



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102652139 A

(43) 申请公布日 2012. 08. 29

(21) 申请号 201080056182. 4

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2010. 12. 10

*C07K 16/40* (2006. 01)

(30) 优先权数据

*A61K 39/395* (2006. 01)

61/285, 942 2009. 12. 11 US

*A61P 3/06* (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 06. 11

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2010/059959 2010. 12. 10

(87) PCT申请的公布数据

W02011/072263 EN 2011. 06. 16

(71) 申请人 IRM 责任有限公司

地址 英属百慕大群岛哈密尔顿

申请人 诺瓦提斯公司

(72) 发明人 S·鲁 S·B·科恩 J·李

D·约韦

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 张莉 黄革生

权利要求书 3 页 说明书 41 页 附图 16 页

(54) 发明名称

PCSK9 拮抗剂

(57) 摘要

本发明提供抗蛋白原转化酶枯草溶菌素 / kexin 型 9a (“PCSK9”) 的抗体拮抗剂和使用这样的抗体的方法。

1. 与蛋白原转化酶枯草溶菌素 /kexin 型 9( PCSK9) 结合的抗体, 其中该抗体 :
  - a) 不阻断 PCSK9 与低密度脂蛋白受体 (LDLR) 的结合, 且
  - b) 抑制 PCSK9 介导的 LDLR 降解。
2. 权利要求 1 的抗体, 其中抗体与人 PCSK9 的第 680-692 位残基中的至少一个氨基酸结合。
3. 权利要求 1 的抗体, 其中抗体与人 PCSK9 结合的平衡解离常数 ( $K_D$ ) 为约 500pM 或更低。
4. 权利要求 1 的抗体, 其中抗体的体内半衰期为至少 7 天。
5. 权利要求 1 的抗体, 其中抗体包括 :
  - (a) 重链可变区, 其包括人重链 V 片段、重链互补决定区 3(CDR3) 和重链框架区 4(FR4), 以及
  - (b) 轻链可变区, 其包括人轻链 V 片段、轻链 CDR3 和轻链 FR4, 其中 :
    - i) 重链 CDR3 包含氨基酸序列 SYYY(A/N)MD(A/F/S/V/Y) (SEQ ID NO:14) ; 以及
    - ii) 轻链 CDR3 可变区包含氨基酸序列 LQWSSDPPT (SEQ ID NO:26)。
6. 权利要求 5 的抗体, 其中重链 V 片段与 SEQ ID NO:28 具有至少 85% 的序列同一性, 其中轻链 V 片段与 SEQ ID NO:31 具有至少 85% 的序列同一性。
7. 权利要求 5 的抗体, 其中重链 V 片段与 SEQ ID NO:27 具有至少 85% 的序列同一性, 其中轻链 V 片段与选自 SEQ ID NO:29 和 SEQ ID NO:30 的氨基酸具有至少 85% 的序列同一性。
8. 权利要求 5 的抗体, 其中 :
  - i) 重链 CDR3 包含选自 SEQ ID NO:12 和 SEQ ID NO:13 的氨基酸序列 ; 和
  - ii) 轻链 CDR3 包含 SEQ ID NO:26 的氨基酸序列。
9. 权利要求 5 的抗体, 其中重链 FR4 为人种系 FR4。
10. 权利要求 9 的抗体, 其中重链 FR4 为 SEQ ID NO:35。
11. 权利要求 5 的抗体, 其中轻链 FR4 为人种系 FR4。
12. 权利要求 11 的抗体, 其中轻链 FR4 为 SEQ ID NO:39。
13. 权利要求 5 的抗体, 其中重链 V 片段和轻链 V 片段各包括互补决定区 1(CDR1) 和互补决定区 2(CDR2) ; 其中 :
  - i) 重链 V 片段的 CDR1 包含 SEQ ID NO:8 的氨基酸序列 ;
  - ii) 重链 V 片段的 CDR2 包含 SEQ ID NO:11 的氨基酸序列 ;
  - iii) 轻链 V 片段的 CDR1 包含 SEQ ID NO:22 的氨基酸序列 ; 以及
  - iv) 轻链 V 片段的 CDR2 包含 SEQ ID NO:25 的氨基酸序列。
14. 权利要求 13 的抗体, 其中
  - i) 重链 V 片段的 CDR1 包含 SEQ ID NO:7 ;
  - ii) 重链 V 片段的 CDR2 包含 SEQ ID NO:10 ;
  - iii) 重链 CDR3 包含选自 SEQ ID NO:12 和 SEQ ID NO:13 的氨基酸序列 ;
  - iv) 轻链 V 片段的 CDR1 包含 SEQ ID NO:21 ;
  - v) 轻链 V 片段的 CDR2 包含 SEQ ID NO:24 ; 以及
  - vi) 轻链 CDR3 包含 SEQ ID NO:26。

15. 权利要求 5 的抗体,其中重链可变区与 SEQ ID NO:40 的可变区具有至少 90% 的氨基酸序列同一性,轻链可变区与 SEQ ID NO:41 的可变区具有至少 90% 的氨基酸序列同一性。

16. 权利要求 5 的抗体,其中重链可变区与 SEQ ID NO:40 的可变区具有至少 95% 的氨基酸序列同一性,轻链可变区与 SEQ ID NO:41 的可变区具有至少 95% 的氨基酸序列同一性。

17. 权利要求 5 的抗体,其中抗体包括包含 SEQ ID NO:40 的重链和包含 SEQ ID NO:41 的轻链。

18. 权利要求 5 的抗体,其中重链可变区与选自 SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:4 的可变区具有至少 90% 的氨基酸序列同一性,轻链可变区与选自 SEQ ID NO:16 和 SEQ ID NO:18 的可变区具有至少 90% 的氨基酸序列同一性。

19. 权利要求 5 的抗体,其中重链可变区与选自 SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:4 的可变区具有至少 95% 的氨基酸序列同一性,轻链可变区与选自 SEQ ID NO:16 和 SEQ ID NO:18 的可变区具有至少 95% 的氨基酸序列同一性。

20. 权利要求 5 的抗体,其中重链可变区包含选自 SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列,轻链可变区包含选自 SEQ ID NO:16 和 SEQ ID NO:18 的氨基酸序列。

21. 权利要求 1 的抗体,其中抗体为 Fab' 片段。

22. 权利要求 1 的抗体,其中抗体为 IgG。

23. 权利要求 1 的抗体,其中抗体为单链抗体 (scFv)。

24. 权利要求 1 的抗体,其中抗体包含人恒定区。

25. 权利要求 1 的抗体,其中抗体与载体蛋白连接。

26. 权利要求 1 的抗体,其中抗体被聚乙二醇化。

27. 特异性结合 PCSK9 的抗体,其中所述抗体包含重链可变区和轻链可变区,其中重链可变区和轻链可变区各包含下列 3 个互补决定区 (CDRs):CDR1、CDR2 和 CDR3 ;其中:

i) 重链可变区的 CDR1 包含 SEQ ID NO:8 的氨基酸序列;

ii) 重链可变区的 CDR2 包含 SEQ ID NO:11 的氨基酸序列;

iii) 重链可变区的 CDR3 包含 SEQ ID NO:14 的氨基酸序列;

iv) 轻链可变区的 CDR1 包含 SEQ ID NO:22 的氨基酸序列;

v) 轻链可变区的 CDR2 包含 SEQ ID NO:25 的氨基酸序列;

vi) 轻链可变区的 CDR3 包含 SEQ ID NO:26 的氨基酸序列;

28. 权利要求 27 的抗体,其中:

i) 重链可变区的 CDR1 包含选自 SEQ ID NO:6 和 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列;

ii) 重链可变区的 CDR2 包含选自 SEQ ID NO:9 和 SEQ ID NO:10 的氨基酸序列;

iii) 重链可变区的 CDR3 包含选自 SEQ ID NO:12 和 SEQ ID NO:13 的氨基酸序列;

iv) 轻链可变区的 CDR1 包含选自 SEQ ID NO:20 和 SEQ ID NO:21 的氨基酸序列;

v) 轻链可变区的 CDR2 包含选自 SEQ ID NO:23 和 SEQ ID NO:24 的氨基酸序列;

vi) 轻链可变区的 CDR3 包含 SEQ ID NO:26 的氨基酸序列。

29. 包含权利要求 1 的抗体和生理相容性赋形剂的组合物。

30. 权利要求 29 的组合物,其中组合物还包含降低个体中低密度脂蛋白胆固醇

(LDL-C) 水平的第二药。

31. 权利要求 30 的组合物,其中第二药是他汀类药。

32. 权利要求 31 的组合物,其中他汀类药选自阿托伐他汀、西立伐他汀、氟伐他汀、洛伐他汀、美伐他汀、匹伐他汀、普伐他汀、瑞舒伐他汀和辛伐他汀。

33. 权利要求 30 的组合物,其中第二药选自贝特类药 (fibrates)、烟酸 (niacin) 及其类似物、胆固醇吸收抑制剂、胆汁酸螯合剂、甲状腺激素模拟物、微粒体甘油三酯转移蛋白 (MTP) 抑制剂、二酰甘油酰基转移酶 (DGAT) 抑制剂、靶向 PCSK9 的抑制性核酸和靶向 apoB100 的抑制性核酸。

34. 在有需要的个体中降低 LDL-C 的方法,所述方法包括给个体施用治疗上有效量的权利要求 1 的抗体,从而降低个体中的 LDL-C。

35. 权利要求 34 的方法,其中个体对他汀类药治疗反应过低或具有抵抗性。

36. 权利要求 34 的方法,其中个体不耐受他汀类药治疗。

37. 权利要求 34 的方法,其中个体的基线 LDL-C 水平为至少约 100mg/dL。

38. 权利要求 34 的方法,其中个体患有家族性高胆固醇血症。

39. 权利要求 34 的方法,其中总胆固醇随 LDL-C 而降低。

40. 权利要求 34 的方法,其中个体患有甘油三酯血症。

41. 权利要求 34 的方法,其中个体具有功能获得性 PCSK9 基因突变。

42. 权利要求 34 的方法,其中个体患有药物诱发性血脂异常。

43. 权利要求 34 的方法,还包括以治疗上有效的量,给个体施用在降低 LDL-C 中有效的第二药。

44. 权利要求 43 的方法,其中第二药为他汀类药。

45. 权利要求 44 的方法,其中他汀类药选自阿托伐他汀、西立伐他汀、氟伐他汀、洛伐他汀、美伐他汀、匹伐他汀、普伐他汀、瑞舒伐他汀和辛伐他汀。

46. 权利要求 43 的方法,其中第二药选自贝特类药 (fibrates)、烟酸 (niacin) 及其类似物、胆固醇吸收抑制剂、胆汁酸螯合剂、甲状腺激素模拟物、微粒体甘油三酯转移蛋白 (MTP) 抑制剂、二酰甘油酰基转移酶 (DGAT) 抑制剂、靶向 PCSK9 的抑制性核酸和靶向 apoB100 的抑制性核酸

47. 权利要求 43 的方法,其中将抗体与第二药作为混合物共施用。

48. 权利要求 43 的方法,其中将抗体与第二药剂以分开的方式共施用。

49. 权利要求 34 的方法,其中将抗体进行静脉内给药。

50. 权利要求 34 的方法,其中将抗体进行皮下给药。

## PCSK9 拮抗剂

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求申请日为 2009 年 12 月 11 日的美国临时专利申请 61/285,942 的优先权,并将其为了所有的目的以引用的方式并入本文。

### 发明领域

[0003] 本发明涉及抗 PCSK9 的抗体拮抗剂。

[0004] 发明背景

[0005] 低密度脂蛋白受体 (LDL-R) 通过清除血液中的低密度脂蛋白 (LDL) 预防动脉粥样硬化和高胆固醇血症。LDL-R 在翻译后水平受蛋白原转化酶枯草溶菌素 /kexin 型 9a(subtilisin/kexin type 9a, “PCSK9”) 的调节。最近,报道了小鼠中 PCSK9 的敲除。这些小鼠表现出血浆胆固醇水平降低了约 50%,和表现出对他汀类药物 (statins) 在降低血浆胆固醇中增强的敏感性 (Rashid S, 等 (2005) Proc Natl Acad Sci 102:5374-5379)。人类遗传数据也支持 PCSK9 在 LDL 体内稳态中的作用。最近,鉴定出了两个突变,其可能是 PCSK9 “功能丧失性”突变。具有这些突变的个体中的血浆 LDL-C 水平降低约 40%,这转化为约 50-90% 的冠心病减少。总之,这些研究显示,PCSK9 的抑制剂对于血浆 LDL-C 浓度的降低和其它由 PCSK9 介导的疾病是有益的,并可以,例如与用于降低胆固醇的第二药,共同用药来增强功效。

[0006] 发明概述

[0007] 本发明提供了与蛋白原转化酶枯草溶菌素 /kexin 型 9 (PCSK9) (例如 SEQ ID NO:47) 结合并拮抗其功能的抗体,和使用这样的抗体的方法,例如以治疗 PCSK9 介导的疾病状况。

[0008] 在一个方面,本发明提供了与蛋白原转化酶枯草溶菌素 /kexin 型 9 (PCSK9) 结合的抗体和抗原结合分子。在一些实施方案中,所述抗体:

[0009] a) 不阻断 PCSK9 与低密度脂蛋白受体 (LDLR) 的结合,和

[0010] b) 抑制 PCSK9 介导的 LDLR 降解。

[0011] 在一些实施方案中,抗体或抗原结合分子与人 PCSK9 的第 680-692 位残基中的至少一个氨基酸结合。例如,在一些实施方案中,抗体或抗原结合分子与氨基酸序列 RSRHLAQASQELQ (SEQ ID NO:49) 中的 PCSK9 的表位结合。

[0012] 在一些实施方案中,抗体或抗原结合分子与人 PCSK9 结合的平衡解离常数 (KD) 为约 500pM 或更低。例如,在一些实施方案中,抗体或抗原结合分子与人 PCSK9 结合的平衡解离常数 (KD) 为约 400pM、300pM、250pM、200pM、190pM、180pM、170pM、160pM、150pM、140pM 或更低。

[0013] 在一些实施方案中,抗体或抗原结合分子的体内半衰期为至少约 7 天。在一些实施方案中,抗体或抗原结合分子的体内半衰期为至少约 3、4、5、6、7、8、9、10 天。在一些实施方案中,抗体或抗原结合分子的体内降胆固醇功效为至少约 2 周,例如 2、3、4 周或更长。优选,该体内半衰期是在人受试者中确定的。

- [0014] 在一些实施方案中,抗体包括:
- [0015] (a) 重链可变区,其包括人重链 V 片段、重链互补决定区 3(CDR3) 和重链构架区 4(FR4),以及
- [0016] (b) 轻链可变区,其包括人轻链 V 片段、轻链 CDR3 和轻链 FR4,其中:
- [0017] i) 重链 CDR3 包含氨基酸序列 SYYYY(A/N)MD(A/F/S/V/Y)(SEQ ID NO:14);以及
- [0018] ii) 轻链 CDR3 可变区包含氨基酸序列 LQWSSDPPT(SEQ ID NO:26)。
- [0019] 在一些实施方案中,抗体包括:
- [0020] (a) 重链可变区,其包括人重链 V 片段、重链互补决定区 3(CDR3) 和重链构架区 4(FR4),以及
- [0021] (b) 轻链可变区,其包括人轻链 V 片段、轻链 CDR3 和轻链 FR4,其中:
- [0022] i) 重链 CDR3 包含氨基酸序列 SYYYNMDY(SEQ ID NO:12);以及
- [0023] ii) 轻链 CDR3 可变区包含氨基酸序列 LQWSSDPPT(SEQ ID NO:26)。
- [0024] 在一些实施方案中,抗体包括:
- [0025] (a) 重链可变区,其包括人重链 V 片段、重链互补决定区 3(CDR3) 和重链构架区 4(FR4),以及
- [0026] (b) 轻链可变区,其包括人轻链 V 片段、轻链 CDR3 和轻链 FR4,其中:
- [0027] i) 重链 CDR3 包含氨基酸序列 SYYYAMDY(SEQ ID NO:13);以及
- [0028] ii) 轻链 CDR3 可变区包含氨基酸序列 LQWSSDPPT(SEQ ID NO:26)。
- [0029] 在一些实施方案中,重链 CDR3 包含选自 SEQ ID NO:12 和 SEQ ID NO:13 的氨基酸序列;轻链 CDR3 包含 SEQ ID NO:26 的氨基酸序列。
- [0030] 在一些实施方案中,重链 V 片段与 SEQ ID NO:28 具有至少 85%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的序列同一性,且其中轻链 V 片段与 SEQ ID NO:31 具有至少 85%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的序列同一性。
- [0031] 在一些实施方案中,重链 V 片段与 SEQ ID NO:27 具有至少 85%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的序列同一性,且其中轻链 V 片段与选自 SEQ ID NO:29 和 SEQ ID NO:30 的氨基酸具有至少 85%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的序列同一性。
- [0032] 在一些实施方案中,重链 FR4 为人种系 FR4。在一些实施方案中,重链 FR4 为 SEQ ID NO:35。
- [0033] 在一些实施方案中,轻链 FR4 为人种系 FR4。在一些实施方案中,轻链 FR4 为 SEQ ID NO:39。
- [0034] 在一些实施方案中,重链 V 片段和轻链 V 片段各包括互补决定区 1(CDR1) 和互补决定区 2(CDR2);其中:
- [0035] i) 重链 V 片段的 CDR1 包含 SEQ ID NO:8 的氨基酸序列;
- [0036] ii) 重链 V 片段的 CDR2 包含 SEQ ID NO:11 的氨基酸序列;
- [0037] iii) 轻链 V 片段的 CDR1 包含 SEQ ID NO:22 的氨基酸序列;以及
- [0038] iv) 轻链 V 片段的 CDR2 包含 SEQ ID NO:25 的氨基酸序列。
- [0039] 在一些实施方案中,重链 V 片段和轻链 V 片段各包括互补决定区 1(CDR1) 和互补决定区 2(CDR2);其中:

- [0040] i) 重链 V 片段的 CDR1 包含 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列；
- [0041] ii) 重链 V 片段的 CDR2 包含 SEQ ID NO:10 的氨基酸序列；
- [0042] iii) 轻链 V 片段的 CDR1 包含 SEQ ID NO:21 的氨基酸序列；以及
- [0043] iv) 轻链 V 片段的 CDR2 包含 SEQ ID NO:24 的氨基酸序列。
- [0044] 在一些实施方案中：
- [0045] i) 重链 V 片段的 CDR1 包含 SEQ ID NO:7；
- [0046] ii) 重链 V 片段的 CDR2 包含 SEQ ID NO:10；
- [0047] iii) 重链 CDR3 包含选自 SEQ ID NO:12 和 SEQ ID NO:13 的氨基酸序列；
- [0048] iv) 轻链 V 片段的 CDR1 包含 SEQ ID NO:21；
- [0049] v) 轻链 V 片段的 CDR2 包含 SEQ ID NO:24；以及
- [0050] vi) 轻链 CDR3 包含 SEQ ID NO:26。
- [0051] 在一些实施方案中，重链可变区与 SEQ ID NO:40 的可变区具有至少 85%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的氨基酸序列同一性，轻链可变区与 SEQ ID NO:41 的可变区具有至少 90% 的氨基酸序列同一性。
- [0052] 在一些实施方案中，抗体包括包含 SEQ ID NO:40 的重链和包含 SEQ ID NO:41 的轻链。
- [0053] 在一些实施方案中，重链可变区与选自 SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:4 的可变区具有至少 85%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的氨基酸序列同一性，轻链可变区与选自 SEQ ID NO:16 和 SEQ ID NO:18 的可变区具有至少 85%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的氨基酸序列同一性。
- [0054] 在一些实施方案中，重链可变区包含选自 SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列，轻链可变区包含选自 SEQ ID NO:16 和 SEQ ID NO:18 的氨基酸序列。
- [0055] 在一些实施方案中，抗体为 IgG。在一些实施方案中，抗体为 IgG1。在一些实施方案中，抗体的重链与选自 SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:5 的氨基酸具有至少 85%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的序列同一性。在一些实施方案中，抗体的轻链与选自 SEQ ID NO:17 和 SEQ ID NO:19 的氨基酸具有至少 85%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的序列同一性。
- [0056] 在一些实施方案中，抗体为 Fab' 片段。在一些实施方案中，抗体为单链抗体 (scFv)。在一些实施方案中，抗体包含人恒定区。在一些实施方案中，抗体包含人 IgG1 恒定区。在一些实施方案中，将人 IgG1 恒定区突变，使其对例如细胞上的 Fc 受体 (FcR) (例如 Fc $\gamma$ R1) 等效应子配体，或补体的 C1 组分具有降低的结合亲和性。见例如美国专利号 5,624,821。在一些实施方案中，IgG1 恒定区的氨基酸残基 L234 和 L235 被取代为 Ala234 和 Ala235。重链恒定区中残基的编号为 EU 索引 (见, Kabat, 等, (1983) "Sequences of Proteins of Immunological Interest", U.S. Dept. Health and Human Services) 中的编号。
- [0057] 在一些实施方案中，将抗体与载体蛋白 (例如，白蛋白) 连接。
- [0058] 在一些实施方案中，抗体被聚乙二醇化。
- [0059] 在相关方面，本发明提供了与 PCSK9 结合的抗体，其中所述抗体包含重链可变区和轻链可变区，其中重链可变区和轻链可变区各包含下列 3 个互补决定区 (CDRs) :CDR1、

CDR2 和 CDR3 ;其中 :

- [0060] i) 重链可变区的 CDR1 包含 SEQ ID NO:8 的氨基酸序列 ;
- [0061] ii) 重链可变区的 CDR2 包含 SEQ ID NO:11 的氨基酸序列 ;
- [0062] iii) 重链可变区的 CDR3 包含 SEQ ID NO:14 的氨基酸序列 ;
- [0063] iv) 轻链可变区的 CDR1 包含 SEQ ID NO:22 的氨基酸序列 ;
- [0064] v) 轻链可变区的 CDR2 包含 SEQ ID NO:25 的氨基酸序列 ;
- [0065] vi) 轻链可变区的 CDR3 包含 SEQ ID NO:26 的氨基酸序列 ;

[0066] 在一些实施方案中 :

