.01.2012), claims 1-24	1-14		
X	CN 104861071 A (NANJING NORMAL UNIVERSITY), 26 August 2015 (26.08.2015), claims 1-9	1-14		
X	CN 104364266 A (HOFFMANN-LA ROCHE INC.), 18 February 2015 (18.02.2015), claims 1-26 and 55-80	1-14		
A	CN 105001336 A (SHANGHAI FUDAN-ZHANGJIANG BIO-PHARMACEUTICAL CO., LTD.), 28 October 2015 (28.10.2015), the whole document	1-14		
A	CN 104447997 A (REGENERON PHARMACEUTICALS INC.), 25 March 2015 (25.03.2015), the whole document	1-14		
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.				
<table border="0"> <tr> <td style="vertical-align: top;"> * 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 </td> <td style="vertical-align: top;"> "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 </td> </tr> </table>			* 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
* 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 08 June 2017 (08.06.2017)		Date of mailing of the international search report 04 July 2017 (04.07.2017)		
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 CHEN, Ying Telephone No.: (86-10) 62413889		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2017/079655**C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2017/079655

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 104583237 A	29 April 2015	EP 2844673 A4	20 April 2016
		MX 2014013612 A	26 October 2015
		CA 2872777 A1	14 November 2013
		TW 201348260 A	01 December 2013
		WO 2013169886 A1	14 November 2013
		US 2013302399 A1	14 November 2013
		AU 2013259562 A1	27 November 2014
		SG 11201407099W A	27 November 2014
		WO 2013169886 A9	23 January 2014
		KR 20150006471 A	16 January 2015
		JP 2015519050 A	09 July 2015
		US 2016194408 A1	07 July 2016
		EP 2844673 A1	11 March 2015
		US 9255154 B2	09 February 2016
		AR 092005 A1	18 March 2015
CN 102333542 A	25 January 2012	RU 2011109178 A	20 September 2012
		RU 2528735 C2	20 September 2014
		NZ 591541 A	30 November 2012
		IL 211519 A	30 June 2016
		MX 2011002726 A	29 July 2011
		TW I445716 B	21 July 2014
		HK 1161136 A1	27 January 2017
		JP 2012107017 A	07 June 2012
		IL 229059 D0	31 December 2013
		US 8426363 B2	23 April 2013
		US 2010068199 A1	18 March 2010
		JP 6060212 B2	11 January 2017
		US 2012014951 A1	19 January 2012
		PE 19522015 A1	17 January 2016
		TW I516501 B	11 January 2016
		JP 5750421 B2	22 July 2015
		IL 229059 A	30 June 2016
		PH 12014501261 A1	07 December 2015
		US 8399646 B2	19 March 2013
		EP 2344194 A2	20 July 2011
		ZA 201101688 B	29 August 2012
		CN 102333542 B	20 January 2016
		US 9175093 B2	03 November 2015
		IL 211519 D0	31 May 2011
		US 8080243 B2	20 December 2011
		TW 201431882 A	16 August 2014
		US 2012015435 A1	19 January 2012
		AU 2009290438 B2	20 December 2012
		JP 2013078312 A	02 May 2013
		AR 073292 A1	28 October 2010
		CO 6351752 A2	20 December 2011
		RU 2014127686 A	10 February 2016
		JP 5119359 B2	16 January 2013
		WO 2010029513 A3	15 July 2010
		CA 2736349 A1	18 March 2010