- [0067] i) 重链可变区的 CDR1 包含选自 SEQ ID NO:6 和 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列 ;
- [0068] ii) 重链可变区的 CDR2 包含选自 SEQ ID NO:9 和 SEQ ID NO:10 的氨基酸序列 ;
- [0069] iii) 重链可变区的 CDR3 包含选自 SEQ ID NO:12 和 SEQ ID NO:13 的氨基酸序列 ;
- [0070] iv) 轻链可变区的 CDR1 包含选自 SEQ ID NO:20 和 SEQ ID NO:21 的氨基酸序列 ;
- [0071] v) 轻链可变区的 CDR2 包含选自 SEQ ID NO:23 和 SEQ ID NO:24 的氨基酸序列 ;
- [0072] vi) 轻链可变区的 CDR3 包含 SEQ ID NO:26 的氨基酸序列。

[0073] 在相关方面,本发明提供了与 PCSK9 结合的抗体,其中所述抗体包含重链可变区和轻链可变区,其中重链可变区和轻链可变区各包含下列 3 个互补决定区 (CDRs) :CDR1、CDR2 和 CDR3 ;其中 :

- [0074] i) 重链可变区的 CDR1 包含 SEQ ID NO:6 的氨基酸序列 ;
- [0075] ii) 重链可变区的 CDR2 包含 SEQ ID NO:9 的氨基酸序列 ;
- [0076] iii) 重链可变区的 CDR3 包含 SEQ ID NO:13 的氨基酸序列 ;
- [0077] iv) 轻链可变区的 CDR1 包含 SEQ ID NO:20 的氨基酸序列 ;
- [0078] v) 轻链可变区的 CDR2 包含 SEQ ID NO:23 的氨基酸序列 ;
- [0079] vi) 轻链可变区的 CDR3 包含 SEQ ID NO:26 的氨基酸序列 ;

[0080] 在相关方面,本发明提供了与 PCSK9 结合的抗体,其中所述抗体包含重链可变区和轻链可变区,其中重链可变区和轻链可变区各包含下列 3 个互补决定区 (CDRs) :CDR1、CDR2 和 CDR3 ;其中 :

- [0081] i) 重链可变区的 CDR1 包含 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列 ;
- [0082] ii) 重链可变区的 CDR2 包含 SEQ ID NO:10 的氨基酸序列 ;
- [0083] iii) 重链可变区的 CDR3 包含 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列 ;
- [0084] iv) 轻链可变区的 CDR1 包含 SEQ ID NO:21 的氨基酸序列 ;
- [0085] v) 轻链可变区的 CDR2 包含 SEQ ID NO:24 的氨基酸序列 ;
- [0086] vi) 轻链可变区的 CDR3 包含 SEQ ID NO:26 的氨基酸序列。

[0087] 在相关方面,本发明提供了与 PCSK9 结合的抗体,其中所述抗体包含重链可变区和轻链可变区,其中重链可变区和轻链可变区各包含下列 3 个互补决定区 (CDRs) :CDR1、CDR2 和 CDR3 ;其中 :

- [0088] i) 重链可变区的 CDR1 包含 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列 ;
- [0089] ii) 重链可变区的 CDR2 包含 SEQ ID NO:10 的氨基酸序列 ;
- [0090] iii) 重链可变区的 CDR3 包含 SEQ ID NO:13 的氨基酸序列 ;
- [0091] iv) 轻链可变区的 CDR1 包含 SEQ ID NO:21 的氨基酸序列 ;



[0092] v) 轻链可变区的 CDR2 包含 SEQ ID NO:24 的氨基酸序列；

[0093] vi) 轻链可变区的 CDR3 包含 SEQ ID NO:26 的氨基酸序列。

[0094] 在另一方面,本发明提供了组合物,所述组合物包含如本文中描述的抗体或抗原结合分子,以及生理相容性赋形剂。

[0095] 在一些实施方案中,组合物还包含降低个体中低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 水平的第二药。

[0096] 在一些实施方案中,第二药为他汀类药。例如,该他汀类药可以选自阿托伐他汀 (atorvastatin)、西立伐他汀 (cerivastatin)、氟伐他汀 (fluvastatin)、洛伐他汀 (lovastatin)、美伐他汀 (mevastatin)、匹伐他汀 (pitavastatin)、普伐他汀 (pravastatin)、瑞舒伐他汀 (rosuvastatin) 和辛伐他汀 (simvastatin)。

[0097] 在一些实施方案中,第二药选自贝特类药 (fibrates)、烟酸 (niacin) 及其类似物、胆固醇吸收抑制剂、胆汁酸螯合剂、甲状腺激素模拟物、微粒体甘油三酯转移蛋白 (MTP) 抑制剂、二酰甘油酰基转移酶 (DGAT) 抑制剂、靶向 PCSK9 的抑制性核酸和靶向 apoB100 的抑制性核酸。

[0098] 在另一方面,本发明提供了在有需要的个体中降低 LDL-C、非 HDL-C 和 / 或总胆固醇的方法,所述方法包括给个体施用治疗上有效量的如本文中描述的抗体或抗原结合分子。

[0099] 在一些实施方案中,个体对他汀类药治疗具有低反应性或具有抗性。在一些实施方案中,个体不耐受他汀类药治疗。在一些实施方案中,个体的基线 LDL-C 水平为至少约 100mg/dL,例如,至少约 110、120、130、140、150、160、170、180、190mg/dL 或更高。在一些实施方案中,个体患有家族性高胆固醇血症。在一些实施方案中,个体患有甘油三酯血症 (triglyceridemia)。在一些实施方案中,个体具有功能获得性 (gain-of-function) PCSK9 基因突变。在一些实施方案中,个体患有药物诱发性血脂异常。

[0100] 在一些实施方案中,总胆固醇随 LDL-C 一起降低。

[0101] 在一些实施方案中,方法还包括给个体以治疗上有效的量施用在降低 LDL-C 上有效的第二药。

[0102] 在一些实施方案中,第二药为他汀类药。例如,该他汀类药可以选自阿托伐他汀、西立伐他汀、氟伐他汀、洛伐他汀、美伐他汀、匹伐他汀、普伐他汀、瑞舒伐他汀和辛伐他汀。

[0103] 在一些实施方案中,第二药选自贝特类药 (fibrates)、烟酸 (niacin) 及其类似物、胆固醇吸收抑制剂、胆汁酸螯合剂、甲状腺激素模拟物、微粒体甘油三酯转移蛋白 (MTP) 抑制剂、二酰甘油酰基转移酶 (DGAT) 抑制剂、靶向 PCSK9 的抑制性核酸和靶向 apoB100 的抑制性核酸。

[0104] 在一些实施方案中,将抗体或抗原结合分子与第二药作为混合物共施用。

[0105] 在一些实施方案中,将抗体或抗原结合分子与第二药以分开的方式共施用。

[0106] 在一些实施方案中,抗体进行静脉内给药。在一些实施方案中,抗体进行皮下给药。

[0107] 定义

[0108] “抗体”指免疫球蛋白家族的多肽或包含免疫球蛋白的片段的多肽,其能够非共价地、可逆地和以特异性的方式结合相应的抗原。一个示例性的抗体结构单元包括四聚体。每

个四聚体由相同的两对多肽链组成,每对具有通过二硫键连接的一条“轻”链(约 25kD)和一条“重”链(约 50-70kD)。公认的免疫球蛋白基因包括  $\kappa$ 、 $\lambda$ 、 $\alpha$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$  和  $\mu$  恒定区基因,以及无数的免疫球蛋白可变区基因。轻链分类为  $\kappa$  或  $\lambda$ 。重链分类为  $\gamma$ 、 $\mu$ 、 $\alpha$ 、 $\delta$  或  $\epsilon$ ,它们又分别定义了免疫球蛋白的类别,IgG、IgM、IgA、IgD 和 IgE。每条链的 N 端定义约 100 至 110 个或更多个氨基酸的可变区,其主要负责抗原识别。术语可变轻链(VL)和可变重链(VH)分别指轻链和重链的这些区域。如在本申请中使用的,“抗体”包括具有特异于例如 PCSK9 的特定结合力的、抗体及其片段的所有变型形式。因此,该概念涵盖全长抗体、嵌合抗体、人源化抗体、单链抗体(ScFv)、Fab、Fab' 以及这些片段的具有相同结合特异性的多聚体形式(例如,F(ab')<sub>2</sub>)。

[0109] “互补决定结构域”或“互补决定区(CDRs)”可互换使用,指 VL 和 VH 的超可变区。CDRs 是抗体链的靶标蛋白结合位点,包含对该靶标蛋白的特异性。在每一人的 VL 或 VH 中都有 3 个 CDRs(CDR1-3,从 N 端开始顺序编号),占可变结构域的约 15-20%。CDRs 在结构上与靶标蛋白的表位互补,因此直接负责结合的特异性。VL 或 VH 中其余的区段,即所谓的构架区,在氨基酸序列上显示出较低的变化性(Kuby, Immunology, 第 4 版,第 4 章.W. H. Freeman&Co., New York, 2000)。

[0110] 可以使用各种本领域公知的定义,确定 CDRs 和构架区的位置,例如 Kabat、Chothia、国际 ImMunoGeneTics 数据库(IMGt)(于万维网 [imgt.cines.fr/](http://imgt.cines.fr/) 上)和 AbM(见,例如,Johnson 等,Nucleic Acids Res., 29:205-206(2001);Chothia 和 Lesk, J. Mol. Biol., 196:901-917(1987);Chothia 等,Nature, 342:877-883(1989);Chothia 等,J. Mol. Biol., 227:799-817(1992);Al-Lazikani 等,J. Mol. Biol., 273:927-748(1997))。抗原结合位点的定义也描述于:Ruiz 等,Nucleic Acids Res., 28:219-221(2000);和 Lefranc, M. P., Nucleic Acids Res., 29:207-209(2001);MacCallum 等,J. Mol. Biol., 262:732-745(1996);和 Martin 等,Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:9268-9272(1989);Martin 等,Methods Enzymol., 203:121-153(1991);和 Rees 等,于 Sternberg M. J. E. (编辑),蛋白质结构预测(Protein Structure Prediction),牛津大学出版社,Oxford, 141-172(1996)中。

[0111] 术语“结合特异性决定簇”或“BSD”可互换使用,指决定抗体的结合特异性所必需的互补决定区内最少的连续或非连续的氨基酸序列。最小结合特异性决定簇可以位于一个或多个 CDR 序列中。在一些实施方案中,最小结合特异性决定簇位于抗体重链和轻链的部分或全长 CDR3 序列中(即仅由其决定)。

[0112] 如本文中使用的“抗体轻链”或“抗体重链”指分别包含 VL 或 VH 的多肽。内源 VL 由基因片段 V(可变)和 J(连接)编码,内源 VH 由 V、D(多样性)和 J 编码。每个 VL 或 VH 包括 CDRs 以及构架区。在本申请中,抗体轻链和 / 或抗体重链有时可以统称为“抗体链”。这些术语涵盖包含突变的抗体链,所述突变,如本领域技术人员容易明了的,不干扰 VL 或 VH 的基本结构。

[0113] 抗体可以作为完整的免疫球蛋白存在,或作为多种已被充分表征的片段存在,所述片段通过用各种肽酶进行消化而产生。因此,例如,胃蛋白酶在铰链区中于二硫键下方消化抗体,产生 F(ab)'<sub>2</sub>,即 Fab' 的二聚体,Fab' 本身是通过二硫键连接到 VH-CH1 的轻链。可以在温和条件下还原 F(ab)'<sub>2</sub>,以打开铰链区中的二硫键,由此将 F(ab)'<sub>2</sub> 二聚体转化

为 Fab' 单体。Fab' 单体本质上是具有部分铰链区的 Fab。Paul, *Fundamental Immunology* 第 3 版。(1993)。尽管各种抗体片段是以完整抗体的消化来进行定义的,但本领域技术人员明了,这样的片段可以通过化学方法或使用重组 DNA 方法从头合成。因此,如本文中使用的,术语“抗体”也包括通过完整抗体的修饰而产生的抗体片段,或使用重组 DNA 方法从头合成的抗体片段(例如,单链 Fv)、或使用噬菌体展示文库鉴定的抗体片段(见,例如,McCafferty 等, *Nature* 348:552-554(1990))。

[0114] 可以使用本领域已知的任何技术制备单克隆或多克隆抗体(见,例如, Kohler 和 Milstein, *Nature* 256:495-497(1975); Kozbor 等, *Immunology Today* 4:72(1983); Cole 等, 单克隆抗体和癌症治疗 (*Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*), 第 77-96 页. Alan R. Liss, Inc. 1985)。可以对用于产生单链抗体的技术(美国专利号 4,946,778)进行适应性调整,以产生抗本发明多肽的抗体。也可以使用转基因小鼠或其它生物体(例如其它哺乳动物)来表达人源化抗体。备选地,可以使用噬菌体展示技术来鉴定与所选择的抗原特异结合的抗体和异聚体 Fab 片段(见,例如,McCafferty 等, 同上; Marks 等, *Biotechnology*, 10:779-783, (1992))。

[0115] 用于将非人抗体人源化或灵长类化 (primatizing) 的方法在本领域公知。通常,人源化抗体具有一个或多个从非人来源引入的氨基酸残基。这些非人氨基酸残基常常被称为输入性残基,其一般取自输入性可变结构域。可以基本上按照 Winter 及其同事的方法(见,例如, Jones 等, *Nature* 321:522-525(1986); Riechmann 等, *Nature* 332:323-327(1988); Verhoeyen 等, *Science* 239:1534-1536(1988) 和 Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596(1992)),通过以啮齿类动物的 CDRs 或 CDR 序列替换人抗体的相应序列来进行人源化。因此,这样的人源化抗体是嵌合抗体(美国专利号 4,816,567),其中实质性小于完整的人可变结构域被来自非人物种的相应序列替代。实践中,人源化抗体一般是人抗体,其中一些互补决定区(“CDR”)残基和可能地一些构架区(“FR”)残基被来自啮齿动物抗体中的类似位点的残基替代。

[0116] “嵌合抗体”是这样的抗体分子,其中 (a) 恒定区或其部分被改变、替代或交换,以致抗原结合位点(可变区)连接到具有不同的或改变了的类别、效应子功能和/或物种的恒定区上,或连接到完全不同的分子上,所述分子赋予嵌合抗体新的特性,这些分子例如酶、毒素、激素、生长因子和药物;或 (b) 可变区或其部分被改变、替代或交换为具有不同的或改变了的抗原特异性的可变区。

[0117] 本发明的抗体或抗原结合分子还包括与其它蛋白质化学缀合或表达为融合蛋白的一个或多个免疫球蛋白链。也包括双特异性抗体。双特异性或双功能抗体是人工杂种抗体,其具有不同的两对重/轻链和两个不同的结合位点。本发明的其它抗原结合片段或抗体部分包括二价 scFv (diabody)、双特异性 scFv 抗体(其中该抗体分子识别两个不同的表位)、单结合结构域 (dAbs) 和微型抗体 (minibodies)。

[0118] 本文中描述的各种抗体或抗原结合片段可以通过对完整抗体的酶促或化学修饰来产生,或使用重组 DNA 方法从头合成(例如,单链 Fv),或使用噬菌体展示文库来鉴定(见,例如,McCafferty 等, *Nature* 348:552-554, 1990)。例如,可以使用本领域描述的方法,例如 Vaughan 和 Sollazzo, *Comb Chem High Throughput Screen.* 4:417-302001,产生微型抗体。可以通过多种方法产生双特异性抗体,所述方法包括杂交瘤的融合或 Fab' 片段的

连接。见,例如 Songsivilai 和 Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.* 79:315-321 (1990); Kosteln y 等, *J. Immunol.* 148, 1547-1553 (1992)。可以使用噬菌体展示文库、核糖体展示文库、或基因改组文库,鉴定单链抗体。这样的文库可以从合成的、半合成的或天然的具免疫能力的来源构建。

[0119] “嵌合抗体”是这样的抗体分子,其中 (a) 恒定区或其部分被改变、替代或交换,以致抗原结合位点(可变区)连接到具有不同的或改变了的类别、效应子功能和/或物种的恒定区,或连接到完全不同的分子,所述分子赋予嵌合抗体新的特性,这些分子例如酶、毒素、激素、生长因子和药物等;或 (b) 可变区或其部分被改变、替代或交换为具有不同的或改变了的抗原特异性的可变区。例如,如下文实施例中所示,小鼠抗 PCSK9 抗体可以通过将用来自人免疫球蛋白的恒定区替代其恒定区,进行修饰。由于用人恒定区进行替代,嵌合抗体能保留其识别人 PCSK9 的特异性,而与原来的鼠抗体相比较,其在人中的抗原性降低。

[0120] 术语“抗原结合分子”或“非抗体配体”指使用非免疫球蛋白的蛋白质支架的抗体模拟物,其包括 adnectins、avimers、单链多肽结合分子和抗体样结合拟肽。

[0121] 术语“可变区”或“V 区”可互换使用,指包含 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 的重链或轻链。见图 1。内源可变区由免疫球蛋白重链 V-D-J 基因或轻链 V-J 基因编码。V 区可以是天然存在的、重组的或合成的。

[0122] 如本文中使用的,术语“可变片段”或“V 片段”可互换使用,指包括 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3 的可变区子序列。见图 1。内源 V 片段由免疫球蛋白 V 基因编码。V 片段可以是天然存在的、重组的或合成的。

[0123] 如本文中使用的,术语“J 片段”指编码的可变区的子序列,其包含 CDR3 和 FR4 的 C 端部分。内源 J 片段由免疫球蛋白 J 基因编码。见图 1。J 片段可以是天然存在的、重组的或合成的。

[0124] “人源化”抗体是保留了非人抗体的反应性而在人中具有较低的免疫原性的抗体。这可以例如通过保留非人 CDR 区和将抗体的其余部分用它们的人对应物进行替代来实现。见,例如, Morrison 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984); Morrison 和 Oi, *Adv. Immunol.*, 44:65-92 (1988); Verhoeyen 等, *Science*, 239:1534-1536 (1988); Padlan, *Molec. Immun.*, 28:489-498 (1991); Padlan, *Molec. Immun.*, 31(3):169-217 (1994)。

[0125] 术语“相应的人种系序列”指编码人可变区氨基酸序列或子序列的核酸序列,该编码的可变区氨基酸序列或子序列,与所有其它已知的由人种系免疫球蛋白可变区序列编码的可变区氨基酸序列相比,与参考可变区氨基酸序列或子序列具有最高的确定的氨基酸序列同一性。相应的人种系序列也可以指,该人可变区氨基酸序列或子序列,与所有其它评估的可变区氨基酸序列相比,与参考可变区氨基酸序列或子序列具有最高氨基酸序列同一性。相应的人种系序列可以是仅构架区,仅互补决定区,构架区和互补决定区,可变片段(如上文定义的),或是包含可变区的序列或子序列的其它组合。序列同一性可以使用本文中描述的方法来确定,例如使用 BLAST、ALIGN 或本领域所知的其它比对算法来比对两条序列。相应的人种系核酸或氨基酸序列可以与参考可变区核酸或氨基酸序列具有至少约 90%、92%、94%、96%、98%、99% 的序列同一性。相应的人种系序列可以通过例如可公开获取的国际 ImMunoGeneTics 数据库 (IMGT) (在万维网 [imgt.cines.fr/](http://imgt.cines.fr/) 上) 和 V-base (在万维网 [vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk](http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk) 上) 来确定。

[0126] 在描述抗原（例如蛋白质）和抗体或源自抗体的结合剂之间的相互作用的上下文中使用时，词组“特异地（或选择地）结合”指，在异质性蛋白质群体或其它生物制品，例如生物样品（例如血液、血清、血浆或组织样品）中，确定抗原存在的结合反应。因此，在指定的免疫测定条件下，具有特定的结合特异性的抗体或结合剂与特定的抗原的结合至少两倍于背景，并且该抗体或结合剂基本上不与样品中存在的其它抗原产生显著量的结合。在这样的条件下与抗体或结合剂的特异性结合，可能需要该抗体或结合剂已经针对其对特定蛋白质的特异性进行过选择。如期望的或适当的，该选择可以通过扣除掉与例如来自其它物种（例如小鼠）的 PCSK9 分子或其它的 PCSK 亚型交叉反应的抗体来实现。可以使用多种免疫测定方式来选择与特定蛋白质产生特异免疫反应的抗体。例如，固相 ELISA 免疫测定被常规用于选择与特定蛋白质产生特异免疫反应的抗体（关于可用来确定特异性免疫反应的免疫测定方式和条件的描述，见例如，Harlow 和 Lane, *Using Antibodies, A Laboratory Manual* (1998)）。典型地，特异性或选择性结合反应产生的信号将至少两倍于背景信号，更典型地至少 10 至 100 倍于背景。

[0127] 术语“平衡解离常数 ( $K_D$ , M)”指解离速率常数 ( $k_d$ , 时间<sup>-1</sup>) 除以结合速率常数 ( $k_a$ , 时间<sup>-1</sup>, M<sup>-1</sup>)。可以使用本领域任何已知的方法来测定平衡解离常数。本发明的抗体的平衡解离常数通常小于约  $10^{-7}$  或  $10^{-8}$ M, 例如小于约  $10^{-9}$ M 或  $10^{-10}$ M, 在一些实施方案中, 小于约  $10^{-11}$ M、 $10^{-12}$ M 或  $10^{-13}$ M。

[0128] 如本文中使用的，术语“抗原结合区”指本发明的 PCSK9 结合分子中负责该分子和 PCSK9 之间的特异性结合的结构域。抗原结合区包括至少一个抗体重链可变区和至少一个抗体轻链可变区。在本发明的每个 PCSK9 结合分子中都存在至少一个这样的抗原结合区，每一个抗原结合区可以与其它抗原结合区相同或不同。在一些实施方案中，本发明的 PCSK9 结合分子的至少一个抗原结合区起 PCSK9 的拮抗剂的作用。

[0129] 如本文中使用的，术语“拮抗剂”指能够特异地与靶标分子结合和抑制其活性的试剂。例如，PCSK9 的拮抗剂特异地与 PCSK9 结合，完全或部分地抑制 PCSK9 介导的 LDLR 降解。抑制 PCSK9 介导的 LDLR 降解可以干扰或不干扰 PCSK9 与 LDLR 的结合。在某些情况下，可以通过其与 PCSK9 结合和抑制 PCSK9 与 LDLR 结合的能力来鉴定 PCSK9 拮抗剂。当暴露于本发明的拮抗剂时，如果 PCSK9 介导的 LDLR 降解，与存在对照或缺乏拮抗剂时的 PCSK9 介导的降解相比，低至少约 10%，例如低至少约 25%、50%、75% 或完全被抑制，则发生了抑制。可以使对照不暴露于抗体或抗原结合分子、或暴露于特异结合另一抗原的抗体或抗原结合分子、或已知不起拮抗剂作用的抗 PCSK9 抗体或抗原结合分子。“抗体拮抗剂”指拮抗剂是抑制性抗体的情况。