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2017/079655

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 104861071 A CN 104364266 A	26 August 2015	WO 2010029513 A2	18 March 2010
	18 February 2015	JP 2012504388 A	23 February 2012
		KR 20110056317 A	26 May 2011
		US 2016096898 A1	07 April 2016
		JP 2015205883 A	19 November 2015
		AU 2009290438 A1	18 March 2010
		JP 4898976 B2	21 March 2012
		TW 201024321 A	01 July 2010
		KR 101230675 B1	13 February 2013
		US 2013273069 A1	17 October 2013
		CA 2736349 C	29 December 2015
		PE 08022011 A1	27 October 2011
		None	
		EP 2861624 A1	22 April 2015
		HK 1205141 A1	11 December 2015
		US 2016355606 A1	08 December 2016
		MX 2014014830 A	11 May 2015
		CA 2875096 A1	19 December 2013
		US 2013344085 A1	26 December 2013
		WO 2013188855 A1	19 December 2013
		US 9266961 B2	23 February 2016
		KR 20150023711 A	05 March 2015
		AR 091462 A1	04 February 2015
		TW 201410706 A	16 March 2014
		JP 2015530867 A	29 October 2015
		RU 2015101113 A	10 August 2016
		None	
CN 105001336 A	28 October 2015	LT 2358756 T	27 March 2017
CN 104447997 A	25 March 2015	EC SP11011134 A	29 July 2011
		US 2011065902 A1	17 March 2011
		IL 230771 A	31 May 2015
		RU 2552169 C2	10 June 2015
		KR 20110094067 A	19 August 2011
		US 2010166768 A1	01 July 2010
		DO P2011000184 A	15 August 2012
		EP 2358756 A1	24 August 2011
		MX 2011006197 A	20 July 2011
		JP 2012511913 A	31 May 2012
		KR 101699707 B1	25 January 2017
		TW 201036633 A	16 October 2010
		NZ 601923 A	28 March 2013
		IL 230771 D0	31 March 2014
		AU 2009333326 A1	08 July 2010
		NZ 593155 A	30 November 2012
		US 2013085266 A1	04 April 2013
		JP 2013198487 A	03 October 2013
		TW I465249 B	21 December 2014
		WO 2010077854 A1	08 July 2010
		RU 2011129316 A	20 January 2013

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2017/079655

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2017/079655

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

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2017/079655

A. 主题的分类

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

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; G01N

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; CPRSABS; CPEA; DWPI; SIPOABS; CNTXT; EPTXT; USXT; WOTXT; GENBANK; EMBL-EBI; CNKI; GOOGLE; PubMed; ISI Web of Knowledge; 迈博斯(香港)科技有限公司, 王少雄, 前蛋白转化酶枯草溶菌素, 抗体, 结合蛋白, 拮抗剂, 抑制剂, 噬菌体库, IC50, EC50, PCSK9, Proprotein convertase subtilisin, inhibit+, ligand, bind+, antibod+, antagonist, SEQ ID NOs: 1-26

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
X	CN 104583237 A (奥尔德生物控股有限责任公司) 2015年 4月 29日 (2015 - 04 - 29) 权利要求1-139, 174-182, 260-375, 404-405	1-14
X	CN 102333542 A (瑞纳神经科学公司等) 2012年 1月 25日 (2012 - 01 - 25) 权利要求1-24	1-14
X	CN 104861071 A (南京师范大学) 2015年 8月 26日 (2015 - 08 - 26) 权利要求1-9	1-14
X	CN 104364266 A (霍夫曼-拉罗奇有限公司) 2015年 2月 18日 (2015 - 02 - 18) 权利要求1-26, 55-80	1-14
A	CN 105001336 A (上海复旦张江生物医药股份有限公司) 2015年 10月 28日 (2015 - 10 - 28) 全文	1-14
A	CN 104447997 A (瑞泽恩制药公司) 2015年 3月 25日 (2015 - 03 - 25) 全文	1-14

☒ 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

“B” 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型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 6月 8日

国际检索报告邮寄日期

2017年 7月 4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

受权官员

陈莹

传真号 (86-10)62019451

电话号码 (86-10)62413889

表 PCT/ISA/210 (第2页) (2009年7月)

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2017/079655

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

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2017/079655

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

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)