[0130] 术语“PCSK9”或“蛋白原转化酶枯草溶菌素 /kexin 型 9a”可互换使用，指天然存在的、属于分泌型枯草杆菌酶 (subtilase) 家族的蛋白酶 K 亚家族的人蛋白原转化酶 (proprotein convertase)。PCSK9 作为可溶性酶原合成，其在内质网中经历自催化的分子内加工，被认为作为蛋白原转化酶发挥功能。PCSK9 在胆固醇的体内稳态中起作用，并可能在皮层神经元的分化中起作用。PCSK9 基因的突变已经与常染色体显性家族性高胆固醇血症相关。见，例如，Burnett 和 Hooper, *Clin Biochem Rev* (2008) 29(1):11-26。已知 PCSK9 的核酸和氨基酸序列，其分别以 GenBank 登录号 NM\_174936.2 和 NP\_777596.2 公布。如本文中使用的，PCSK9 多肽功能性地与 LDLR 结合和促进 LDLR 降解。在结构上，PCSK9 的氨基

酸序列与 GenBank 登录号 NP 777596.2 的氨基酸序列具有至少约 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 的序列同一性。在结构上, PCSK9 的核酸序列与 GenBank 登录号 NM\_174936.2 的核酸序列具有至少约 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 的序列同一性。

[0131] 词组“PCSK9 功能获得性突变”指存在于 PCSK9 基因中的天然突变, 该突变, 例如由于增强的 LDLR 降解和 LDLR 水平的降低, 与家族性高胆固醇血症表型、加速的动脉粥样硬化和早发冠心病 (premature coronary heart disease) 相关和 / 或是其产生的原因。PCSK9 功能获得性突变的等位基因频率极低。见, Burnett 和 Hooper, Clin Biochem Rev. (2008) 29(1):11-26。示例性 PCSK9 功能获得性突变包括 D129N、D374H、N425S 和 R496W。见, Fasano, 等, Atherosclerosis (2009) 203(1):166-71。在例如 Burnett 和 Hooper, 同上; Fasano, 等, 同上; Abifadel, 等, J Med Genet (2008) 45(12):780-6; Abifadel, 等, Hum Mutat (2009) 30(4):520-9; 和 Li, 等, Recent Pat DNA Gene Seq (2009) Nov. 1 (PMID 19601924) 中, 对 PCSK9 功能获得性突变进行了综述。

[0132] 本发明的多肽的“活性”指多肽在其天然细胞或组织中的结构性、调节性或生化的功能。多肽活性的实例包括直接活性和间接活性。示例性的 PCSK9 直接活性是与该多肽直接相互作用的结果, 包括与 LDLR 结合和 PCSK9 介导的 LDLR 降解。在 PCSK9 的情况中, 观察到的示例性间接活性可以为: 细胞、组织、器官或个体中对多肽的直接活性的反应或表型的改变, 例如, 降低增加了的肝脏 LDLR、降低的血浆 HDL-C、降低的血浆胆固醇、增强对他汀类药的敏感性。

[0133] 当用于核酸或蛋白质时, 术语“分离的”表示核酸或蛋白质基本上没有在天然状态下与其相关的其它细胞组分。其优选处于同质状态。它可以是干燥的或水溶液的形式。通常使用分析化学技术, 例如聚丙烯酰胺凝胶电泳或高效液相色谱法来测定纯度和同质性。在存于制剂中的物类中占绝大多数的蛋白质是基本上纯化的。特别地, 分离的基因是与位于基因侧翼、编码非目的基因的蛋白质的开放阅读框分开的。术语“纯化的”表示核酸或蛋白质在电泳凝胶中形成基本上一条带。特别地, 它意味着核酸或蛋白质的纯度为至少 85%, 更优选为至少 95%, 和最优选为至少 99%。

[0134] 术语“核酸”或“多核苷酸”指脱氧核糖核酸 (DNA) 或核糖核酸 (RNA) 及其聚合物, 以单链或双链形式存在。除非特地加以限定, 该术语涵盖包含天然核苷酸的已知类似物的核酸, 所述类似物具有与参考核酸类似的结合特性, 并且以与天然存在的核苷酸类似的方式代谢。除非另有说明, 特定的核酸序列也隐含地包括其保守性修饰变体 (例如, 简并密码子替代)、等位基因、直向同源物、SNPs 和互补序列, 以及明确指出的序列。特别地, 可以通过产生其中一个或多个选择的 (或所有) 密码子的第 3 位被混合碱基和 / 或脱氧肌苷残基替代的序列, 实现简并密码子替代 (Batzer 等, Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsuka 等, J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985); 和 Rossolini 等, Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994))。

[0135] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用, 指氨基酸残基的聚合体。这些术语适用于其中一个或多个氨基酸残基为相应的天然存在的氨基酸的人工化学模拟物的氨基酸聚合体, 以及适用于天然存在的氨基酸聚合体和非天然存在的氨基酸聚合体。

[0136] 术语“氨基酸”指天然存在的和合成的氨基酸, 以及以与天然存在的氨基酸类似的

方式起作用的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸是那些由遗传密码编码的氨基酸,以及那些其后经过修饰的氨基酸,例如羟脯氨酸、 $\gamma$ -羧基谷氨酸和 O-磷酸丝氨酸。氨基酸类似物指具有与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构(即,与氢、羧基、氨基、和 R 基团结合的  $\alpha$ -碳)的化合物,例如高丝氨酸、正亮氨酸、蛋氨酸亚砷、蛋氨酸甲基硫。这样的类似物具有经修饰的 R 基团(例如,正亮氨酸)或经修饰的肽主链,但保留了和天然存在的氨基酸相同的基本化学结构。氨基酸模拟物指具有与氨基酸的常规化学结构不同的结构,但以与天然存在的氨基酸类似的方式起作用的化合物。

[0137] “保守性修饰变体”适用于氨基酸和核酸序列。就特定的核酸序列而言,保守性修饰变体指那些编码相同或基本相同氨基酸序列的核酸,或在核酸不编码氨基酸序列时,指基本相同的序列。因为遗传密码的简并性,任何给定的蛋白质可以由很多功能上相同的核酸编码。例如,密码子 GCA、GCC、GCG 和 GCU 都编码氨基酸丙氨酸。因此,在每一个规定丙氨酸的密码子位置,该密码子可以被改变成任何所述相应的密码子而不改变所编码的多肽。这样的核酸变异是“沉默变异”,它是保守性修饰变异中的一种。本文中每一个编码多肽的核酸序列也描述了该核酸的每一个可能的沉默变异。本领域技术人员知道,可以对核酸中的每个密码子(除 AUG 以外,它通常是甲硫氨酸的唯一密码子;以及 TGG,它通常是色氨酸的唯一密码子)进行修饰,以产生功能上相同的分子。因此,在每一个所描述的编码多肽的核酸序列中,暗含该核酸的每个沉默变异。

[0138] 关于氨基酸序列,本领域技术人员知道,对于在编码序列中导致单个氨基酸或小百分比氨基酸的改变、添加或缺失的、核酸、肽、多肽或蛋白质序列中的单替代、缺失或添加,当该改变导致氨基酸被其化学上类似的氨基酸替代时,则是“保守性修饰变体”。提供功能类似的氨基酸的保守性替代表在本领域公知。这样的保守性修饰变体是对本发明的多态性变体、种间同源物和等位基因的补充且不排斥它们。

[0139] 下列 8 组各包含相互为保守性替代的氨基酸:1) 丙氨酸(A),甘氨酸(G);2) 天冬氨酸(D),谷氨酸(E);3) 天冬酰胺(N),谷氨酰胺(Q);4) 精氨酸(R),赖氨酸(K);5) 异亮氨酸(I),亮氨酸(L),甲硫氨酸(M),缬氨酸(V);6) 苯丙氨酸(F),酪氨酸(Y),色氨酸(W);7) 丝氨酸(S),苏氨酸(T);和 8) 半胱氨酸(C),甲硫氨酸(M)(见,例如,Creighton,Proteins(1984))。

[0140] 通过在比较窗口内比较两个最佳比对的序列来确定“序列同一性百分比”,其中为了两条序列的最佳比对,与不包含添加或缺失的参考序列(例如,本发明的多肽)相比,比较窗口中的多核苷酸序列的部分可以包含添加或缺失(即,空位)。百分比这样来计算:确定在两条序列中出现的相同核酸碱基或氨基酸残基的位置的数量,以获得匹配位置的数量,用匹配位置的数量除以比较窗口中位置的总数,将结果乘以 100,以获得序列同一性的百分比。

[0141] 在两个或多个核酸或多肽序列的上下文中,术语“同一的”或百分比“同一性”指两条或更多条序列或子序列为相同的序列。当在比较窗口或指定区域内进行比较和比对,按照下列序列比较算法之一或通过手工比对和目测确定,获得最大对应性时,如果两条序列具有规定百分比的相同氨基酸残基或核苷酸(即,在规定区域中,或当没有规定时,在参考序列的整个序列中,70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%的序列相同),这两条序列是“基本相同的”。本发明提供了分别与本文中示例的多肽或多核苷酸(例如,SEQ

ID NOS:1-5、15-19 和 40-41 之任一示例的可变区;SEQ ID NOS:27-31 之任一示例的可变片段;SEQ ID NOS:6-14、20-26 之任一示例的 CDRs;SEQ ID NOS:32-39 之任一示例的 FRs;和 SEQ ID NOS:42-45 之任一示例的核酸序列)基本相同的多肽或多核苷酸。可选地,同一性存在于长度为至少约 15、25 或 50 个核苷酸的区域,或更优选地于长度为 100 至 500 个或 1000 个或更多个核苷酸的区域,或于参考序列的全长中。就氨基酸序列而言,同一性或基本同一性可以存在于长度为至少 5、10、15 或 20 个氨基酸的区域,任选于长度为至少约 25、30、35、40、50、75 或 100 个氨基酸的区域,任选于长度为至少约 150、200 或 250 个氨基酸的区域,或于参考序列的全长区域中。就较短的氨基酸序列而言,例如 20 个或更少氨基酸的氨基酸序列,当根据本文中定义的保守性替代,一个或两个氨基酸残基进行了保守性替代时,存在基本同一性。

[0142] 对于序列比较,一般将一条序列作为参考序列,将测试序列与其进行比较。在使用序列比较算法时,将测试和参考序列输入计算机,如果需要的话,指定子序列的坐标,然后指定序列算法程序参数。可以使用默认的程序参数,或可以指定可选参数。然后,序列比较算法基于程序参数,计算测序序列相对于参考序列的百分比序列同一性。

[0143] 如本文中使用的,“比较窗口”包括选自 20 至 600、通常约 50 至约 200、更通常约 100 至约 150 个的连续位置数之任一的区段,在该区段中可以将一个序列与相同连续位置数的参考序列,在两条序列经过最优比对后,进行比较。用于比较的序列比对方法在本领域公知。可以例如通过 Smith 和 Waterman 的局部同源算法 (Needleman 和 Wunsch(1970)Adv. Appl. Math. 2:482c),通过 Needleman 和 Wunsch 的同源比对算法 (Needleman 和 Wunsch(1970)J. Mol. Biol. 48:443),通过 Pearson 和 Lipman 的相似性搜索方法 (Pearson 和 Lipman(1988)Proc. Nat' l. Acad. Sci. USA 85:2444),通过计算机执行这些算法 (Wisconsin 遗传学软件包中的 GAP、BESTFIT、FASTA 和 TFASTA, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI),或通过手工比对和目测(见,例如 Ausubel 等, Current Protocols in Molecular Biology(1995 增刊)),进行用于比较的序列最优比对。

[0144] 适用来确定百分比序列同一性和序列相似性的算法的两个例子是 BLAST 和 BLAST 2.0 算法,其分别描述于 Altschul 等 (1977)Nuc. Acids Res. 25:3389-3402 和 Altschul 等 (1990)J. Mol. Biol. 215:403-410 中。用于执行 BLAST 分析的软件可从美国国家生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information) 公开获取。该算法包括,首先通过鉴别查询序列中长度为 W 的如下短字来鉴别高分值序列对 (HSPs),其中所述短字在与数据库序列中同样长度的字进行比对时,匹配或满足一定的正值阈值分值 T。T 被称为邻近字分值阈值 (Altschul 等, 同上)。这些初始的邻近字命中物作为种子启动搜索来寻找包含它们的更长的 HSPs。只要累积比对分值可以增加,字命中物就沿着每条序列在两个方向进行延伸。对于核苷酸序列,使用参数 M(给一对匹配残基的奖分;总是大于 0)和 N(给错配残基的罚分;总是小于 0),计算累积分值。对于氨基酸序列,使用打分矩阵计算累积分值。当累积比对分值从其所达到的最大值降低了数量 X,或由于一个或多个负得分残基比对的累积而使累积分值变为 0 或以下,或到达任何一条序列的末端时,终止字命中物在每个方向上的延伸。BLAST 算法参数 W、T 和 X 决定比对的灵敏度和速度。BLASTN 程序(用于核苷酸序列)使用字长 (W) 为 11、期望值 (E) 为 10、M=5、N=-4 和双链比较,作为默认值。



对于氨基酸序列, BLASTP 程序使用字长为 3、期望值 (E) 为 10 和 BLOSUM62 打分矩阵 (见 Henikoff 和 Henikoff(1989)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915) 比对 (B) 为 50、期望值 (E) 为 10、M=5、N=-4 和双链比较, 作为默认值。

[0145] BLAST 算法也执行两条序列之间相似性的统计学分析 (见, 例如, Karlin 和 Altschul(1993)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787)。BLAST 算法提供的对相似性的一种度量是最小加和概率 (P(N)), 该概率指示两条核苷酸或氨基酸序列之间因偶然而发生匹配的概率。例如, 如果在测试核酸与参考核酸的比较中, 最小加和概率小于约 0.2, 更优选小于约 0.01, 最优选小于约 0.001, 则该测试核酸被视为与参考序列相似。

[0146] 两条核酸序列或多肽基本相同的一个指示是, 如下文所描述的, 由第一个核酸编码的多肽可以与抗第二个核酸编码的多肽所产生的抗体起免疫交叉反应。因此, 例如, 当两个多肽仅因保守性替代而不同时, 通常地, 两个多肽是基本相同的。两条核酸序列基本相同的另一个指示是, 如下文所描述的, 这两个分子或其互补体在严紧条件下互相杂交。两条核酸序列基本相同的另一个指示是, 可以使用相同的引物来扩增序列。

[0147] 当在描述抗原结合区在本发明的 PCSK9 结合分子中如何连接的上下文中使用时, 术语“连接”涵盖用于使这些区域在物理上接合的所有可能的手段。许多抗原结合区常通过化学键例如共价键 (例如, 肽键或二硫键) 或非共价键来接合, 所述化学键可以是直接键 (即, 在两个抗原结合区之间没有接头) 或间接键 (即, 在两个或更多个抗原结合区之间借助于至少一个接头分子)。

[0148] 术语“受试者”、“患者”和“个体”可互换使用, 指哺乳动物, 例如人或非人的灵长类哺乳动物。哺乳动物也可以是实验室哺乳动物, 例如小鼠、大鼠、兔、仓鼠。在一些实施方案中, 哺乳动物可以是农用哺乳动物 (例如, 马、绵羊、牛、猪、骆驼科动物) 或驯养哺乳动物 (例如, 犬, 猫)。

[0149] 术语“治疗可接受量”或“治疗有效剂量”可互换使用, 指足够产生预期效果 (即, 降低血浆非 HDL-C、高胆固醇血症、动脉粥样硬化、冠心病) 的量。在一些实施方案中, 治疗可接受量不诱导或造成不期望的副作用。可以通过先施用低剂量, 然后递增地增加该剂量直到获得预期效果, 以确定治疗可接受量。本发明的 PCSK9 拮抗抗体的“预防有效剂量”和“治疗有效剂量”可以分别防止与 PCSK9 存在相关的疾病症状 (例如, 高胆固醇血症) 的发作或降低其严重性。所述术语也可以分别促进或增加无疾病症状期的频率和持续时间。“预防有效剂量”和“治疗有效剂量”也可以分别预防或改善因 PCSK9 活性引起的失调和疾病所导致的伤害或残疾。

[0150] 术语“共用药 / 共施用”指两种活性剂在个体的血管中同时存在。可以同时或顺序地给予共用药 / 共施用的活性剂。

[0151] 如本文中使用的, 词组“基本由...组成”指包括在方法或组合物中的活性药剂的类 (genera) 或种 (species), 以及对方法或组合物的预期目的无活性的任何赋形剂。在一些实施方案中, 词组“基本由...组成”明确地排除包括一种或多种非本发明的抗 PCSK9 抗体拮抗剂的其它活性剂的情况。在一些实施方案中, 词组“基本由...组成”明确地排除包括一种或多种非本发明的抗 PCSK9 抗体拮抗剂的其它活性剂和第二共施用剂的情况。

[0152] 术语“他汀类药”指作为 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A (HMG-CoA) 还原酶的竞争性抑制剂的一类药剂。

## 附图说明

[0153] 图 1 示例了亲本小鼠单克隆抗体 NVP-LFU720 的重链 (SEQ ID NO:1) 和轻链 (SEQ ID NO:15) 氨基酸序列。CDR1、CDR2 和 CDR3 的序列以加下划线和加粗表示。

[0154] 图 2 示例了亲本小鼠单克隆抗体 NVP-LGT209 的重链 (SEQ ID NO:2) 和轻链 (SEQ ID NO:16) 氨基酸序列。CDR1、CDR2 和 CDR3 的序列以加下划线和加粗表示

[0155] 图 3 示例了亲本小鼠单克隆抗体 NVP-LGT210 的重链 (SEQ ID NO:2) 和轻链 (SEQ ID NO:18) 氨基酸序列。CDR1、CDR2 和 CDR3 的序列以加下划线和加粗表示

[0156] 图 4 示例了亲本小鼠单克隆抗体 NVP-LGT211 的重链 (SEQ ID NO:4) 和轻链 (SEQ ID NO:16) 氨基酸序列。CDR1、CDR2 和 CDR3 的序列以加下划线和加粗表示

[0157] 图 5A-C 示例了, 与 NVP-LFU720-NX-4 相比, NVP-LGT209 (A)、NVP-LGT210 (B) 和 NVP-LGT-211 (C) 和几种不同的人和小鼠抗原的结合的 ELISA 试验测定。

[0158] 图 6A-C 示例了在 ELISA 中, NVP-LGT209 (A)、NVP-LGT210 (B) 和 NVP-LGT-211 (C) 与人和 cyno 的 Pcsk9 的结合。二抗为山羊抗小鼠抗体, 按 1:5000 稀释。“仅二抗”(“2nd only”) 为单独二抗对照。

[0159] 图 7 示例了亲本小鼠单克隆抗体 NVP-LFU720 与 PCSK9 的 C 末端第 680-692 位残基 (RSRHLAQASQELQ; SEQ ID NO:49) 结合。Humaneered™ 抗体 LGT209、LGT210 和 LGT211 竞争相同的表位。C 端突变体 A685X=SEQ ID NO:56。

[0160] 图 8 示例了, 如在时间分辨荧光共振能量转移 (TR-FRET) 生化试验中测定的, 亲本小鼠抗体 NVP-LFU720 (5P20) 对 PCSK9 和 LDL-R 间相互作用的破坏很差。相比之下, 13C10 以 50nM 的 IC<sub>50</sub> 破坏 PCSK9-LDL-R FRET 相互作用。将以荧光团标记的人 PCSK9 (hPCSK9-AF), 与 NVP-LFU720-AX-1 或 13C10, 在试验缓冲液 (20mM HEPES, pH 7.2, 150mM NaCl, 1mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1%v/v 吐温 20, 和 0.1%w/v BSA) 中, 于室温孵育 30 分钟。接着, 加入铈标记的 LDL-R (hLDL-R-Eu), 于室温再孵育 90 分钟, 以使最终浓度为 8nM 的 hPcsk9-AF 和 1nM 的 hLDL-R-Eu。以平板读取器 (EnVision 2100, Perkin Elmer) 测量 TR-FRET 信号 (330nm 处激发, 665nm 处发射), 计算存在 5P20 或 13C10 时的百分比 (%) 抑制。通过在 Prism (GraphPad) 中绘制百分比抑制值的曲线来计算 IC<sub>50</sub> 值。每个数据点代表平均值 ±SD (每个点 n=4 个重复)。数据为至少两个独立实验的代表。

[0161] 图 9 示例了 Humaneered™ 抗体 LGT209、LGT210 和 LGT211 与小鼠抗体 LFU720 在导致增加的 LDL-R 水平和 HepG2 细胞的 LDL 摄取上是等效的。为了测量 LDL-R, 将细胞与 PCSK-9 结合抗体一起孵育, 以抗 LDL-R 抗体进行标记。对于 LDL 摄取, 将细胞与 PCSK9 结合抗体、PCSK9 和 DiI-LDL 一起孵育。用流式细胞计测量 LDL-R 抗体和 DiI-LDL 荧光。对于每个试验, 显示重复测量的平均值 +SEM。结果为 3 次独立实验的代表。

[0162] 对于 LDL 摄取试验, 将 PCSK9 结合抗体在含 10% 的胎牛无脂蛋白血清 (Intracel) 和 200nM 人 PCSK9 (Hampton 等. PNAS (2007) 104:14604-14609) 的 DMEM 中, 于室温孵育 30 分钟, 将抗体 /PCSK9/ 培养基溶液加到 96 孔板的孔中, 孵育过夜。第二天, 加入 1, 1'-双十八烷基-3, 3', 3'-四甲基-吡啶羧花青高氯酸盐标记的 LDL (DiI-LDL, Biomedical Technologies), 再孵育 2 小时。然后吸去培养基, 以 PBS 将细胞洗 3 次, 用 0.25% 的胰蛋白酶-EDTA 溶解细胞。然后将细胞转移到 FACS 缓冲液 (含 5% 胎牛血清、2mM EDTA 和 0.2% 叠

氯化钠的PBS)中,于1000x g离心10分钟,吸去液体,以1%的多聚甲醛固定。使用流式细胞计(Becton Dickinson LSR II),通过细胞的DiI荧光(488nm处激发,575nm处发射)测量LDL摄取。为了进行表面LDL-R测定,将细胞与含抗体的无血清培养基一起孵育,以PBS洗涤,用Versine(Biowhittaker, 17-771E)和FACS缓冲液收获细胞。将细胞转移到新的平板中,于1200rpm离心5分钟,用正常兔IgG(MP biomedical)进行封闭。于FACS缓冲液中以兔抗hLDL-R-Alexa 647IgG(5 μg/ml)标记的抗体标记细胞,离心,洗涤,以1%的多聚甲醛固定。通过流式细胞计(488nm处激发,633nm处发射)测量表面LDL-R。用Prism(GraphPad)计算EC50。

[0163] 图10提供了用于确定本发明抗体降低胆固醇效果的人PCSK9输注小鼠模型的研究设计示意图。LGT209、LGT210和LGT211为Humaneered™抗PCSK9抗体,它们与hPCSK9以高亲和力结合,与鼠PCSK9没有可检测的结合。为了测试LGT209、LGT210或LGT211是否能够抑制hPCSK9介导的非HDL胆固醇升高和阻止PCSK9介导的肝脏LDLR降解,在含有hPCSK9的微型渗透泵植入(用于连续输注)之前3小时,将各个抗体注射到小鼠中。在hPCSK9注射后24小时,采集血浆和肝脏组织。

[0164] 图11显示以抗体LGT209、LGT210和LGT211治疗导致了输注小鼠模型中人PCSK9(“hPCSK9”)的积累。简言之,通过使用mAb 7D16进行捕获,以ELISA测定总的hPCSK9。mAb 7D16与LGT209、LGT210和LGT211结合PCSK9上的不同表位,能够用于测量总的(游离的和结合的)PCSK9。所观察到的总hPCSK9的增加可能是由于hPCSK9/Ab复合物的增加。通过使用hPCSK9进行捕获,以ELISA来测定游离的抗体。该测定测量了“游离的”抗体并可以度量1:1的Ab:PCSK9复合物。用仅媒介物、仅PCSK9、PCSK9+20mg/kg LGT210、PCSK9+20mg/kgNVP-LGT211、或小鼠非特异性IgG混合物(阴性对照),处理C57BL/6小鼠。绘制数据点图,用水平条界定平均值;视p<0.05为显著。

[0165] 通过Meso Scale Discovery(MSD)试验,定量血浆IgG水平。使用hPCSK9进行捕获,测量了游离抗体。该测定测量了“游离的”抗体并可以度量1:1的Ab:PCSK9复合物。对于IgG MSD测定,使用MSD标准96孔板(L11XA-3)。简言之,以25至28 μl的捕获抗原PCSK9-His(1 μg/ml,于PBS中)包被平板(25-28ng孔),于4℃过夜。除去包被溶液,每孔以150 μl 5%的MSD Blocker A(R93AA-2)封闭平板,于室温摇动1小时。以300 μl的PBS+0.05%吐温20洗涤平板3次,加入25 μl的IgG校准物稀释液(以MSD blocker A进行从10,000至0.0003ng/ml的10个系列稀释)、未知的血浆样品稀释液(以MSD blocker A稀释10,000X)、或质量控制样品,于室温下摇动孵育1小时。洗涤后,每孔加入25 μl 1 μg/ml的检测抗体(MSD羊抗鼠SULFO-TAG标记的检测抗体R32AC-5,以1%BSA/PBS/0.05%吐温20稀释),于室温摇动孵育1小时。洗涤后,每孔加入150 μl 1X读取缓冲液T,立即在MSD SECTOR Imager 6000上读取平板。使用MSD数据分析软件,绘制标准曲线和计算未知样品。

[0166] 通过Meso Scale Discovery(MSD)试验,定量了血浆IgG和hPCSK9水平。MSD hPCSK9测定与IgG测定类似,但有以下例外。以25-28 μl的捕获抗体(7D16.C3:2.95mg/ml)以1 μg/ml包被平板。mAb 7D16与LGT209、LGT210和LGT211结合PCSK9上不同的表位,其可用于测量总的(游离的和结合的)PCSK9。封闭平板后,将25 μl的hPCSK9校准物稀释液(从10,000至0.0003ng/ml的10个点)和血浆样品稀释液(以MSDblocker A稀释10,000X)于室温下摇动孵育1小时,然后与第一检测抗体(家兔ID#RB11835中,

兔抗 PCSK9 多克隆抗体 Ab4) 一起孵育。在用 MSD SECTOR Imager 6000 进行读取之前, 添加一个与第二检测抗体 (MSD 羊抗兔 SULFO-TAG 标记的检测抗体 R32AB-5) 的孵育步骤。所观察到的总 hPCSK9 的增加可能是由于 hPCSK9/Ab 复合物的增加引起。使用 GraphPad Prism 4.02 (GraphPad 软件, San Diego, CA) 进行统计分析。采用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 来分析组的差异, 当发现了总体差异时, 使用 Newman-Keuls 事后检验 (Newman-Keuls post hoc test) 确定处理组间的特定差异。

[0167] 图 12 说明抗体 LGT209、LGT210 和 LGT211 导致输注小鼠模型中肝脏 LDL-R 免受 hPCSK9 介导的降解。用仅媒介物、仅 PCSK9、PCSK9+20mg/kg LGT210、PCSK9+20mg/kg NVP-LGT211、或小鼠非特异性 IgG 混合物 (阴性对照), 处理 C57BL/6 小鼠。显示来自各个体动物的肝脏样品。

[0168] 使用 20 泳道 4-12%Bis-Tris Invitrogen Midi 胶 (Invitrogen WG1402BX10) 和 MOPS 电泳缓冲液 (Invitrogen NP0001), 对血浆膜样品进行聚丙烯酰胺凝胶电泳。将准备好的样品于 70°C 加热 10 分钟, 置于冰上, 然后使用点阵多通道移液器将每个样品各 10  $\mu$ l 点样到胶上。与样品一起点加 SeeBlue Plus2 标记 (Invitrogen LC5925), 用于确定大小和胶的方向。在 200V 恒压下电泳凝胶, 直到染料的前缘到达胶的底部。电泳后, 使用 iBlot 装置 (Invitrogen IB1001EU), 将胶向硝化纤维素膜 (Invitrogen IB3010-01) 转移。以 20V 进行 7 分钟转移。转移后, 以 Pierce Superblock T20 (Pierce 37536) 封闭膜至少 30 分钟。将膜置入“seal-a-meal”袋中, 加入于 Superblock 中的兔抗 LDLR 抗体 1:500 稀释物, 然后于 4°C 摇动孵育过夜。将膜在 TBS/0.05% 吐温中摇动漂洗 5 次, 每次 5 分钟, 然后向膜上加 1:30,000 稀释于 Superblock 中的山羊抗兔 HRP 第二抗体, 孵育 1 小时。再次将膜在 TBS/0.05% 吐温中摇动漂洗 5 次, 每次 5 分钟。使用 Pierce SuperSignal West Pico 化学发光底物 (Pierce 37079), 按照生产商的指导, 检测 HRP 缀合物。简言之, 混合等份的过氧化物溶液和 Lumino1/Enhancer 溶液, 将其加到膜上 (0.2ml/cm<sup>2</sup>), 5 分钟。吸除过量的溶液, 以膜对 Kodak BioMax MR X- 射线胶片 (Kodak 870 1302) 进行曝光。

[0169] 图 13A-C 示例了抗体 LGT209、LGT210 和 LGT211 导致 hPCSK9 输注小鼠模型中血浆非 HDL 胆固醇的降低。预注射 LGT209 抗体导致对 hPCSK9 介导的非 HDL 胆固醇升高的 46% 防止。预注射 LGT210 或 LGT211 对 hPCSK9 介导的非 HDL 胆固醇升高导致等同的或更大的防止作用。13C10 是经过确认的鼠抗 PCSK9 抗体, 其与 hPCSK9 高亲和力地结合, 用作该测定试验的阳性对照。以仅媒介物、仅 PCSK9、PCSK9+20mg/kg LGT209、PCSK9+20mg/kg LGT210、PCSK9+20mg/kg NVP-LGT211、PCSK9+20mg/kg 13C10 或小鼠非特异性 IgG 混合物 (阴性对照), 处理 C57BL/6 小鼠。显示单个数值, 以水平条界定平均值。使用 Olympus 临床分析仪 (Olympus 美国公司: Olympus AU400) 定量血浆总胆固醇水平。将血浆样品按 1:3 稀释于 ddH<sub>2</sub>O 中, 按照生产商的指导, 定量 40  $\mu$ l 稀释的血浆样品中总胆固醇水平。使用 Helena Laboratories 的 Spife 3000 获取脂蛋白胆固醇级分, 以定量血浆 HDL 和非 HDL。按照操作手册中提供的技术指导, 完成所有的步骤, 包括准备样品、制备凝胶、施加样品、凝胶电泳、染色、洗涤和干燥。然后, 在 Quick Scan 2000 中采用 Slit 5 扫描凝胶, 使用 Helena 光密度计, 计算脂蛋白胆固醇级分的相对百分比。最后, 通过将每个级分的百分比与总胆固醇水平相乘来计算 HDL 和非 HDL 的绝对值。

[0170] 图 14 显示, 与“典型的”IgG1 (PK) 谱相比较, 抗体 LGT209、LGT210 和 LGT211 (人

IgG1-silent) 的大鼠药代动力学 (PK) 谱。与典型的 IgG1 的半衰期 (约 6 天) 相比, 抗体 LGT209、LGT210 和 LGT211 的半衰期显著更长 (7-13 天) (例如, 如在人受试者中测定的)。没有靶介导的沉积 (TMD) 的迹象, 表明抗体不与啮齿动物 PCSK9 交叉反应。对于每个测试抗体, 以 10mg/kg 注射 3 只雄性 Lewis 大鼠。在时间 =0、1、6、24 小时以及 2、4、8 和 16 天, 采集 250  $\mu$ l 血样, 稀释经澄清的血浆, 在捕获 ELISA (山羊抗人 IgG) 中进行评估, 以测量所回收的总的人抗体。也产生每个测试抗体的标准曲线。以所回收的 IgG 的量对预期的典型人 IgG 在大鼠中的回收量, 进行绘图。

[0171] 发明详述

[0172] 1. 引言

[0173] 本发明的抗体和抗原结合分子与蛋白原转化酶枯草溶菌素 /kexin 型 9a (“PCSK9”) 特异结合。本发明的抗 PCSK9 抗体和抗原结合分子与 PCSK9 的 C 端结合, 其具有意料不到的特性——干扰 PCSK9 介导的低密度脂蛋白受体 (LDL-R) 的降解而不干扰 PCSK9 与 LDL-R 的结合。特别地, 抗 PCSK9 抗体和抗原结合分子与 PCSK9 的第 680-692 位残基内的表位结合, 例如位于 PCSK9 的 C 末端的氨基酸序列 RSRHLAQASQELQ (SEQ ID NO:49) 内的表位。因为本发明的抗体和抗原结合分子可与结合在细胞上的 PCSK9 而非只与循环 PCSK9 结合, 故它们在患者中具有相对较长的体内半衰期, 例如至少约 7 天或更长, 在一些实施方案中, 提供施用后至少 2 周的降脂效果。本发明的抗 PCSK9 抗体和抗原结合分子是 PCSK9 的拮抗剂, 因为它们防止、减少和 / 抑制 PCSK9 介导的 LDL-R 的降解, 从而促进低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 摄取的增加。抗 PCSK9 抗体和抗原结合分子可用于治疗患有例如血脂异常、高胆固醇血症、甘油三酯血症和其它 PCSK9 介导的疾病状况的受试者。

[0174] 2. 改良的抗 PCSK9 抗体概述

[0175] 可以使用本领域已知的任何手段来产生抗 PCSK9 抗体片段, 所述手段包括但不限于重组表达、化学合成、抗体四聚体的酶促消化, 而全长单克隆抗体可以通过例如杂交瘤或重组生产方式来获得。重组表达可以来自本领域已知的任何合适的宿主细胞, 例如, 哺乳动物宿主细胞、细菌宿主细胞、酵母宿主细胞、昆虫宿主细胞等。当恒定区存在时, 抗 PCSK9 抗体的恒定区可以是任何合适的型或亚型, 可以选择以来自待以本发明方法治疗的受试者的物种, 例如人、非人灵长类动物, 或其它哺乳动物, 例如农用动物 (例如, 马、绵羊、牛、猪、骆驼科动物)、驯养哺乳动物 (例如, 犬, 猫) 或啮齿动物 (例如, 大鼠、小鼠、仓鼠、兔)。在一些实施方案中, 抗 PCSK9 抗体经过人源化或 Humaneered™。在一些实施方案中, 恒定区同种型是 IgG, 例如 IgG1。在一些实施方案中, 将人 IgG1 恒定区突变, 使其对效应子配体, 例如细胞上的 Fc 受体 (FcR) (例如 Fc  $\gamma$  R1)、或补体的 C1 组分具有降低的结合亲和性。见例如, 美国专利号 5, 624, 821。包含这种突变的抗体介导减少的或不介导抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 或补体依赖性细胞毒性 (CDC)。在一些实施方案中, 将 IgG1 恒定区的氨基酸残基 L234 和 L235 替换为 Ala234 和 Ala235。重链恒定区中残基的编号为 EU 索引中的 (见, Kabat 等, (1983) “Sequences of Proteins of Immunological Interest”, 美国健康和公共事业部)。也见例如, Woodle 等, Transplantation (1999) 68(5):608-616; Xu 等, Cell Immunol (2000) 200(1):16-26; 和 Hezareh 等, J Virol 75(24):12161-8。

[0176] 本发明的抗 PCSK9 抗体或抗原结合分子也包括具有骆驼科动物支架的单结构域抗原结合单元。骆驼科中的动物包括骆驼、美洲驼和羊驼。骆驼科动物产生缺乏轻链的功

能性抗体。重链可变区 (VH) 自发折叠, 作为抗原结合单位独立起作用。与经典的抗原结合分子 (Fabs) 或单链可变片段 (scFvs) 中的 6 个 CDRs 相比, 它的结合表面仅涉及 3 个 CDRs。骆驼科动物抗体能够达到与常规抗体相当的结合亲和性。可以使用本领域公知的方法, 产生具有本文中示例的抗 PCSK9 抗体的结合特异性的、基于骆驼科动物支架的抗 PCSK9 分子, 所述方法例如 Dumoulin 等, *Nature Struct. Biol.* 11:500 - 515, 2002; Ghahroudi 等, *FEBS Letters* 414:521 - 526, 1997; 和 Bond 等, *J Mol Biol.* 332:643-55, 2003。

[0177] 本发明的改良的抗 PCSK9 抗体是经改造的人抗体, 其 V 区序列与人种系 V 区序列具有实质性的氨基酸序列同一性, 并保留参考抗体的特异性和亲和性。见美国专利公布号 2005/0255552 和美国专利公布号 2006/0134098, 由此将两者均以引用的方式并入本文。改良的过程包括从参考抗体的可变区中鉴定出决定抗原结合特异性所需的最小序列信息, 并将该信息转移到人部分 V 区基因序列的文库, 以产生人抗体 V 区的表位聚焦文库 (epitope-focused library)。可以使用基于微生物的分泌系统将该文库的成员表达为抗体 Fab 片段, 可以例如使用菌落转印 (colony-lift) 结合试验, 筛选文库中的抗原结合性 Fabs。见例如, 美国专利公布号 2007/0020685。可以对阳性克隆进行进一步表征, 以鉴定那些具有最高亲和性的阳性克隆。所产生的经改造的人 Fabs 保留了亲本 (参考抗 PCSK9 抗体) 的结合特异性, 一般对抗原具有与亲本抗体等同或更高的亲和性, 并含有与人种系抗体 V 区具有高度序列同一性的 V 区。

[0178] 产生表位聚焦文库所需的最小结合特异性决定簇 (BSD) 一般由重链 CDR3 (“CDRH3”) 中的序列和轻链 CDR3 (“CDRL3”) 中的序列表示。BSD 可以包含部分或整个长度的 CDR3。BSD 可以由连续的或非连续的氨基酸残基组成。在某些情况下, 从人 V 片段序列, 构建表位聚焦文库, 所述人 V 片段序列与来自参考抗体的包含 BSD 的独特 CDR3-FR4 区以及人种系 J 片段序列连接 (见, 美国专利公布号 2005/0255552)。备选地, 可以通过顺序的盒置换, 产生人 V 片段文库, 其中开始仅部分的参考抗体 V 片段用人序列文库替代。然后, 将所鉴定的在参考抗体剩余的氨基酸序列中支持结合的人 “盒”, 在第二个文库筛选中重组, 以产生完整的人 V 片段 (见, 美国专利公布号 2006/0134098)。

[0179] 在每种情况下, 使用来自参考抗体的包含特异性决定簇的、成对重链和轻链 CDR3 片段、CDR3-FR4 片段或 J 片段, 以限制结合特异性, 以便从文库中获得的抗原结合物保留参考抗体的表位特异性。可以在文库构建中, 向每条链的 CDR3 区引入另外的成熟改变, 以鉴定具有最佳结合动力学的抗体。所获得的经改造的人抗体具有来源于人种系文库的 V 片段序列, 保留来自 CDR3 区中的短 BSD 序列, 并具有人种系构架区 4 (FR4)。

[0180] 因此, 在一些实施方案中, 抗 PCSK9 抗体包含来自原初或参考单克隆抗体重链和轻链的 CDR3 中的最小结合序列决定簇 (BSD)。重链和轻链可变区 (CDR 和 FR) 的其余序列, 例如 V 片段和 J 片段, 来自相应的人种系和亲和力成熟的氨基酸序列。V 片段可以选自人 V 片段文库。可以通过亲和力成熟进行进一步的序列精炼。

[0181] 在另一个实施方案中, 抗 PCSK9 抗体的重链和轻链包含来自相应的人种系序列的人 V 片段 (FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3), 例如选自人 V 片段文库的人 V 片段, 和来自原初单克隆抗体的 CDR3-FR4 序列片段。可以通过用相应的人种系序列替代序列片段和 / 或通过亲和力成熟, 进一步精炼 CDR3-FR4 序列片段。例如, 可以用相应的人种系序列替代 BSD 周围的 FR4 和 / 或 CDR3 序列, 而保留来自原初单克隆抗体的 CDR3 的 BSD。

[0182] 在一些实施方案中,重链 V 片段的相应人种系序列是 Vh1-02。在一些实施方案中,重链 J 片段的相应的人种系序列是 JH4。在一些实施方案中,重链 J 片段包含人种系 JH4 部分序列 WGQGLVTVSS(SEQ ID NO:50)。来自人种系 JH4 的全长 J 片段是 YFDYWGQGLVTVSS(SEQ ID NO:51)。可变区基因依照免疫球蛋白可变区基因的标准命名系统来提及。目前的免疫球蛋白基因信息可以通过万维网获取,例如在 ImMunoGeneTics(IMG T)、V-base 和 PubMed 数据库中。也见 Lefranc, Exp Clin Immunogenet. 2001;18(2):100-16;Lefranc, Exp Clin Immunogenet. 2001;18(3):161-74;Exp Clin Immunogenet. 2001;18(4):242-54; 和 Giudicelli 等, Nucleic Acids Res. 2005 Jan 1;33(Database issue):D256-61。

[0183] 在一些实施方案中,轻链 V 片段的相应的人种系序列是 VK3L6。在一些实施方案中,轻链 J 片段的相应的人种系序列是 Jk2。在一些实施方案中,轻链 J 片段包含人种系 Jk2 部分序列 FGQGTKLEIK(SEQ ID NO:52)。来自人种系 Jk2 的全长 J 片段是 YTFGQGTKLEIK(SEQ ID NO:53)。

[0184] 在一些实施方案中,重链 V 片段与氨基酸序列 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCSKASGYTFS(D/T)MYMSWVRQAPGQGLEWMGRIDPAN(A/E/G)HTNY(A/D)(P/Q)KFQ(A/G)RVTMTRDTSISTAYMELSR LTSDDTAVYYCAR(SEQ ID NO:28) 具有至少 85%、89%、90%、93%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 的序列同一性。在一些实施方案中,重链 V 片段与氨基酸序列 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCSKASGYTFS MYMSWVRQAPGQGLEWMGRIDPANEHTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSR LTSDDTAVYYCAR(SEQ ID NO:27) 具有至少 85%、89%、90%、93%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 的序列同一性。

[0185] 在一些实施方案中,轻链 V 片段与以下氨基酸序列具有至少 85%、89%、90%、93%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 的序列同一性:(E/Q)IV(L/M)TQSPATLSVSPGERATLSC(R/S)AS(Q/S)SVSYMHWYQQKPGQAPRLLIY(G/L)(T/V)F(N/R)(L/R)A(S/T)GIPDRFSGSGSGTDFTLTIGRLEPEDFAVYYC(SEQ ID NO:31)。在一些实施方案中,重链 V 片段与以下氨基酸序列具有至少 85%、89%、90%、93%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 序列同一性 QIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSYMHWYQQKPGQAPRLLIYGVFRRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTIGRLEPEDFAVYYC(SEQ ID NO:29)。, 在一些实施方案中,重链 V 片段与以下氨基酸序列具有至少 85%、89%、90%、93%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 的序列同一性 EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSYMHWYQQKPGQAPRLLIYGVFRRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTIGRLEPEDFAVYYC(SEQ ID NO:30)。

[0186] 在一些实施方案中:

[0187] i) 重链 CDR3 包含氨基酸序列 SYYYY(A/N)MD(A/F/S/V/Y)(SEQ ID NO:14); 以及

[0188] ii) 轻链 CDR3 可变区包含氨基酸序列 LQWSSDPPT(SEQ ID NO:26)。

[0189] 在一些实施方案中:

[0190] i) 重链 CDR3 包含选自 SEQ ID NO:12 和 SEQ ID NO:13 的氨基酸序列; 以及

[0191] ii) 轻链 CDR3 包含 SEQ ID NO:26 的氨基酸序列。

[0192] 在一些实施方案中,本发明的抗体包含重链可变区,所述重链可变区包括包含氨基酸序列(D/T)MYMS(SEQ ID NO:8)的 CDR1; 包含氨基酸序列 RIDPAN(A/E/G)HTNY(A/D)(P/Q)KFQ(A/G)(SEQ ID NO:11)的 CDR2; 和包含氨基酸序列 SYYYY(A/N)MD(A/F/S/V/Y)(SEQ ID NO:14)的 CDR3。