国际检索报告 关于同族专利的信息				国际申请号 PCT/CN2017/079655		
检索报告引用的专利文件				公布日 (年/月/日)		公布日 (年/月/日)
				WO	2010029513	A2 2010年 3月 18日
				JP	2012504388	A 2012年 2月 23日
				KR	20110056317	A 2011年 5月 26日
				US	2016096898	A1 2016年 4月 7日
				JP	2015205883	A 2015年 11月 19日
				AU	2009290438	A1 2010年 3月 18日
				JP	4898976	B2 2012年 3月 21日
				TW	201024321	A 2010年 7月 1日
				KR	101230675	B1 2013年 2月 13日
				US	2013273069	A1 2013年 10月 17日
				CA	2736349	C 2015年 12月 29日
				PE	08022011	A1 2011年 10月 27日
CN	104861071	A	2015年 8月 26日	无		
CN	104364266	A	2015年 2月 18日	EP	2861624	A1 2015年 4月 22日
				HK	1205141	A1 2015年 12月 11日
				US	2016355606	A1 2016年 12月 8日
				MX	2014014830	A 2015年 6月 11日
				CA	2875096	A1 2013年 12月 19日
				US	2013344085	A1 2013年 12月 26日
				WO	2013188855	A1 2013年 12月 19日
				US	9266961	B2 2016年 2月 23日
				KR	20150023711	A 2015年 3月 5日
				AR	091462	A1 2015年 2月 4日
				TW	201410706	A 2014年 3月 16日
				JP	2015530867	A 2015年 10月 29日
				RU	2015101113	A 2016年 8月 10日
CN	105001336	A	2015年 10月 28日	无		
CN	104447997	A	2015年 3月 25日	LT	2358756	T 2017年 3月 27日
				EC	SP11011134	A 2011年 7月 29日
				US	2011065902	A1 2011年 3月 17日
				IL	230771	A 2015年 5月 31日
				RU	2552169	C2 2015年 6月 10日
				KR	20110094067	A 2011年 8月 19日
				US	2010166768	A1 2010年 7月 1日
				DO	P2011000184	A 2012年 8月 15日
				EP	2358756	A1 2011年 8月 24日
				MX	2011006197	A 2011年 7月 20日
				JP	2012511913	A 2012年 5月 31日
				KR	101699707	B1 2017年 1月 25日
				TW	201036633	A 2010年 10月 16日
				NZ	601923	A 2013年 3月 28日
				IL	230771	DO 2014年 3月 31日
				AU	2009333326	A1 2010年 7月 8日
				NZ	593155	A 2012年 11月 30日
				US	2013085266	A1 2013年 4月 4日
				JP	2013198487	A 2013年 10月 3日
				TW	1465249	B 2014年 12月 21日
				WO	2010077854	A1 2010年 7月 8日
				RU	2011129316	A 2013年 1月 20日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2017/079655

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
		HN 2011001659 A	2015年 2月 2日
		BR PI0922885 A2	2016年 10月 4日
		CR 20110296 A	2011年 7月 14日
		MX 341041 B	2016年 8月 5日
		AU 2009333326 B9	2015年 2月 26日
		EP 3156422 A2	2017年 4月 19日
		PE 00142012 A1	2012年 2月 7日
		US 8501184 B2	2013年 8月 6日
		TN 2011000300 A1	2012年 12月 17日
		ZA 201103762 B	2012年 1月 25日
		PA 8854201 A1	2010年 7月 27日
		KR 101504494 B1	2015年 3月 20日
		DK 2358756 T3	2017年 4月 10日
		US 8062640 B2	2011年 11月 22日
		CA 2747123 A1	2010年 7月 8日
		EP 2358756 B1	2017年 1月 11日
		JP 5902122 B2	2016年 4月 13日
		IL 213060 A	2015年 1月 29日
		WO 2010077854 A8	2011年 7月 7日
		CO 6571847 A2	2012年 11月 30日
		KR 20150013359 A	2015年 2月 4日
		RU 2015109166 A	2015年 8月 10日
		JP 5318965 B2	2013年 10月 16日
		IL 213060 D0	2011年 7月 31日
		CN 102245641 B	2015年 1月 7日
		US 2017096496 A1	2017年 4月 6日
		UY 32329 A	2010年 7月 30日
		AR 077724 A1	2011年 9月 21日
CN 101636179 A	2010年 1月 27日	US 2013115223 A1	2013年 5月 9日
		EP 2083861 A2	2009年 8月 5日
		CA 2667894 A1	2008年 5月 15日
		US 2010136028 A1	2010年 6月 3日
		JP 2010508817 A	2010年 3月 25日
		AU 2007322265 A1	2008年 5月 29日
		WO 2008063382 A2	2008年 5月 29日
		WO 2008063382 A3	2008年 12月 4日
		US 2012082679 A1	2012年 4月 5日
		US 2013189278 A1	2013年 7月 25日
		CN 101636179 B	2012年 10月 10日
		AU 2007322265 B2	2013年 6月 20日
		WO 2008057469 A3	2008年 11月 27日
		EP 2083864 A4	2010年 12月 8日
		JP 5588175 B2	2014年 9月 10日
		WO 2008057469 A2	2008年 5月 15日
		EP 2083864 A2	2009年 8月 5日
		CA 2669424 A1	2008年 5月 29日
		US 8344114 B2	2013年 1月 1日
		JP 2014144005 A	2014年 8月 14日
		EP 2083861 A4	2010年 11月 24日
		US 2010041102 A1	2010年 2月 18日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2017/079655