[0193] 在一些实施方案中,本发明的抗体包含轻链可变区,所述轻链可变区包括包含氨

氨基酸序列 (R/S)AS(Q/S)SVSYMH(SEQ ID NO:22) 的 CDR1 ;包含氨基酸序列 (G/L)(T/V)F(N/R)(L/R)A(S/T)(SEQ ID NO:25) 的 CDR2 ;和包含氨基酸序列 LQWSSDPPT(SEQ ID NO:26) 的 CDR3。

[0194] 在一些实施方案中,重链可变区包括包含 SEQ ID NO:32 的氨基酸序列的 FR1 ;包含 SEQ ID NO:33 的氨基酸序列的 FR2 ;包含 SEQ ID NO:34 的氨基酸序列的 FR3 ;和包含 SEQ ID NO:35 的氨基酸序列的 FR4。这些鉴定的氨基酸序列可以具有一个或多个替代的氨基酸(例如,来自亲和力成熟)或一个或两个保守替代氨基酸。

[0195] 在一些实施方案中,轻链可变区包括包含 SEQ ID NO:36 的氨基酸序列的 FR1 ;包含 SEQ ID NO:37 的氨基酸序列的 FR2 ;包含 SEQ ID NO:38 的氨基酸序列的 FR3 ;和包含 SEQ ID NO:39 的氨基酸序列的 FR4。这些鉴定的氨基酸序列可以具有一个或多个替代的氨基酸(例如,来自亲和力成熟)或一个或两个保守替代氨基酸。

[0196] 本发明的抗 PCSK9 抗体的可变区在其全长上一般与相应的人种系可变区氨基酸序列具有至少约 85%、例如至少约 89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 的总体可变区(例如,FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4)氨基酸序列同一性。例如,抗 PCSK9 抗体的重链可以与人种系可变区 Vh1-02 具有至少约 85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 的氨基酸序列同一性。抗 PCSK9 抗体的轻链可以与人种系可变区 VK3L6 具有至少约 85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 的氨基酸序列同一性。在一些实施方案中,仅对构架区中的氨基酸进行添加、缺失或替代。在一些实施方案中,序列同一性比较不包括 CD3。

[0197] 在一些实施方案中,本发明的抗 PCSK9 抗体包含与 SEQ ID NO:40 的重链可变区具有至少 85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 的氨基酸序列同一性的重链可变区,和包含与 SEQ ID NO:41 的轻链可变区(即,共有序列)具有至少 85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 的氨基酸序列同一性的轻链可变区。

[0198] 在一些实施方案中,本发明的抗 PCSK9 抗体包含与 SEQ ID NO:1 的重链可变区具有至少 85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 的氨基酸序列同一性的重链可变区,和包含与 SEQ ID NO:15 的轻链可变区(即,小鼠 LFU720)具有至少 85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 的氨基酸序列同一性的轻链可变区。

[0199] 在一些实施方案中,本发明的抗 PCSK9 抗体包含与 SEQ ID NO:2 的重链可变区具有至少 85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 的氨基酸序列同一性的重链可变区,和包含与 SEQ ID NO:16 的轻链可变区(即,LGT-209)具有至少 85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 的氨基酸序列同一性的轻链可变区。

[0200] 在一些实施方案中,本发明的抗 PCSK9 抗体包含与 SEQ ID NO:2 的重链可变区具有至少 85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 的氨基酸序列同一性的重链可变区,和包含与 SEQ ID NO:18 的轻链可变区(即,LGT-210)具有至少 85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 的氨基酸序列同一性的轻链可变区。

[0201] 在一些实施方案中,本发明的抗 PCSK9 抗体包含与 SEQ ID NO:4 的重链可变区具有至少 85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 的氨基酸序列同一性的重链可变区,和包含与 SEQ ID NO:16 的轻链可变区(即,LGT-211)具有至少 85%、89%、



90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 的氨基酸序列同一性的轻链可变区。

[0202] 在一些实施方案中,本发明的抗 PCSK9 抗体包含与 SEQ ID NO:3 的重链可变区具有至少 85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 的氨基酸序列同一性的重链多肽,和包含与 SEQ ID NO:17 的轻链可变区(即,LGT-209)具有至少 85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 的氨基酸序列同一性的轻链多肽。

[0203] 在一些实施方案中,本发明的抗 PCSK9 抗体包含与 SEQ ID NO:3 的重链可变区具有至少 85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 的氨基酸序列同一性的重链多肽,和包含与 SEQ ID NO:19 的轻链可变区(即,LGT-210)具有至少 85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 的氨基酸序列同一性的轻链多肽。

[0204] 在一些实施方案中,本发明的抗 PCSK9 抗体包含与 SEQ ID NO:5 的重链可变区具有至少 85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 的氨基酸序列同一性的重链多肽,和包含与 SEQ ID NO:17 的轻链可变区(即,LGT-211)具有至少 85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 的氨基酸序列同一性的轻链多肽。

[0205] 对于鉴定的长度小于 20 个氨基酸的氨基酸序列,可以耐受一个或两个保守氨基酸残基替代而仍然保留期望的特异性结合和/或拮抗剂活性。

[0206] 本发明的抗 PCSK9 抗体与 PCSK9 结合的平衡解离常数( $K_D$ )一般小于约  $10^{-8}M$  或  $10^{-9}M$ ,例如,小于约  $10^{-10}M$  或  $10^{-11}M$ ,在一些实施方案中小于约  $10^{-12}M$  或  $10^{-13}M$ 。

[0207] 任选地,可以根据本发明的方法多聚化和使用抗 PCSK9 抗体。抗 PCSK9 抗体可以是全长四聚体抗体(即,具有两条轻链和两条重链)、单链抗体(例如,scFv)、或包含抗体片段的分子,所述抗体片段形成一个或多个抗原结合位点并赋予 PCSK9 结合特异性,例如,包含重链和轻链可变区的分子(例如,Fab' 或其它类似的片段)。

[0208] 本发明还提供编码本文中描述的抗体的多核苷酸,例如,编码如本文中描述的重链或轻链可变区或包含互补决定区的片段的多核苷酸。在一些实施方案中,编码重链的多核苷酸与选自 SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43 和 SEQ ID NO:54 的多核苷酸具有至少 85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 的核酸序列同一性。在一些实施方案中,编码轻链的多核苷酸与选自 SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45 和 SEQ ID NO:55 的多核苷酸具有至少 85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 的核酸序列同一性。

[0209] 在一些实施方案中,编码重链的多核苷酸与 SEQ ID NO:42 的多核苷酸具有至少 85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 的核酸序列同一性。在一些实施方案中,编码轻链的多核苷酸与 SEQ ID NO:45 的多核苷酸(即,LGT-209)具有至少 85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 的核酸序列同一性。

[0210] 在一些实施方案中,编码重链的多核苷酸与选自 SEQ ID NO:42 的多核苷酸具有至少 85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 的核酸序列同一性。在一些实施方案中,编码轻链的多核苷酸与选自 SEQ ID NO:44 的多核苷酸(即,LGT-210)具有至少 85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 的核酸序列同一性。

[0211] 在一些实施方案中,编码重链的多核苷酸与选自 SEQ ID NO:43 的多核苷酸具有至少 85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 的核酸序列同一性。在一些实施方案中,编码轻链的多核苷酸与选自 SEQ ID NO:45 的多核苷酸(即,LGT-211)具

有至少 85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 的核酸序列同一性。

[0212] 在一些实施方案中, 编码重链的多核苷酸与 SEQ ID NO:54 的多核苷酸具有至少 85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 的核酸序列同一性。在一些实施方案中, 编码轻链的多核苷酸与 SEQ ID NO:55 的多核苷酸 (即, 小鼠 LFU720) 具有至少 85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 的核酸序列同一性。

[0213] 3. 用于鉴定抗 PCSK9 抗体的测定试验

[0214] 可以通过产生抗 PCSK9 抗体, 然后测试每个抗体减少或抑制 PCSK9 介导的事件 (例如, 与 LDLR 结合, 促进 LDLR 降解) 的能力, 以鉴定拮抗剂抗体。可以在体外或体内进行该测定试验。优选与 PCSK9 结合、不阻止 PCSK9 与 LDLR 结合、和减少或抑制 PCSK9 介导的 LDLR 降解的抗体。

[0215] 可以使用本领域已知的方法测定抗体或抗原结合分子与 PCSK9 的结合, 所述方法包括但不限于 ELISA、Biacore 和 Western 印迹。

[0216] 也可以使用本领域已知的任何方法, 测定 PCSK9 介导的 LDLR 降解。在一些实施方案中, 使用输注小鼠模型, 测定抗 PCSK9 抗体或抗原结合分子抑制 LDLR 降解的能力。将抗 PCSK9 抗体或抗原结合分子经静脉输注 (例如, 3  $\mu$  g/ 小时) 到小鼠中, 测定肝脏膜制品中 LDLR 水平, 并与来自接受了静脉输注对照抗体 (例如, 与不相关的抗原结合的抗体) 的小鼠的肝脏膜制品中 LDLR 水平相比较。与接受了对照抗体的小鼠相比较, 接受了拮抗剂抗 PCSK9 抗体的小鼠将具有可检测地更高水平 (例如, 至少高 10%、20%、50%、80%、100%) 的 LDLR。

[0217] 也可以测试抗 PCSK9 拮抗剂抗体在降低血浆 LCL-C、非 HDL-C 和 / 或总胆固醇水平上的治疗功效。将抗 PCSK9 抗体或抗原结合分子经静脉输注 (例如, 3  $\mu$  g/ 小时) 到哺乳动物 (例如, 小鼠、大鼠、非人灵长类动物、人) 中, 测定血浆 LCL-C、非 HDL-C 和 / 或总胆固醇水平, 并与来自治疗前的相同哺乳动物或来自接受了静脉输注对照抗体 (例如, 与不相关的抗原结合的抗体) 的哺乳动物的血浆 LCL-C、非 HDL-C 和 / 或总胆固醇水平相比较。与治疗前的哺乳动物或接受了对照抗体的哺乳动物相比较, 接受了拮抗剂抗 PCSK9 抗体的哺乳动物将具有可检测地更低 (例如, 低至少 10%、20%、50%、80%、100%) 的血浆 LCL-C、非 HDL-C 和 / 或总胆固醇水平。

[0218] 4. 包含抗 PCSK9 抗体的组合物

[0219] 本发明提供了药物组合物, 其包含本发明的抗 PCSK9 抗体或抗原结合分子, 所述抗体或抗原结合分子与药学上可接受载体配制在一起。组合物可以还包含其它适用于治疗或预防给定失调的治疗剂。药学载体增强或稳定组合物, 或便于组合物的配制。药学上可接受载体包括生理可接受的溶剂、分散介质、包衣剂、抗细菌和抗真菌剂、等渗剂和吸收延缓剂等。

[0220] 可以用本领域已知的多种方法对本发明的药物组合物进行给药。给药的途径和 / 或模式根据期望结果而不同。优选通过静脉、肌肉、腹膜内、或皮下给药, 或给药到目标位置的附近。药学上可接受载体应该适合于静脉、肌肉、皮下、肠胃外、鼻内、吸入、脊柱、或表皮给药 (例如, 通过注射或输注)。根据给药的途径, 可以将活性化合物 (即, 抗体、双特异性和多特异性分子) 包在包衣料中, 以保护化合物免受可造成化合物失活的酸和其它自然条件的作用。

[0221] 可以将抗体,单独或与其它合适的组分组合,制成气雾剂(即,它们可以被“雾化”)以通过吸入来给药。可以将气雾剂置于加压的可接受的抛射剂(例如二氯二氟甲烷、丙烷、氮气等)中。

[0222] 在一些实施方案中,组合物是无菌的和流动的。可以例如通过使用例如卵磷脂等包衣剂、在分散剂的情况下通过维持所要求的颗粒大小和通过使用表面活性剂来维持恰当的流动性。在许多情况下,优选在组合物中包括等渗剂,例如糖、多元醇(例如甘露醇或山梨醇)、和氯化钠。可以通过在组合物中包括延缓吸收的试剂(例如,单硬脂酸铝或明胶)来实现注射型组合物的长期吸收。

[0223] 可以依照本领域公知和常规使用的方法,制备本发明的药物组合物。药学上可接受的载体部分地由所给药的特定组合物,以及由用于组合物给药的特定方法来确定。因此,存在很多种合适的本发明药物组合物制剂。用于配制抗体和确定适当剂量及给药方案的适用方法可以在例如 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第 21 版, University of the Sciences in Philadelphia, Lippincott Williams 和 Wilkins 编辑(2005)中,和在 Martindale: The Complete Drug Reference, Sweetman, 2005, London: Pharmaceutical Press 中,和在 Martindale, Martindale: The Extra Pharmacopoeia, 第 31 版, 1996, Amer Pharmaceutical Assn 和 Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson 编辑, Marcel Dekker, Inc., New York, 1978 中找到,由此将其每一均通过引用的方式并入本文。优选在 GMP 条件下制备药物组合物。一般在本发明药物组合物中使用抗 PCSK9 抗体的治疗有效剂量或有用剂量。通过本领域技术人员已知的常规方法,将抗 PCSK9 抗体配成药学上可接受的剂型。调整给药方案以提供期望的反应(例如,治疗反应)。在确定治疗或预防有效剂量中,可以先低剂量给药,然后逐步增加直到获得期望的反应而具有最小的或没有不需要副作用。例如,可以给予单个的大剂量(bolus),可以在一段时间内给予几个分剂量,或可以依据治疗情形的紧迫性,按比例减少或增加剂量。特别有利的是,以单位剂量形式配制肠胃外组合物,以易于给药和达成剂量的均一性。如本文中使用的单位剂量形式指合适作为单一剂量用于待治疗的受试者的物理上分离的单位;每个单位包含预先确定的量的活性化合物,所述量经计算可以在与所需药物载体结合的情况下产生期望的治疗效果。

[0224] 为了获得对特定的患者、组合物和给药模式可以有效达到期望治疗反应而对患者没有毒性的活性成分的量,本发明的药物组合物中活性成分的实际剂量水平可以是变化的。所选择的剂量水平取决于多种药物动力学因素,所述因素包括所使用的特定本发明组合物或其酯、盐或酰胺的活性,给药途径,给药时间,所使用的特定化合物的排泄速率,治疗持续时间,与所使用的特定组合物结合使用的其它药物、化合物和/或物质,所治疗的患者的年龄,性别,体重,状况,一般健康状况和以前的病史等因素。

[0225] 在一些实施方案中,药物组合物包含抗 PCSK9 抗体或抗原结合分子和第二药的混合物。例如,组合物可以包含本发明的抗 PCSK9 抗体或抗原结合分子和已知有利于降低胆固醇(包括 LDL-C、非 HDL-C 和总胆固醇)和/或升高 HDL-C 的试剂。

[0226] 可与本发明抗 PCSK9 抗体或抗原结合分子包含于混合物中的示例性第二药包括但不限于 HMG-CoA 还原酶抑制剂(即,他汀类药)、贝特类药(例如,氯贝特(clofibrate)、吉非贝特(gemfibrozil)、非诺贝特(fenofibrate)、环丙贝特(ciprofibrate)、苯扎贝特

(bezafibrate))、烟酸 (niacin) 及其类似物、胆固醇吸收抑制剂、胆汁酸螯合剂 (例如, 消胆胺 (cholestyramine)、降胆宁 (colestipol)、colesvelam)、回肠胆汁酸转运 (IBAT) 抑制剂、甲状腺激素模拟物 (例如, 化合物 KB2115)、微粒体甘油三酯转移蛋白 (MTP) 抑制剂、过氧化物酶体增殖物激活受体 (PPAR)  $\alpha$  和  $\gamma$  双重激动剂、酰基辅酶 A: 二酰甘油酰基转移酶 (DGAT) 抑制剂、酰基辅酶 A: 胆固醇酰基转移酶 (ACAT) 抑制剂、Niemann Pick C1-样 1 (NPC1-L1) 抑制剂 (例如, 依折麦布 (ezetimibe))、ATP 结合盒 (ABC) 蛋白 G5 或 G8 的激动剂、胆固醇酯转移蛋白 (CETP) 抑制剂、靶向 PCSK9 的抑制性核酸和靶向 apoB100 的抑制性核酸。降脂药在本领域已知, 其描述于例如 Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 第 11 版, Brunton, Lazo 和 Parker 编辑, McGraw-Hill (2006); 2009 Physicians' Desk Reference (PDR), 例如, 第 63 版 (2008), Thomson PDR 中。

[0227] 可以用于本发明组合物中的另外的降脂药描述和 / 或综述于例如 Chang 等, *Curr Opin Drug Disco Devel* (2002) 5(4):562-70; Sudhop 等, *Drugs* (2002) 62(16):2333-47; Bays 和 Stein, *Expert Opin Pharmacother* (2003) 4(11):1901-38; Kastelein, *Int J Clin Pract Suppl* (2003) Mar(134):45-50; Tomoda 和 Omura, *Pharmacol Ther* (2007) 115(3):375-89; Tenenbaum 等, *Adv Cardiol* (2008) 45:127-53; Tomkin, *Diabetes Care* (2008) 31(2):S241-S248; Lee 等, *J Microbiol Biotechnol* (2008) 18(11):1785-8; Oh 等, *Arch Pharm Res* (2009) 32(1):43-7; Birch 等, *J Med Chem* (2009) 52(6):1558-68; 以及 Baxter 和 Webb, *Nature Reviews Drug Discovery* (2009) 8:308-320 中。

[0228] 在一些实施方案中, 本发明的抗 PCSK9 抗体或抗原结合分子作为与他汀类药的混合物来提供。示例性的他汀类药包括但不限于阿托伐他汀、西立伐他汀、氟伐他汀、洛伐他汀、美伐他汀、匹伐他汀、普伐他汀、瑞舒伐他汀和辛伐他汀。

[0229] 在一些实施方案中, 本发明的抗 PCSK9 抗体或抗原结合分子作为与诱发高胆固醇血症或甘油三酯血症的药的混合物来提供。例如, 该第二药可以是蛋白酶抑制剂, 例如沙奎那韦 (Saquinavir)、利托那韦 (Ritonavir)、茚地那韦 (Indinavir)、奈非那韦 (Nelfinavir)、安普那韦 (Amprenavir)、洛匹那韦 (Lopinavir)、阿扎那韦 (Atazanavir)、福沙那韦 (Fosamprenavir)、替拉那韦 (Tipranavir)、达芦那韦 (Darunavir)、阿巴卡韦-拉米夫定-齐多夫定 (abacavir-lamivudine-zidovudine) (三协唯 (Trizivir))。在一些实施方案中, 第二药为他克莫司 (Tacrolimus)。

[0230] 5. 使用抗 PCSK9 抗体的方法

[0231] a. 以抗 PCSK9 抗体治疗的病况

[0232] 本发明的抗 PCSK9 拮抗剂抗体和抗原结合分子可用于治疗由 PCSK9 的活性或过度活性介导的任何疾病状况。

[0233] 例如, 由于多种原因或病因而患有或有危险患有血脂异常或高胆固醇血症的个体可以受益于本发明的抗 PCSK9 拮抗剂抗体和抗原结合分子的施用。例如, 个体可以患有家族或遗传传递的纯合性或杂合性高胆固醇血症, 其中存在功能性 LDL-R。与家族或遗传传递的高胆固醇血症相关的或引起该病的遗传突变概述于例如 Burnett 和 Hooper, *Clin Biochem Rev* (2008) 29(1):11-26 中。个体也可以患有其它疾病状况、或从事有助或增加血脂异常或高胆固醇血症患病风险的行为。例如, 个体可以是肥胖的、或患有糖尿病或代谢综

合症。个体可以是吸烟者、具有久坐不动的生活方式、或高胆固醇饮食。

[0234] 靶向 PCSK9 可以用于降低、逆转、抑制或阻止血脂异常、高胆固醇血症和餐后甘油三酯血症。见例如, Le May 等, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2009) 29 (5) :684-90; Seidah, *Expert Opin Ther Targets* (2009) 13 (1) :19-28; 和 Poirier 等, *J Biol Chem* (2009) PMID 19635789。因此, 本发明的抗 PCSK9 拮抗剂抗体和抗原结合分子的用药可用于在有需要的个体中降低、逆转、抑制或阻止血脂异常、高胆固醇血症和餐后甘油三酯血症。

[0235] 本发明的抗 PCSK9 拮抗剂抗体和抗原结合分子可用于在有需要的个体中减少或降低低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C)。个体可以具有持续升高的 LDL-C 水平。在一些实施方案中, 个体的 LDL-C 血浆水平持续高于 80mg/dL, 例如高于 90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190mg/dL 或更高。本发明的抗 PCSK9 拮抗剂抗体和抗原结合分子也可用于在有需要的个体中减少或降低非高密度脂蛋白胆固醇 (非 HDL-C) 或总胆固醇。

[0236] 个体可以已经服用了其它药来降低胆固醇, 并抵抗或不耐受该药。例如, 个体可以已经在他汀类药物治疗方案下, 该方案可能已经被证明在该个体中在将 LDL-C、非 HDL-C 或总胆固醇降低到可接受的水平上是无效的。个体也可以是不耐受他汀类用药的。将本发明的抗 PCSK9 拮抗剂抗体和抗原结合分子与可以用于降低 LDL-C 或非 HDL-C 和 / 或升高 HDL-C 的第二药联合施用, 将例如, 通过允许施用较低剂量的第二药, 而提高第二药的功效和耐受性。

[0237] 在一些实施方案中, 个体在 PCSK9 基因中含有功能获得性突变, 例如导致 LDLR 的降解异常增加的突变。

[0238] 在一些实施方案中, 个体正在接受诱发血脂异常或高胆固醇血症的药剂, 即, 个体患有药物诱导性血脂异常或高胆固醇血症。例如, 个体可以正在接受蛋白酶抑制剂治疗方案, 例如, 用于治疗 HIV 感染。另一种已知导致血浆甘油三酯水平升高的药是他克莫司 (Tacrolimus), 它是一种给移植患者施用的免疫抑制性药物。环孢菌素已经被证实显著增加 LDL。见例如, Ballantyne 等, (1996) 78 (5) :532-5。第二代抗精神病药 (例如, 阿立哌唑 (aripiprazole)、氯氮平 (clozapine)、奥氮平 (olanzapine)、喹硫平 (quetiapine)、利培酮 (risperidone) 和齐拉西酮 (ziprasidone)) 也已经与血脂异常相关。见例如, Henderson, *J Clin Psychiatry* (2008) 69 (2) :e04 和 Brooks 等, *Curr Psychiatry Rep* (2009) 11 (1) :33-40。

[0239] b. 抗 PCSK9 抗体的施用

[0240] 医生或兽医可以以低于达到期望疗效所需水平的剂量水平, 开始药物组合物中本发明抗体的剂量, 然后逐渐增加剂量直到获得期望效果。通常, 本发明的组合物的有效剂量根据许多不同的因素而变化, 所述因素包括待治疗的特定疾病或状况、给药的方式、靶点、患者的生理状态、患者是人还是动物、所施用的其它药物、和治疗是预防性还是治疗性的。需要滴定治疗剂量以优化安全性和功效。对于抗体用药, 剂量范围从约 0.0001 至 100mg/kg、更通常为 0.01 至 5mg/kg 宿主体重。例如, 剂量可以是 1mg/kg 体重或 10mg/kg 体重或在 1-10mg/kg 范围内。可以每天、每周、每两周、每月或, 按需要或期望, 更频繁地或频度较低地用药。示例性治疗方案是每周一次、每两周一次、或每月一次或每 3 至 6 月一次施用。

[0241] 在一些实施方案中, 施用编码本发明的抗 PCSK9 抗体或抗原结合分子的多核苷酸。在药剂为核酸的实施方案中, 典型的剂量可以是约 0.1mg/kg 体重直到和包括约 100mg/

kg 体重,例如,在约 1mg/kg 体重至约 50mg/kg 体重之间。在一些实施方案中,约 1、2、3、4、5、10、15、20、30、40 或 50mg/kg 体重。

[0242] 可以单剂或分剂量施用抗体。通常多次施用抗体。单次剂量之间的时间间隔可以,按需要或期望的,是一周一次、两周一次、一月一次或一年一次。时间间隔也可以是不定的,由测量患者中血液抗 PCSK9 抗体的水平来指示。在一些方法中,调整剂量以使血浆抗体浓度达到 1 - 1000  $\mu$ g/ml,在一些方法中达到 25-300  $\mu$ g/ml。可选地,在需要较低频率给药时,可以将抗体以持久释放制剂的形式施用。剂量和频率随患者中抗体的半衰期而变化。通常,人源化抗体表现比嵌合抗体和非人抗体更长的半衰期。给药的剂量和频率可以随治疗是预防性的还是治疗性的而变化。在预防性应用中,可以在一段长时间内,按相对不频繁的时间间隔,施用相对低的剂量。一些患者在其生命的剩余时间内持续接受治疗。在治疗性应用中,有时需要以相对短的时间间隔施用相对高的剂量,直到疾病的发展被减弱或终止,优选直到患者的疾病症状表现出部分或完全改善。此后,患者可以采用预防性方案。在一些实施方案中,当患者中血浆 LDL-C 水平升高到预先确定的阈值水平以上时,例如至少约 80mg/dL,例如至少约 90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190mg/dL 或更高时,施用抗 PCSK9 抗体或抗原结合剂。

[0243] c. 与第二药的共施用

[0244] PCSK9 拮抗剂可以与已知有利于降低胆固醇(包括 LDL-C、非 HDL-C 和总胆固醇)和/或升高 HDL-C 的药组合使用。

[0245] 活性剂可以与抗 PCSK9 拮抗剂抗体以混合物的形式一起施用,或者每一种活性剂可以分开地施用。抗体活性剂和其它活性剂可以但不必须同时用药。

[0246] 用于与本发明的抗 PCSK9 拮抗剂抗体或抗原结合分子一起共施用的示例性第二药包括但不限于 HMG-CoA 还原酶抑制剂(即,他汀类药)、贝特类药(例如,氯贝特、吉非贝特、非诺贝特、环丙贝特、苯扎贝特)、烟酸(niacin)及其类似物、胆固醇吸收抑制剂、胆汁酸螯合剂(例如,消胆胺、降胆宁、colesvelam)、回肠胆汁酸转运(IBAT)抑制剂、甲状腺激素模拟物(例如,化合物 KB2115)、微粒体甘油三酯转移蛋白(MTP)抑制剂、过氧化物酶体增殖物激活受体(PPAR)  $\alpha$  和  $\gamma$  双重激动剂、酰基辅酶 A:二酰甘油酰基转移酶(DGAT)抑制剂、酰基辅酶 A:胆固醇酰基转移酶(ACAT)抑制剂、Niemann Pick C1-样 1(NPC1-L1)抑制剂(例如,依折麦布(ezetimibe))、ATP 结合盒(ABC)蛋白 G5 或 G8 的激动剂、胆固醇酯转移蛋白(CETP)抑制剂、靶向 PCSK9 的抑制性核酸和靶向 apoB100 的抑制性核酸。

[0247] 另外有用的降脂药描述和/或综述于例如 Chang 等, *Curr Opin Drug Disco Devel* (2002) 5(4):562-70; Sudhop 等, *Drugs* (2002) 62(16):2333-47; Bays 和 Stein, *Expert Opin Pharmacother* (2003) 4(11):1901-38; Kastelein, *Int J Clin Pract Suppl* (2003) Mar(134):45-50; Tomoda 和 Omura, *Pharmacol Ther* (2007) 115(3):375-89; Tenenbaum 等, *Adv Cardiol* (2008) 45:127-53; Tomkin, *Diabetes Care* (2008) 31(2):S241-S248; Lee 等, *J Microbiol Biotechnol* (2008) 18(11):1785-8; Oh 等, *Arch Pharm Res* (2009) 32(1):43-7; Birch 等, *J Med Chem* (2009) 52(6):1558-68; 以及 Baxter 和 Webb, *Nature Reviews Drug Discovery* (2009) 8:308-320。

[0248] 在一些实施方案中,本发明的抗 PCSK9 抗体或抗原结合分子与他汀类药一起共施用。示例性的他汀类药包括但不限于阿托伐他汀、西立伐他汀、氟伐他汀、洛伐他汀、美伐他

汀、匹伐他汀、普伐他汀、瑞舒伐他汀和辛伐他汀。

[0249] 在一些实施方案中,本发明的抗 PCSK9 抗体或抗原结合分子与诱发高胆固醇血症或甘油三酯血症的药剂一起共施用。例如,第二药可以是蛋白酶抑制剂,例如沙奎那韦 (Saquinavir)、利托那韦 (Ritonavir)、茛地那韦 (Indinavir)、奈非那韦 (Nelfinavir)、安普那韦 (Amprenavir)、洛匹那韦 (Lopinavir)、阿扎那韦 (Atazanavir)、福沙那韦 (Fosamprenavir)、替拉那韦 (Tipranavir)、达芦那韦 (Darunavir)、阿巴卡韦-拉米夫定-齐多夫定片 (abacavir-lamivudine-zidovudine) (三协唯 (Trizivir))。在一些实施方案中,第二药为他克莫司 (Tacrolimus)。

[0250] 在一些实施方案中,本发明的抗 PCSK9 抗体或抗原结合分子与特异靶向 PCSK9 或 apoB100 的抑制性核酸 (例如, siRNA、miRNA、反义序列、核酶) 一起共施用。

[0251] 6. 药盒

[0252] 本发明的药物组合物可以以药盒的形式提供。在某些实施方案中,本发明的药盒包含如本文中描述的抗 PCSK9 拮抗剂抗体或抗原结合分子。抗 PCSK9 抗体或抗原结合分子可以以均一的或变化的剂量提供。

[0253] 在一些实施方案中,药盒包含如本文中描述的一种或多种第二药。第二药可以与抗 PCSK9 抗体或抗原结合分子在相同的制剂中或在分开的制剂中提供。第一和第二药的剂量各自独立地可以是均一的或变化的。

[0254] 在一些实施方案中,药盒包含 PCSK9 抗体拮抗剂和一种或多种已知有利于降胆固醇 (包括 LDL-C、非 HDL-C 和总胆固醇) 和 / 或升高 HDL-C 的药。

[0255] 用于与本发明的抗 PCSK9 拮抗剂抗体或抗原结合分子一起包含在药盒中的示例性第二药包括但不限于, HMG-CoA 还原酶抑制剂 (即, 他汀类药)、贝特类药 (例如, 氯贝特、吉非贝特、非诺贝特、环丙贝特、苯扎贝特)、烟酸 (niacin) 及其类似物、胆固醇吸收抑制剂、胆汁酸螯合剂 (例如, 消胆胺、降胆宁、colesvelam)、回肠胆汁酸转运 (IBAT) 抑制剂、甲状腺激素模拟物 (例如, 化合物 KB2115)、微粒体甘油三酯转移蛋白 (MTP) 抑制剂、过氧化物酶体增殖物激活受体 (PPAR)  $\alpha$  和  $\gamma$  双重激动剂、酰基辅酶 A: 二酰甘油酰基转移酶 (DGAT) 抑制剂、酰基辅酶 A: 胆固醇酰基转移酶 (ACAT) 抑制剂、Niemann Pick C1-样 1 (NPC1-L1) 抑制剂 (例如, 依折麦布 (ezetimibe))、ATP 结合盒 (ABC) 蛋白 G5 或 G8 的激动剂、胆固醇酯转移蛋白 (CETP) 抑制剂、靶向 PCSK9 的抑制性核酸和靶向 apoB100 的抑制性核酸。

[0256] 可以用于药盒的另外的降脂药描述和 / 或综述于例如 Chang 等, *Curr Opin Drug Disco Devel* (2002) 5(4):562-70; Sudhop 等, *Drugs* (2002) 62(16):2333-47; Bays 和 Stein, *Expert Opin Pharmacother* (2003) 4(11):1901-38; Kastelein, *Int J Clin Pract Suppl* (2003) Mar (134):45-50; Tomoda 和 Omura, *Pharmacol Ther* (2007) 115(3):375-89; Tenenbaum 等, *Adv Cardiol* (2008) 45:127-53; Tomkin, *Diabetes Care* (2008) 31(2):S241-S248; Lee 等, *J Microbiol Biotechnol* (2008) 18(11):1785-8; Oh 等, *Arch Pharm Res* (2009) 32(1):43-7; Birch 等, *J Med Chem* (2009) 52(6):1558-68; 以及 Baxter and Webb, *Nature Reviews Drug Discovery* (2009) 8:308-320 中。

[0257] 在一些实施方案中,本发明的抗 PCSK9 抗体或抗原结合分子与他汀类药一起在药盒中提供。示例性的他汀类药包括但不限于阿托伐他汀、西立伐他汀、氟伐他汀、洛伐他汀、美伐他汀、匹伐他汀、普伐他汀、瑞舒伐他汀和辛伐他汀。

[0258] 在一些实施方案中,本发明的抗 PCSK9 抗体或抗原结合分子与诱发高胆固醇血症或甘油三酯血症的药剂一起在药盒中提供。例如,第二药可以是蛋白酶抑制剂,例如沙奎那韦 (Saquinavir)、利托那韦 (Ritonavir)、茚地那韦 (Indinavir)、奈非那韦 (Nelfinavir)、安普那韦 (Amprenavir)、洛匹那韦 (Lopinavir)、阿扎那韦 (Atazanavir)、福沙那韦 (Fosamprenavir)、替拉那韦 (Tipranavir)、达芦那韦 (Darunavir)、阿巴卡韦-拉米夫定-齐多夫定片 (abacavir-lamivudine-zidovudine) (三协唯 (Trizivir))。在一些实施方案中,第二药为他克莫司 (Tacrolimus)。

## 实施例

[0259] 提供了以下实施例来对本发明进行举例说明而不是加以限制。

[0260] 实施例 1 :Pcsk9 拮抗剂 NVPLFU720 的产生和鉴定

[0261] 概述

[0262] 进行了产生抗 Pcsk9 的功能性抗体拮抗剂的研究。鉴定出了多个杂交瘤,这些杂交瘤分泌能够与加 His 标签的该蛋白质结合的抗体。对来自杂交瘤的抗体进行功能性拮抗剂活性的评估,所述活性由抗体抑制 HepG2 细胞上 Pcsk9 介导的 LDL 受体降解(从而导致这些细胞摄取 LDL 胆固醇的能力增加)的能力来度量。鉴定出了强效功能性鼠抗人 Pcsk9 IgG1- $\kappa$  单克隆抗体,将其命名为 NVP-LFU720 (LFU720)。

[0263] 方法

[0264] 抗原和其它蛋白质

[0265] 通过 HEK293Freestyle™ 细胞 (Invitrogen, Carlsbad, Ca) 的转染,产生分泌人 Pcsk9 蛋白的稳定表达细胞系。简言之,使用 Lipofectamine 2000™ 转染试剂和具有 mellittin 信号序列、成熟 Pcsk9cDNA(aa 31-692) 和在序列 C 端上的 his6 (SEQ ID NO:57) 标签 (由 E. Hampton 克隆, GNF, NPL 010051) 的重组质粒,转染在 BioCoat 摇瓶 (Becton Dickinson) 上以贴壁模式在补加了 10% 胎牛血清的 Freestyle™ 培养基 (Invitrogen) 中培养的细胞。转染后 48 小时,通过向培养基中加入 100  $\mu$ g/mL Zeocin,开始阳性转染子的选择。4 周后,形成了 4 个生产 Pcsk9 的细胞的稳定细胞池。使生产水平最高的 4 号池在 Freestyle™ 培养基中适应无血清悬浮条件,随后按比例扩大,以使用 Wave™ 生物反应器在 10-20L 生产量的规模上进行大规模生产。

[0266] 随着时间进行几轮后,获得以 12 至 30mg/L 的速率生产的重组蛋白。收获细胞上清液,通过交叉流过滤进行浓缩。将得到的浓缩液以 0.5mL/分钟加载到 25mL NiNTA His-Bind Superflow 柱 (以 50mM Tris/300mM NaCl/1mM CaCl<sub>2</sub>/2mM  $\beta$ -巯基乙醇 (pH 7.4) 进行平衡)。在以 50mM Tris/300mM NaCl/20mM 咪唑 (pH 7.4) 进行基线洗涤后,以 50mM Tris/300mM NaCl/250mM 咪唑 (pH 7.4) 洗脱结合的物质。将得到的洗脱物对 PBS (pH 7.3) 透析,过滤除菌和进行等分。通过分析性大小排阻色谱,分析样品,以确定低聚化。纯化的蛋白质得到的 HPLC 色谱显示出两个峰,主峰占 85%。全长蛋白质的 HPLC-ESI MS 分析揭示了质量 58176.0Da,这与从所有半胱氨酸残基均被氧化的 mellitin-hsPcsk9 aa31-692-His 预期的质量相符。部分样品还被 N 糖基化。约 13kD 质量的污染性蛋白最可能是蛋白质的游离原结构域 (pro-domain)。再次使用在 Freestyle 培养基中无血清悬浮培养的 HEK293 Freestyle 细胞,以大规模瞬时表达的方法,生产了来自小鼠和食蟹猴的 Pcsk9 的相应同源物。使用聚



乙烯亚胺作为质粒 DNA 的载体,按 1:3( $\mu\text{g/mL}$ : $\mu\text{g/mL}$  DNA:PEI) 的比例,将重组质粒——具有天然前导序列和 C 末端 his6 (SEQ ID NO:57) 标签特征的小鼠 Pcsk9 cDNA 和具有 CD33 前导序列和 C 末端 his6 (SEQ ID NO:57) 标签特征的 cyno Pcsk9——转染到 Freestyle 细胞中。在 Wave™ 生物反应器中,以 10 升的规模进行多轮生产,以类似于上文描述的用于人 Pcsk9 蛋白的操作程序,进行蛋白质纯化和表征。小鼠 Pcsk9 蛋白的产率在 0.7 至 2.7mg/L 培养基之间,cyno Pcsk9 以 3.1mg/L 获得。

[0267] 产生杂交瘤

[0268] 免疫小鼠和产生杂交瘤

[0269] 在免疫 Bcl-2 转基因小鼠 (C57BL/6-Tgn(bcl-2)22wehi 品系) 之前,以弗氏完全佐剂按 1:1 稀释纯化的 Pcsk9。采用要求多位点重复免疫 (RIMMS) 的程序免疫小鼠。简言之,以 1-3  $\mu\text{g}$  的抗原,在接近外周淋巴结 (PLN) 的 8 个特定位点,注射小鼠。在 12 天内重复该程序 6 次。在第 12 天,采集测试血液,使用 ELISA 分析血清抗体滴度。在第 15 天,从高滴度小鼠移出合并的 PLN。为了收获淋巴细胞,以 plain DMEM 洗涤 PLN 两次,然后通过 .22 微米的滤网 (Falcon#352350) 来进行离解。在融合前,将得到的淋巴细胞再洗涤 2 次。按 2.5 个淋巴细胞对 1 个 NSO 细胞的比例,将 NSO/Bcl-2 骨髓瘤细胞与淋巴细胞混合。将细胞混合物离心,随后,在 1 分钟内将 1mL 的 PEG 1500 逐滴加到细胞沉淀中。30 秒后,缓慢加入 1mL 的 DMEM,1 分钟后,在 5 分钟内加入 19mL 的 DMEM。沉淀融合的细胞,以  $2 \times 10^5$  个细胞/mL 的密度重悬浮在 HAT 培养基 (DMEM+20%FBS, Pen/Strep/Glu, 1x NEAA, 1x HAT, 0.5x HFCS) 中,于 37°C 放置 1 小时。然后将细胞按每孔 60  $\mu\text{L}$  加到 384 孔板中。

[0270] 筛选分泌抗 Pcsk9 的功能性抗体的杂交瘤

[0271] 融合后 10 天,对杂交瘤平板筛选 Pcsk9 特异性抗体的存在。为了进行 ELISA 筛选,以 50  $\mu\text{L}$  的 Pcsk9 包被 Maxisorp 384 孔板 (Nunc#464718) (于 PBS 中稀释到 15ng/孔),于 4°C 孵育过夜。吸除剩余的蛋白质,以于 PBS 中 1% 的 BSA 封闭孔室。在于室温下孵育 30 分钟后,以 PBS+0.05% 吐温 (PBST) 洗涤孔室 4 次。将 15  $\mu\text{L}$  杂交瘤上清液转移到 ELISA 平板中。将 15  $\mu\text{L}$  在移出 PLN 时采取的小鼠血清按 1:1000 稀释在 PBS 中,作为阳性对照加入。在 ELISA 平板上的所有孔中加入 50  $\mu\text{L}$  二抗 (山羊抗小鼠 IgG - HRP (Jackson Immuno Research#115-035-071), 按 1:5000 稀释在 PBS 中)。在于室温下孵育 1 小时后,以 PBST 洗涤平板 8 次。加入 25  $\mu\text{L}$  TMB (KPL#50-76-05),于室温孵育 30 分钟后,在 605nm 处读取平板吸光度。将来自阳性孔的细胞扩大至 24 孔板的 HT 培养基 (DMEM+20%FBS, Pen/Strep/Glu, 1x NEAA, 1x HT, 0.5x HFCS) 中。

[0272] 抗体纯化

[0273] 使用蛋白 G (Upstate#16-266 (Billerica, MA)) 纯化包含 LFU720 的上清液。在加载上清液之前,以 10 倍柱体积的 PBS 平衡树脂。在样品结合后,以 10 倍柱体积的 PBS 洗涤柱,然后以 5 倍柱体积的 0.1M 甘氨酸 (pH 2.0) 洗脱抗体。立即以 1/10 体积的 Tris HCl (pH 9.0) 中和柱级分。测量级分的 OD280,合并阳性级分,将其对 PBS (pH 7.2) 透析过夜。

[0274] 结合动力学和 Biacore 测定

[0275] 使用光学生物传感器 Biacore S51,通过表面等离子共振测量,测定动力学结合参数。该技术允许无标记测定配体与受体的结合 ( $k_a$ ) 和解离 ( $k_d$ ) 微观速率常数。因此,它特别适合于表征抗体 - 抗原相互作用。

[0276] 通过以事先固定在S系列CM-5Biacore传感器芯片(经认证的)(Biacore#BR-1005-30)上的兔抗小鼠Fc $\gamma$ 抗体(Biacore#BR-1005-14)捕获小鼠抗体LFU720,进行Pcsk9与LFU720(2 $\mu$ g/mL)的结合研究。以‘Amine Coupling试剂盒’(Biacore#BR-1000-50)进行Fc $\gamma$ 捕获抗体的共价结合。以10 $\mu$ l/分钟的流速,将捕获抗体(兔抗小鼠),以10mM乙酸钠(pH 5)中的50 $\mu$ g/mL抗Fc $\gamma$ 抗体溶液(Biacore#BR-1003-51),结合到EDC活化的葡聚糖表面。使0.5 $\mu$ M至7.8nM(2倍系列稀释)浓度范围的Pcsk9,在PBS加100mM NaCl,0.005%P20(Biacore#BR-1000-54)中,从捕获的LFU720芯片上流过。使用Biacore S51评估软件,分析得到的传感图。将从所有浓度得到的数据全体地拟合到1:1Langmuir模型上。

[0277] TR-FRET测定

[0278] 在384孔白色浅平板(Perkin Elmer,6008280)中进行TR-FRET测定。在15 $\mu$ L的测定缓冲液(20mM HEPES,pH 7.2,150mM NaCl,1mM CaCl<sub>2</sub>,0.1%v/v吐温20和0.1%w/v BSA)中,将hPcsk9-AF(10.7nM)与系列稀释的未标记的hPcsk9蛋白、EGF-A肽或NVP-LFU720-AX-1抗体室温孵育30分钟。随后,将5 $\mu$ L于测定缓冲液中的hLDL-R-Eu(4nM)加到hPcsk9和NVP-LFU720-AX-1预孵育的复合物中,于室温孵育90分钟。这些标记的蛋白质的最终浓度为8nM的hPcsk9-AF和1nM的hLDL-R-Eu。以EnVision 2100多标记读取仪(Perkin Elmer),在330nm激发和665nm发射下,测量TR-FRET信号。使用以下公式将数据转化为经标化的数值:[(665nm值 $\times$ 10,000)/(615nm值)]。用以下公式计算百分比抑制率:100-[(处理样品的标化后数值/未处理样品的平均标化后数值) $\times$ 100]。使用Prism第5版,以公式 $Y=Bottom+(Top-Bottom)/(1+10^{((LogIC50-X)*HillSlope)})$ (GraphPad Prism软件),绘制百分比抑制剂量反应曲线。