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

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	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21		
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10		
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	P	
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	9/10	(2006.01)	A 6 1 P	9/10	1 0 3	
A 6 1 P	3/04	(2006.01)	A 6 1 P	3/04		
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	D	
G 0 1 N	33/533	(2006.01)	G 0 1 N	33/533		

(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

专利名称(译)	前蛋白转化酶枯草杆菌蛋白酶kexin 9型结合蛋白及其用途		
公开(公告)号	JP2019518472A	公开(公告)日	2019-07-04
申请号	JP2019503615	申请日	2017-04-07
[标]发明人	王少雄		
发明人	王少雄		
IPC分类号	C12N15/13 C12N15/63 C07K16/40 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 A61K39/395 A61P43/00 A61P3/06 A61P9/10 A61P3/04 G01N33/53 G01N33/533		
FI分类号	C12N15/13.ZNA C12N15/63.Z C07K16/40 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 A61K39/395.P A61P43/00.111 A61P3/06 A61P9/10.103 A61P3/04 G01N33/53.D G01N33/533		
F-TERM分类号	4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA72X 4B065/AA90X 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA14 4C085/CC23 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/GG01 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/BA70 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045/GA26		
优先权	201610213460.1 2016-04-07 CN		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及9型前蛋白转化酶枯草杆菌蛋白酶kexin的结合蛋白及其用途。本发明提供了结合蛋白，其与包含独特的互补决定区的前蛋白转化酶枯草杆菌蛋白酶kexin 9型 (PCSK9) 特异性结合，该结合蛋白与PCSK9特异性结合，此外，其可以有效抑制PCSK9的功能并降低血浆中的LDL胆固醇水平，并且用于治疗与PCSK9的功能有关的疾病或受PCSK9的功能影响的疾病。

(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2019-518472 (P2019-518472A) 令和1年7月4日(2019.7.4)
(51) Int. Cl.	F 1	(43) 公表日
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13 Z N A	ターマコード (参考)
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63 Z	4 B 0 6 5
C 0 7 K 16/40 (2006.01)	C 0 7 K 16/40	4 C 0 8 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 H 0 4 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 32 頁) 最終頁に続く		
(21) 出願番号 (86) (22) 出願日 (85) 翻訳文提出日 (86) 国際出願番号 (87) 国際公開番号 (87) 国際公開日 (31) 優先権主張番号 (32) 優先日 (33) 優先権主張国	特願2019-503615 (P2019-503615) 平成29年4月7日 (2017.4.7) 平成30年11月27日 (2018.11.27) PCT/CN2017/079655 W02017/174017 平成29年10月12日 (2017.10.12) 201610213460.1 平成28年4月7日 (2016.4.7) 中国 (CN)	(71) 出願人 518354242 ▲通▼博斯 (香港) 科技有限公司 中華人民共和國 9 9 9 0 7 7 香港特別行政 区金鐘紅棉路 8 号東昌大廈 4 0 2 室 110001070 (74) 代理人 特許業務法人 S S I N P A T (72) 発明者 王少雄 中華人民共和國 9 9 9 0 7 7 香港特別行政 区金鐘紅棉路 8 号東昌大廈 4 0 2 室 F ターム (参考) 4B065 AA01X AA57X AA72X AA90X AB01 BA02 CA25 CA44 CA46 4C085 AA14 CC23 DD62 EE01 GG01 4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 BA70 DA76 EA20 EA50 FA72 FA74 GA26 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 プロタンパク質転換酵素サブチリシンケキシ9型の結合タンパク質及びその使用