[0279] LDL-R周转率测定

[0280] 以胰蛋白酶处理HepG2细胞,将细胞按每孔 $6 \times 10^4$ 个细胞种到预先以1%v/v胶原蛋白包被的平底96孔板(Corning,3595)中的100 $\mu$ L培养基中,然后,在5%CO<sub>2</sub>中于37 $^{\circ}$ C孵育24小时。通常,以100 $\mu$ L包含hPcsk9蛋白、EGF-A肽和/或NVP-LFU720-AX-1抗体的无血清培养基处理细胞。处理后,弃去培养基,以100 $\mu$ L的PBS洗涤细胞。为了收获细胞,加入100 $\mu$ L的Versine(Biowhittaker,17-771E),在5%CO<sub>2</sub>中于37 $^{\circ}$ C孵育1小时,随后加入100 $\mu$ L FACS缓冲液。将细胞转移到V形底96孔板(Corning,3894)中,于1200rpm离心5分钟,以沉淀细胞。为了封闭细胞上非特异性结合位点,向每个孔中加入50 $\mu$ L 100 $\mu$ g/mL于FACS缓冲液中的正常兔IgG(MP biomedical,55944)和小鼠IgG(Sigma,I5381),在冰上孵育30分钟。于1200rpm离心细胞5分钟,通过轻拍平板除去缓冲液。为了标记细胞,向每个孔中加入于FACS缓冲液中的10 $\mu$ L兔抗hLDL-R-Alexa 647IgG(5 $\mu$ g/mL)和10 $\mu$ L小鼠抗铁传递蛋白-R-藻红蛋白(PE)IgG(2 $\mu$ g/mL)(CD71,Becton Dickinson Biosciences,624048)标记的抗体,在冰上孵育60分钟。于1200rpm离心细胞5分钟,通过轻拍平板除去缓冲液。通过以每孔200 $\mu$ L的FACS缓冲液洗涤细胞两次来除去未结合的抗体。在于PBS中的1%多聚甲醛中固定细胞,使用BD LSR II流式细胞仪和FACSDIVA软件(Becton Dickinson),对活细胞进行设门(gate)(5000)和分析。在488nm激发和575nm发射下测量PE荧光的中值。在488nm激发和633nm发射下测量Alexa 647荧光的中值。通过Covance(Denver,PA,美国)制备了定制的兔抗hLDL-R多克隆IgG 583,用于HepG2细胞上

表面 hLDL-R 的 FACS 检测。对于在 HepG2 细胞表面上检测 hLDL-R, 兔抗 hLDL-R IgG 583 表现出约 7 倍于正常兔 IgG 的窗口。为了确定抗 hLDL-R IgG 583 对 HepG2 细胞表面上 LDL-R 的特异性, 用 hLDL-R 蛋白作为该 IgG 结合的竞争剂, 进行了实验。观察到了随着 hLDL-R 蛋白浓度的增加, 抗 hLDL-R IgG 583 对 HepG2 细胞的平均中值荧光的剂量依赖性降低。这证明, 如通过 FACS 所测量的, 抗 hLDL-R IgG 583 特异地识别 HepG2 细胞表面上 LDL-R。后期工作直接将标记的抗 hLDL-R-583-Alexa 647IgG 用于 HepG2 细胞表面上 LDL-R 的 FACS 定量。

#### [0281] LDL-C 摄取

[0282] 以胰蛋白酶处理 HepG2 细胞, 将细胞按每孔  $6 \times 10^4$  个细胞种到预先以 1%v/v 胶原蛋白包被的平底 96 孔板 (Corning, 3595) 中的 100  $\mu$  L 培养基中, 然后, 在 5%CO<sub>2</sub> 中于 37° C 孵育 24 小时。除非另作说明, 以 100  $\mu$  L 包含 hPcsk9 蛋白、EGF-A 肽和 / 或 NVP-LFU720-AX-1 抗体的无血清培养基处理细胞。处理后, 向每个孔加入 20  $\mu$  L 于无血清培养基中的 30  $\mu$  g/mL 3, 3' - 双十八烷基吡啶花青标记的低密度脂蛋白 (DiI-LDL) (Intracell, RP-077-175), 在 5%CO<sub>2</sub> 中于 37° C 孵育 2 小时。通过轻拍平板, 除去培养基, 以 100  $\mu$  L 磷酸盐缓冲盐水 (不含钙或镁的 PBS, Invitrogen, 14190-144) 洗涤细胞。通过轻拍平板, 弃去 PBS, 向每个孔中加入 100  $\mu$  L 0.25% 的胰蛋白酶-EDTA, 在 5% CO<sub>2</sub> 中于 37° C 孵育 5 分钟。向每个孔中加入 100  $\mu$  L FACS 缓冲液 (含 5%FBS、2mM EDTA 和 0.2% 叠氮化钠的 PBS), 通过于 1200rpm 离心 5 分钟沉淀细胞。通过轻拍平板, 除去培养基, 通过向每个孔中加入 50  $\mu$  L 于 PBS 中的 1% 多聚甲醛 (Electron Microscopy Sciences, 15710) 固定细胞。使用 BD LSR II 流式细胞仪和 FACSDIVA 软件 (Becton Dickinson), 对活细胞进行设门和分析。在 488nm 激发和 575nm 发射下测量 DiI-LDL 荧光的中值, 分析了 5000 个细胞。使用微软 Excel 2002 (微软公司) 绘制条形图。按如下计算活化百分比: % 活化 =  $[1 - (X \div A)] \times 100$ , 其中 X = 来自样品孔的中值荧光读数, A = 来自仅以 hPcsk9 处理的孔的中值荧光读数。

[0283] 将活化百分比相对于处理, 进行绘图, 从使用公式  $Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\text{LogEC}_{50} - X) \times \text{HillSlope}))}$  和 GraphPad Prism 5 (GraphPad 软件) 产生的剂量反应曲线, 确定 EC<sub>50</sub>。

#### [0284] 结果

##### [0285] 抗人 Pcsk9 单克隆抗体的产生

[0286] 从以 Pcsk9 蛋白免疫的动物的原代淋巴结, 收获 B 细胞。使用标准 PEG 介导的融合, 产生了杂交瘤。通过 ELISA 测定所得到的融合物, 鉴定出与人 Pcsk9 的阳性结合者, 并扩大以产生上清液。随后通过功能测定, 将多个鉴定出的 ELISA 阳性克隆进行分类。被鉴定为先导候选者的克隆是 LFU720。除了我们的先导候选者 LFU720 以外, 也鉴定出了多个其它克隆, 这些克隆不能阻断 Pcsk9 和 LDLr 的相互作用 (如通过 FRET 所度量的), 但当与 Pcsk9 结合时能够阻断 Pcsk9 介导 LDLr 降解的能力 (如通过 LDLc 摄取来度量的), 包括克隆 21D6、5A4-C1 和 13F1。克隆 21D6 也显示出能够在体内阻断 Pcsk9 的 LDLr 降解作用。

##### [0287] 针对与 Pcsk9 的特异性结合, 筛选 LFU720

[0288] 通过在 ELISA 中评估与一系列其它蛋白质的结合, 检测了 LFU720 的特异性。将 LFU720 与三种其它带 HIS 标签的蛋白质的结合, 和与 Pcsk9-HIS 的结合进行了比较。这证明了与 Pcsk9 的结合是特异的, 以及抗体不与 HIS 标签结合。

[0289] 评估 LFU720 与食蟹猴 Pcsk9 的结合

[0290] 测定了 LFU720 与 Pcsk9 的食蟹猴同源物的结合。为了进行该测定,与 Ni 捕获平板一起使用来自表达食蟹猴 HIS 标签 Pcsk9 的细胞的上清液,从而避免纯化该材料的需要。稀释人 Pcsk9,也通过其 HIS 标签进行捕获。LFU720 与人和食蟹猴 Pcsk9 都能够结合。5P20 在 ELISA 中不与人 LDL-R 或小鼠 Pcsk9 结合。

[0291] LFU720 的结合动力学

[0292] 通过使用光学生物传感器技术 (Biacore),分析了识别人 Pcsk9 蛋白的小鼠抗体 LFU720 的结合亲和力。发现 LFU720 与重组人 Pcsk9 的结合具有亚纳摩尔亲和力 (KD=200pM) 的高亲和力。

[0293] LFU720 阻断 Pcsk9/LDL-R 相互作用的筛选

[0294] 使用 TR-FRET 测定法来确定抗 hPcsk9 抗体 NVP-LFU720 是否能够破坏 hPcsk9-AF 与 hLDL-R-Eu 标记的蛋白质之间的相互作用。对未标记的 hPcsk9 蛋白或 EGF-A 肽进行评估,以证明该测定法能够检测 TR-FRET 信号(由 hLDL-R-Eu 与 hPcsk9-AF 标记的蛋白质的相互作用引起)所遭到的破坏。增加浓度的未标记 hPcsk9 和 hPcsk9-AF 竞争与 hLDL-R-Eu 结合,这导致 TR-FRET 信号的降低。EGF-A 肽破坏了 hLDL-R-Eu 与 hPcsk9-AF 之间的相互作用,其具有 2.5  $\mu$ M 的 IC50。相反,NVP-LFU720 不能很好地破坏 hPcsk9-Eu 与 hLDL-R-AF 之间的 TR-FRET 信号,其具有大于 1000nM 的 IC50,并在低抗体浓度下表现出 U 形反应。

[0295] LFU720 抑制 Pcsk9 介导的 LDL-R 降解的筛选

[0296] 已经显示,Pcsk9 与 LDL-R 的结合导致 LDL-R 降解,使用 HepG2 细胞和重组人 Pcsk9 对此进行了证实。测定了 LFU720 与 Pcsk9 结合以及阻断该效应的能力。NVP-LFU720 抑制外源 hPcsk9 处理的 HepG2 细胞,导致细胞表面 LDL-R 增加。

[0297] LFU720 抑制 Pcsk9 和恢复 LDL 摄取的筛选

[0298] Pcsk9 介导的 LDL-R 降解的抑制应该导致恢复 HepG2 细胞内化 LDL-C 的能力。NVP-LFU720 阻止了以外源 hPcsk9 处理的 HepG2 细胞上 Pcsk9 介导的 LDL-R 降解,并导致 DiI-LDL 摄取的增加,EC50 为 99nM。

[0299] 实施例 2 :产生 PCSK9 拮抗剂抗体 NVP-LGT209、NVP-LGT210 和 NVP-LGT211

[0300] 引言

[0301] 该实施例描述了通过改造鼠单克隆 PCSK9 拮抗剂抗体 NVP-LFU720 以使其与人种系抗体具有更高的序列同源性,从而产生人抗体 NVP-LGT209、NVP-LGT210 和 NVP LGT211。NVP-LGT209、NVP-LGT210 和 NVP LGT211 保留了亲本鼠抗体 NVP-LFU720 的表位特异性、亲和力、和与食蟹猴 PCSK9 的交叉反应性。比原始鼠抗体,NVP-LGT209、NVP-LGT210 和 NVP LGT211 与人种系序列具有高得多的同源性,因此应该更好地被人免疫系统所耐受。

[0302] 将小鼠单克隆抗体 LFU720 进行 Humaneered™,以使其蛋白质序列更接近人种系序列和降低其免疫原性。Humaneering™ 技术可通过南旧金山的 KaloBios(在万维网 kalobios.com 上)获得。抗体的 Humaneering™ 产生改造的人抗体,其具有与人种系序列高度同源的 V 区序列,而仍然保留了亲本或参考抗体的特异性和亲和力(美国专利公布 2005/0255552 和 2006/0134098)。该程序首先鉴定出参考 Fab 的重链和轻链可变区中的最小抗原结合特异性决定簇 (BSDs)(一般是重链 CDR3 和轻链 CDR3 中的序列)。由于这些重链和轻链 BSDs 在 Humaneering™ 过程中构建的所有文库中都被保留下来,因此每个文库都

是表位聚焦的,且最终的、充分 Humaneered™ 的抗体保留原始鼠抗体的表位特异性。

[0303] 接着,产生完整链文库(其中以人序列的文库置换整个轻链或重链可变区)和/或盒文库(其中以人序列文库置换小鼠 Fab 的重链或轻链可变区的一部分)。使用细菌分泌系统将文库的成员表达为抗体 Fab 片段,使用菌落转印结合试验(CLBA)对文库筛选结合抗原的 Fabs。对阳性克隆进行进一步的表征,以鉴定那些具有最高亲和力的克隆。然后,将鉴定到的在剩余的鼠序列背景中支持结合的人盒,在最终的文库筛选中组合,以产生完全人 V 区。

[0304] 所得到的 Humaneered™ 的 Fabs 具有来自人文库的 V 片段序列,保留在 CDR3 区中鉴定的短 BSD 序列,并具有人种系构架区 4。通过将这些人种系的可变区克隆到 IgG 表达载体中,将这些 Fabs 转化为完整的 IgGs。在该过程中产生的完全 Humaneered™ 的抗体保留了亲本鼠抗体的结合特异性,一般具有与亲本抗体等同的或比其更高的亲和力,并具有在蛋白质水平上与人种系抗体基因有高度序列同一性的 V 区域。

[0305] 方法

[0306] 鼠 V 区的克隆

[0307] 使用 RT-PCR,从使用标准方法自杂交瘤细胞系中分离的 RNA,扩增鼠单克隆 NVP-LFU720 的 V 区 DNA。成功用于自杂交瘤 cDNA PCR 扩增重链可变区的引物是 V<sub>H</sub>14(5'-CTT CCTGATGGCAGTGGTT-3';SEQ ID NO:58)(Chardes T 等,1999,FEBS Letters;452(3):386-94)和 HCconstant (5'-GCGTCTAGAAYCTCCACACACAGRRCCAGTGGATAGAC-3';SEQ ID NO:59)。成功用于自杂交瘤 cDNA PCR 扩增轻链(κ)可变区的引物是 V<sub>κ</sub>4/5(5'-TCAGCTTCYTGCTAAT CAGTG-3';SEQ ID NO:60)(Chardes T 等,1999,同上)和 LCconstant(5'-GCGTCTAGAAGTGGTGGGAAGATGG-3';SEQ ID NO:61)。对所扩增的重链和轻链可变区进行测序。然后,使用 PCR 扩增 V 基因和整合用于向 KaloBios 载体中克隆的限制性酶切位点:V<sub>H</sub>在 NcoI(5')和 NheI(3')进入 KB1292-His,所述 KB1292-His 是 KB1292 的经修饰的版本,其在 CH1 上编码具有氨基酸序列 AAGASHHHHHH(SEQ ID NO:62)的一个 C 端柔性接头和 6-His(SEQ ID NO:57)标签;V<sub>κ</sub>在 NcoI(5')和 BsiWI(3')进入 KB1296。然后,通过以 BssHII 和 ClaI 进行限制性消化和连接,将这些分开的重链和轻链载体组合成单个的双顺反子 KaloBios Fab 表达载体。在大肠杆菌中自该载体表达 Fab 片段。测试该 Fab 片段与 PCSK9 抗原的结合,将其称为参考 Fab SR032。

[0308] Fab 纯化

[0309] 通过使用 KaloBios 表达载体从大肠杆菌中分泌表达 Fab 片段。使细胞在 2xYT 培养基中生长至 OD<sub>600</sub> 为约 0.6。通过加入 IPTG 至 100 μM 和于 33°C 摇动 4 小时,诱导表达。通过渗透裂解从周质级分中获得组装的 Fab,使用 Ni-NTA 柱(HisTrap HP 柱;GE Healthcare catalog#17-5247-01),按照标准方法进行亲和色谱纯化。在包含 500mM 咪唑的缓冲液中洗脱 Fabs,并相对于不含钙和镁的 PBS(pH 7.4)进行彻底透析。

[0310] 文库构建

[0311] 在文库构建中的第一步,通过 KaloBios 人 V 片段文库序列的 PCR 扩增,产生表位聚焦的完整人 V 区文库。在制备这些完整链文库中,使用重叠 PCR,将包含 BSD 的独特 CDR3-FR4 区和来自经优化的参考 Fab SR038 的人种系 J 片段序列连接到人 V 片段文库上。不直接筛选这些完整 V 区文库;而是,将它们用作构建 V<sub>H</sub> 和 V<sub>κ</sub> 中间文库的模板。根据在

CDR 区中与原始的鼠 Vh 和 Vk 最接近的人种系序列,选择用于完整链文库构建的 KaloBios 人 V 片段文库。原始的鼠 NVP-LFU720 Vh 在其 CDRs 上与人种系序列 Vh1-02 最接近,因此,使用包含 Vh1 亚群成员的两个 KaloBios 文库的混合物 (KB1410 和 KB1411) 制备完整 Vh 文库。同样,由于 NVP-LFU720Vk 在其 CDRs 上与 Vk3L6 人种系序列最接近,使用包含 Vk3 亚群成员的两个 KaloBios 人 V 片段文库的混合物 (KB1423 和 KB1424) 制备完整的 Vk 文库。然后,以这些全长 Vh 和 Vk 文库作为构建盒文库的模板,在盒文库中仅部分亲本鼠 V 片段被人序列文库替代。通过桥式 PCR 构建两类盒:以上述 Vh1 文库的混合物 (KB1410 和 KB1411) 或 Vk3 文库的混合物 (KB1423 和 KB1424) 作为模板,扩增了在 FR1、CDR1、和 FR2 的前面部分中包含人序列的前端盒。使用上述完整的人 Vh 区或 Vk 区文库作为模板,扩增了在 FR2 的后面部分、CDR2 和 FR3 中包含人序列的中间盒。Vh 盒在 FR2 中于氨基酸位置 45-49 (Kabat 编号) 处具有重叠的共同序列;Vk FR2 中于氨基酸残基 35-39 (Kabat 编号) 处具有重叠的共同序列。以这种方式,通过 PCR 构建了人重链 V1 和 Vκ 3 同种型的前端和中间人盒文库。将每个 Vh 盒文库在 NcoI (5') 和 KpnI (3') 处克隆到载体 KB1292-His 中,将每个 Vk 盒文库在 NcoI (5') 和 HindIII (3') 处克隆到载体 KB1296-B (KaloBios 载体 KB1296 的修改版,其在 FR4 中添加有沉默的 HindIII 位点) 中。然后,通过以 BssHII 和 ClaI 进行消化和其后连接,将所得的 Vh 或 Vk 质粒文库与来自经优化的参考 Fab SR038 的互补链组合 (例如,将 Vh 前端文库与经优化的参考 Vk 载体组合),以产生表达完整 Fabs 的双顺反子载体的文库。

#### [0312] 一般 ELISA

[0313] 重组人或食蟹猴 PCSK9-His6 抗原用于所有的 ELISA 测定。典型地,通过于 4°C 孵育过夜,将稀释于 PBS (pH 7.4) 中的 PCSK9-His6 抗原,按 300ng/孔结合到 96 孔微量滴定板中。以于 PBS 中 3% 的 BSA 溶液于 37°C 封闭该平板 1 小时,然后以 PBST 清洗一次。向每个孔中加入包含 Fab 的诱导的细胞培养基、或稀释的纯化的 Fab (50 μL)。在于 37°C 孵育 1 小时后,以 PBST 清洗平板 3 次。向每个孔加入按 1:5000 稀释于 PBS 中的抗人 κ 链 HRP 缀合物 (Sigma#A7164) (50 μL),将平板于室温孵育 45 分钟。以 PBST 洗涤平板 3 次,然后向每个孔加入 100 μL SureBlue TMB 底物 (KPL#52-00-03),将平板于室温孵育约 10 分钟。在分光光度计中于 650nm 处读取平板。

[0314] 为了对纯化的人和小鼠 IgGs 进行特异性 ELISAs,以一组纯化的人或鼠抗原,按每孔 88ng,包被 384 孔平板,于 4°C 孵育过夜。按如上描述封闭和洗涤平板,然后向每个孔中加入 22 μL 于 PBS 中稀释至 2 μg/mL 的纯化的小鼠或人抗 PCSK9 抗体。将平板于 37°C 孵育 1 小时,然后以 PBST 洗涤。将抗小鼠 Fc 抗体 (Jackson ImmunoResearch Labs#115-035-071) 或与 HRP 缀合的抗人 κ 抗体 (Sigma#A7164) 按 1:5000 稀释于 PBS 中 (25 μL),加到每个孔中。将平板于室温孵育 1 小时,然后按如上描述进行洗涤和显色。

#### [0315] 菌落转印结合试验 (CLBA)

[0316] 使用以 6 μg/mL 的 PCSK9-His6 包被的硝酸纤维素滤膜,基本按照美国专利公布 2005/0255552 和 2006/0134098 中的描述,进行 Fab 片段的 Humaneered™ 文库的筛选。使用按 1:5000 稀释于 PBST 中的碱性磷酸酶缀合的抗人 κ 轻链抗体 (Sigma#A3813),检测与包被有抗原的滤膜结合的 Fabs,以针对碱性磷酸酶的 DuoLux 化学发光底物 (Vector Laboratories #SK-6605) 对印迹进行显色。

[0317] 生物素化重组 PCSK9 的产生和亲和力测定

[0318] 通过在 pRS5a/PCSK9 质粒中编码 PCSK9 和 His6 (SEQ ID NO:57) 标签的基因之间插入 EcoRI 限制性位点,产生具有 C 末端 Avi-(用于定点生物素化)和 His6 (SEQ ID NO:57) 标签的 PCSK9 (PCSK9-Avi-His6);表达带 C 末端 His6 (SEQ ID NO:57) 标签的 PCSK9 (Uniprot 登录号 Q8NBP7) 的第 31-693 位氨基酸。以 T4 多核苷酸激酶 (Invitrogen),将编码 Avi 标签 (氨基酸序列:GGGLNDIFEAQKIEWHE;SEQ ID NO:63) 及侧翼有 EcoRI 突出端的寡核苷酸进行磷酸化,退火,随后利用新插入的 EcoRI 位点连接到 pRS5a/PCSK9 中。通过测序分析,验证包含 Avi 标签的克隆。在 293Freestyle 表达系统 (Invitrogen) 中进行 PCSK9-Avi-His6 的表达,使用 Ni-NTA 树脂 (QIAGEN) 纯化所分泌的重组蛋白。纯化后,将 PCSK9-Avi-His6 蛋白对 10mM Tris pH 8.0, 50mM NaCl 进行透析。以生物素-蛋白质连接酶 (Avidity),按照生产商的规程,对蛋白质进行体外生物素化。完成后,将反应物对 PBS pH 7.2 进行透析,通过 Western 印迹、以 HRP 缀合的链霉抗生物素蛋白为探针,对生物素化进行验证。

[0319] 使用溶液平衡滴定 (“SET”) 测定法,分析 IgGs 和 Fab 片段的结合动力学。简言之,将 hPCSK9 的系列稀释液加到 60pM 的 IgG 或 Fab 中,孵育过夜。以 1  $\mu$ g/ml 的 hPCSK9 包被 96 孔标准结合 (Standard Bind) 微量滴定板 (Meso Scale Discovery),孵育过夜,以 PBS/0.05% (w/v) 吐温 20 洗涤,以 PBS/5% (w/v) BSA 封闭,再次洗涤。将抗体-抗原制备液加到 PCSK9 包被的标准结合板中,于室温下孵育 30 分钟。在进行 3 次另外的洗涤步骤后,加入 Sulfo-Tag 标记的羊抗人检测抗体 (R32AJ-5, Meso Scale Discovery),于室温孵育 1 小时。在洗涤平板 3 次后,加入读数缓冲液 (Read Buffer) (Meso Scale Discovery),以 Sector Imager 6000 (Meso Scale Discovery) 测量电化学发光 (ECL) 信号。用 Excel 插件 XLfit 4.3.2 (ID Business Solutions),使用描述于 Piehler 等, (1997) J Immunol Methods 201:189-206 中的适合于抗体的拟合模型,处理 ECL 数据。观察到了在溶液中人 PCSK9 与抗体 LGT209、LGT210 和 LGT211 之间的高亲和力结合,每个抗体的计算 KD 值为 150-190pM。

[0320] 产生和纯化抗体

[0321] 通过使用 293fectin 转染试剂 (Invitrogen#51-0031),按照生产商的规程,将如下载体共转染到 293Freestyle 细胞中,产生完全 Humaneered™ 的 NVP-LGT209、NVP-LGT210 和 NVP-LGT211 抗体 (沉默的 IgG1  $\kappa$ )。

[0322] LGT-209-pJG04 (Vh)+pJG10 (Vk)

[0323] LGT-210-pJG04 (Vh)+pJG01 (Vk)

[0324] LGT-211-pSR74 (Vh)+pJG10 (Vk)

[0325] 使用 5-mL 的 HiTrap 蛋白 A HP 柱 (GE Healthcare#17-0403-03),从 293Freestyle 细胞上清液中纯化抗体。使用 IgG 洗脱缓冲液 (Pierce #21004) 洗脱抗体,通过透析将缓冲液交换成 PBS。在 AKTAFPLC 液相色谱系统 (GE Healthcare) 上进行蛋白 A 亲和色谱。

[0326] 表位竞争测定试验

[0327] 使用 ForteBio Octet QK 系统和包被有生物素化 PCSK9-Avi-His6 的链霉抗生物素蛋白高结合生物传感器 (Streptavidin High Binding Biosensors),测定原始小鼠抗体 NVP-LFU720 和其 Humaneered™ 衍生物 NVP-LGT209 之间对 PCSK9 上表位结合的竞争。然后,将以下 3 个不同的抗体结合到分开的 PCSK9 包被的传感器上至饱和:小鼠 LFU720、完全人 LGT209 或对照小鼠抗体 7D16 (已知其与 LFU720 具有分开的表位)。接着,将所有的传感器

浸入到包含 LFU720 小鼠抗体的孔中,以确定第一抗体是否能够阻断 LFU720 结合。

[0328] 结果

[0329] 鼠和参考 V 区氨基酸序列

[0330] 将来自表达 NVP-LFU720 的杂交瘤的 RT-PCR 产物测序,通过使用 ThermoElectron LTQ-Orbitrap 质谱仪,该序列在蛋白质水平上大部分 (95% 或更高) 得到了验证。然后,将 LFU720 的重链和轻链可变区克隆到 KaloBios 载体中,以产生参考 Fab SR032。不得不将 NVP-LFU720Vk 中第一个氨基酸从谷氨酰胺 (Q) 改变为谷氨酸 (E),以使其能够克隆到 KaloBios 载体中来产生参考 Fab SR032;因此,SR032Vk 在第一个 Vk 位置上具有谷氨酸。Fab SR032 具有来自 NVP-LFU720 的完整鼠 V 区,其与人恒定区融合,将其从大肠杆菌中纯化。在 PCSK9-His6 抗原结合的稀释 ELISA 测试中,所克隆的 SR032 参考 Fab 产生依赖 Fab 浓度的结合曲线。除了参考 Fab (SR032) 以外,还构建了优化的参考 Fab,SR038。SR032 中的几个构架氨基酸残基在 SR038 中被改变成人种系的。

[0331] 参考和优化的参考 Fab 的亲和力分析

[0332] 在 FR1 和 FR3 中整合到优化的参考 SR038 中的人种系残基是由用于扩增人 V 片段全库 (repertoire) 的 PCR 引物所规定的,因此它们存在于 Humaneered™ V 区文库的所有成员中。构建优化的参考 Fab 来评估是否任何至人种系的变化都改变 Fab 结合的特性。通过使用纯化的 Fabs 进行稀释 ELISA,确定了 SR032 和 SR038 对重组 PCSK9 抗原的亲和力是相同的,表明 SR038 中的氨基酸改变是被耐受的。

[0333] 文库构建和选择完全 Humaneered™ 的 Fabs

[0334] 产生了重链和轻链前端和中间盒文库(限于 Vh1 或 Vk3 的亚群),通过 CLBA 进行筛选。对于 Vh,通过菌落转印结合试验,鉴定出了支持与 PCSK9 抗原结合的前端盒,但没有鉴定出 Vh 中间盒。对于 Vk,前端和中间盒都通过菌落转印而被鉴定出来,此外,也鉴定出了一些完整 Vk 克隆(由于 Vk 前端文库被完整链 Vk 克隆污染而引起)。来自每个文库的许多结合者在以包含 Fab 的细胞上清液进行的 ELISA 测定中再次得到确认,自每个文库从周质级分中纯化了几种 Fabs,使用 Forte 分析按亲和力进行了等级排序。

[0335] 由于没有鉴定到支持 PCSK9 结合的 V 重链中间盒,构建了两个诱变文库,它们在重链 CDR2 或 FR3 中的所有位置上编码亲本鼠残基或最接近的人种系残基。由此,构建了改造的人中间盒文库,对其进行了筛选,鉴定出了抗原结合克隆。然后,将在各克隆中支持结合的 Vh 中间盒中向人种系的改变进行组合,以产生一个最终的中间盒,通过 Forte 分析,确认了在优化的参考 Fab 背景中包含该盒的 Fab 具有与优化的参考 Fab 一样好的结合亲和力。

[0336] 通过 CLBA,对于重链和轻链都从所产生的文库中成功鉴定出了支持与 PCSK9 结合的前端和中间盒。通过 ELISA,对这些结合物都进行了确认,然后,使用 ForteBio Octet 系统对 Fabs 进行了纯化和等级排序。通过桥式 PCR,将重链和轻链的高等级盒组合成一个最终的文库,通过 CLBA 从该文库中选择支持与 PCSK9 结合的完全 Humaneered™ 的 Fabs。与此平行,将所有排位第一的盒或链(最好的 Vh 前端、改造的 Vh 中间、最好的完整轻链)组合在一起,以产生单个 Fab SR066,预期其支持高亲和力的结合。

[0337] 亲本小鼠 mAb NVP-LFU720 以及 Humaneered™ Abs NVP-LGT209、NVP-LGT210 和 NVP-LGT211 的重链和轻链可变区序列分别显示于图 1-4 中。

[0338] 使用 ForteBio Octet 分析测试完全 Humaneered™ 的 Fabs 对 PCSK9 抗原的亲和力



[0339] 对 Humaneered™ SR066 Fab 和从最终组合文库中挑出的 3 个 Fabs (#1-2, #3-2, 和 #4-2) 进行了表达和纯化。然后,使用 ForteBio Octet 系统,将这 4 个人 Fabs 的结合动力学与优化的参考 Fab SR038 的动力学进行了比较(数字数据总结于表 1 中)。

[0340] 表 1、完全 Humaneered™ Fabs 对 PCSK9 的亲合力

	<b>Fab</b>	<b><math>k_a</math></b>	<b><math>k_d</math></b>	<b><math>K_D</math></b>
	<b>SR038</b>	<b>1.39E3</b>	<b>5.12E-4</b>	<b>3.69E-7</b>
[0341]	<b>SR066</b>	<b>3.25E3</b>	<b>1.08E-3</b>	<b>3.33E-7</b>
	<b>#1-2</b>	<b>6.91E3</b>	<b>2.16E-3</b>	<b>3.13E-7</b>
	<b>#3-2</b>	<b>5.92E3</b>	<b>1.46E-3</b>	<b>2.47E-7</b>
	<b>#4-2</b>	<b>***</b>	<b>***</b>	<b>***</b>

[0342] \*\*\* 没有检测到 #4-2Fab 足以产生可靠动力学数据的结合。

[0343] 很难对这些 Fabs 进行蛋白质浓度确定;就此,解离速率( $k_d$ )数据比结合速率( $k_a$ )和  $K_D$  数据可靠得多(只有解离速率是浓度不依赖性的)。所有测试的 4 个 Humaneered™ Fabs 都表现出具有比优化的参考 Fabs“差”3 至 4 倍(即,更快)的解离速率。该亲和力的降低可能是由于这些克隆中的重链前端引起的,因为从原始的重链前端盒文库中选择的所有 Fab 结合者都显示出比优化的参考 Fab“差”的解离速率(数据未显示)。由于重链前端包含 CDR1,在  $V_h$  前端盒中对该 CDR 的改变是导致最终 Humaneered™ 的 Fabs 亲和力降低的潜在原因。在完全 Humaneered™ Fabs 中,SR066 具有最好的解离速率(表 1),在重链 CDR1 中 SR066 和参考(小鼠)序列之间存在 3 处不同。为了测试对 CDRH1 的改变是导致在所有 Humaneered™ Fabs 中都观察到的亲和力降低的原因,我们一次同时将 SR066 的 CDRH1 中两个残基变回至匹配原始的鼠残基,表达和纯化这些改变了的 Fabs 用于 Forte 动力学分析。

[0344] 一个在 CDRH1 中具有两个同时的改变的 Fab(SR079)(表 2)显著提高了 SR066 的结合动力学(数字数据总结于表 3 中)。事实上,SR079Fab 表现出具有与优化的参考(小鼠)Fab SR038 相等的解离速率。

[0345] 表 2、CDRH1-变体 Fab SR079\* 的 CDRH1 序列

[0346]

SR066(humaneered)	TYYMN	SEQ ID NO:64
SR038(小鼠)	DMYMS	SEQ ID NO:65
SR079(humaneered)	TMYMS	SEQ ID NO:66

[0347] \* 以加粗表示人(SR066-衍生的)或不变残基,以正常字体表示鼠残基。

[0348] 表 3、SR079Fab 对 PCSK9 的亲合力

	<b>Fab</b>	<b>k<sub>a</sub></b>	<b>k<sub>d</sub></b>	<b>K<sub>D</sub></b>
[0349]	<b>SR038</b>	<b>2.69E3</b>	<b>3.68E-4</b>	<b>1.37E-7</b>
	<b>SR079</b>	<b>6.01E3</b>	<b>3.26E-4</b>	<b>5.42E-8</b>

[0350] Humaneered™ Fabs SR066、#1-2、#3-2 和 #4-2 在 CDRH2 中包含来自原始小鼠抗体的“Asn-Gly” (“NG”) 氨基酸序列。已知该序列潜在经历脱酰胺作用,这是对生产是非期望的特性。因此,在努力提高 Humaneered™ SR066Fab 的亲力的同时,在 SR066 背景下构建了两个诱变文库,其中“N”或“G”被除原始氨基酸以外的每种可能的氨基酸替代(例如,在“N 移去文库”中,“N”被除“N”以外的每种氨基酸替代)。然后,通过 ELISA 从该文库中筛选含 Fab 的细胞上清液,以鉴定不再具有“NG”序列而仍然保留 SR066 结合水平(其比优化的参考 Fab SR038 的水平低)的克隆。“N 移去文库”不产生任何与 SR066 相同程度结合的 Fabs,而“G 移去文库”产生具有足够结合水平的 Fabs,这些 Fabs 在“G”位置上具有许多不同替代。从这些 Fabs 中选择具有“NG”至“NE”、“NA”和“NM”改变的 Fabs,进行纯化和 Forte 动力学分析,发现它们具有与亲本 Fab SR066 类似的动力学。

[0351] 改造 7472 人 IgG 以提高亲和力

[0352] Vk 改造

[0353] 为了产生完全人 IgG,通过桥式 PCR,扩增 SR079(SR066 的修改版,其具有提高的亲合力)中直至 CDRH2 的 Vh 序列,并缝接到“G 移去文库”克隆(在 CDRH2 中包含“NE”)的从 CDRH2 到大部分 FR4 的序列上。将该 Vh 序列在 NruI(5') 和 KpnI(3') 处克隆到 pRS5a-hIgG1LALA+KpnI(沉默 IgG1 克隆载体,其已经过修改,在 FR4 中加入了 KpnI 位点而不影响 Vh 的氨基酸序列)中,以产生 pSR074。扩增来自 SR066 的 Vk(从 FR1 直到 FR4 的一半),在 AgeI 和 BsiWI 处克隆到 pRS5a-hkappa 中,以产生 pSR072。通过测序验证这些载体,将其共转染到 293Freestyle 细胞中。从包含抗体的细胞培养基中纯化该 IgG(将其称为“7472”)。令人惊讶的是,通过 Biacore 分析,抗体 7472 具有比亲本小鼠抗体 LFU720 显著更慢的结合速率(未显示)。通过将每个人链与互补的亲本小鼠链进行互换,确定了该结合速率的缺陷是由于人轻链的问题。对 pSR072 人轻链进行了改变来回复亲和力(表 4):将轻链的头 4 个残基转变回鼠序列,将 CDR1 的第二半部分中的残基转变回鼠的。按以上的描述将该轻链克隆到 pRS5a-hkappa 中,产生 pJG10 和 pJG01,通过 pSR074(Hc 载体)和 pJG10(Lc 载体)或 pJG01(Lc 载体)的共转染,产生了完整的 IgG。总之,当通过 Biacore 进行测定时,这些改变部分回复了 Humaneered™ 抗体的亲和力。

[0354] 表 4、对 IgG 7472 轻链的改变

	<u>LC N 端</u>	<u>(SEQ ID NO:)</u>		<u>LC CDR1 (SEQ ID NO:)</u>
[0355]	7472	<u>EIVM (67)</u>	7472	<u>RASQSVSSSHVA (68)</u>
	LFU720	<u>QIVL (69)</u>	LFU720	<u>SASSSVS--YMH (70)</u>
	pJG10	<u>QIVL (69)</u>	pJG10	<u>RASQSVS--YMH (71)</u>

[0356] 表 4 显示了人抗体 7472、亲本小鼠抗体 LFU720 的轻链和 pJG10 编码的轻链的部分的比对。该部分与 pJG01 编码的轻链相同。将这些轻链载体用于表达最终的 Humaneered™ 抗体 NVP-LGT209、NVP-LGT210 和 NVP-LGT-211。

[0357] CDRH3 的亲和力成熟

[0358] 在对轻链进行改变的同时,构建了 Fab 文库来进行 pSR074 重链的 CDR3 的亲合力成熟。在该文库中,CDR3 残基被除了原始残基以外的每个其它氨基酸进行了单替代。通过 CLBA 筛选该文库,以 ELISA 验证结合者,对得到的 Fabs 进行纯化和通过生物膜干涉 (bio-layer interferometry) 进行测试,以确定它们相对于亲本人 Fab 来说是否具有改良的结合动力学。

[0359] 鉴定出了一个显著提高亲和力的 CDRH3 替代:A 至 N 的改变(表 5)。随后,在 pSR074 重链 IgG 表达质粒背景中进行了该改变;将该新的构建体称为 pJG04。通过 pJG04(Hc) 和 pJG10 的共转染及随后的纯化,产生最终的 Humaneered™ 抗体 NVP-LGT209(LGT209)。通过 pJG04(Hc) 和 pJG01 的共转染及随后的纯化,产生最终的 Humaneered™ 抗体 NVP-LGT210(LGT210)。没有向抗体 NVP-LGT211(LGT211) 中引入该改变。

[0360] 表 5、对 IgG 7472 重链 CDR3 的改变

	<b>CDRH3 序列</b>	<b>SEQ ID NO:</b>
[0361]	<b>7472</b>	<b>CARSYYYYAMDY</b>
	<b>LFU720</b>	<b>CARSYYYYAMDY</b>
	<b>pJG04</b>	<b>CARSYYYYNMDY</b>

[0362] 表 5 显示了人抗体 7472、亲本小鼠抗体 LFU720 的重链 CDR3 和 pJG04 编码的重链(用于表达最终的 Humaneered™ 抗体 NVP-LGT209 和 NVP-LGT210 的重链载体)的比对。以下加下划线表示 A 至 N 的替代。

[0363] 使用溶液平衡滴定 (SET) 系统分析 NVP-LGT209、NVP-LGT210 和 NVP-LGT211 的结合动力学

[0364] 使用 SET 测定法,测定了 NVP-LGT209、NVP-LGT210 和 NVP-LGT211 抗体对人 PCSK9 的结合亲和力为 150-190pM,如表 6 中所示。这说明,在溶液中抗体和 PCSK9 之间高亲和力的相互作用。

[0365] 表 6

[0366]

抗体	KD[pM]
LGT209	190 ± 50
LGT210	150 ± 50
LGT211	190 ± 50

[0367] 通过 ELISA 分析 NVP-LGT209 的抗原特异性

[0368] 为了测试在最终的 Humaneered™ IgGs, LGT209、LGT210 和 LGT211,中是否保留了亲本小鼠抗体 LFU720 的抗原特异性,在 ELISA 测定试验中测试了这些抗体与一组人和小鼠抗原(以及人 PCSK9)的结合。该测定的结果(图 5A-C)显示, LGT209、LGT210 和 LGT211 保留了对 PCSK9 的高度特异性,类似于鼠抗体 LFU720。

[0369] 在 ELISA 中抗体与人和食蟹猴 Pcsk9 蛋白的结合

[0370] 对 LGT209、LGT210 和 LGT211 与人和食蟹猴 (cyno)Pcsk9 的特异性结合进行了评估。该 ELISA 测定显示,与亲本小鼠抗体 LFU720 一样, Humaneered™ 抗体 LGT209、LGT210 和 LGT211 能够以类似的方式结合人和食蟹猴 (cyno)Pcsk9 (图 6A-C)。

[0371] 基于生物膜干涉的表位竞争试验

[0372] 为了测试在最终的 Humaneered™ 抗体 LGT209、LGT210 和 LGT211 中是否保留了亲本小鼠抗体 LFU720 的表位特异性,使用 ForteBio Octet 系统进行了竞争试验。Humaneered™ 抗体 LGT209、LGT210 和 LGT211 阻断亲本小鼠抗体 NVP-LFU720 的结合,表明 Humaneered™ 抗体保留了原始鼠抗体的表位特异性。当改变抗体的加样顺序时,即先进行 NVP-LFU720 结合,随后加 Humaneered™ 抗体,也得到了类似的结果。

[0373] Humaneered™ 抗体 LGT209、LGT210 和 LGT211 的氨基酸序列和与人种系序列的百分比同一性

[0374] 最终的 Humaneered™ 抗体 LGT209、LGT210 和 LGT211 的可变区氨基酸序列分别显示于图 2-4 中;以加下划线和加粗表示 CDRs。在序列列表中包括了核苷酸序列。

[0375] 通过 Vh 和 Vk 氨基酸序列对单个人种系序列(分别为 Vh11-02 和 Vk3A27;表 7)的比对,确定了抗体 LGT209、LGT210 和 LGT211 对人种系序列的百分比同一性。在每条链的计算中略去了 CDRH3 和 CDRL3 中的残基。

[0376] 表 7、抗体 LGT209、LGT210 和 LGT211 对人种系序列的百分比同一性

	Vh 对 Vh1 1-02	Vk 对 Vk3 A27
[0377]	89%	91%

[0378] 在图 8-14 的图注中讨论了有关 humaneered 抗体的功能特性的其他信息。

[0379] 实施例 3 :PCSK9 拮抗剂抗体 NVP-LGT209、NVP-LGT210 和 NVP-LGT211 的突变分析

[0380] 评估了 PCSK9 拮抗剂抗体 NVP-LGT209、NVP-LGT210 和 NVP-LGT211 的变体与 PCSK9 结合的能力。结果总结如下:

[0381] 关于重链 CDR1, TMYMS (SEQ ID NO:66), 只有包含原始小鼠残基(以加粗表示)的克隆保留小鼠 Ab 的结合动力学(通过生物膜干涉分析所测定的)。因此,重链 CDR1 中的这些残基在结合中起作用。

[0382] 关于重链 CDR2, RIDPANEHTNYAQKFQG (SEQ ID NO:74), 在从文库中挑出的抗体结合者中以加粗表示的残基没有被改变,所述文库在各位置上分别编码原始(小鼠)残基或最接近的人种系序列中的相应残基(通过 ELISA 筛选)。因此,以加粗表示的残基在结合中起作用。在加下划线的 Glu 残基所示的位置上,保守性替代是被耐受的,例如,如通过 ELISA 所确定的和通过生物膜干涉所验证的,该位置可以是 A、E 或 D。

[0383] 关于重链 CDR3, SYYYY (A/N)MDY (SEQ ID NO:75), 在从亲和力成熟文库中挑出的克隆中以加粗表示的残基没有被改变,所述文库在各位置上编码所有可能的氨基酸(除原始氨基酸以外)。因此,以加粗表示的残基在结合中起作用。在加下划线的 Ala 或 Asn 残基所示的位置上,保守性替代是耐受的,例如,如通过 Biacore 所确定的,该位置可以是 A、N 或 Q。在加下划线的 Tyr 残基所示的位置上,保守性替代是耐受的,例如,如通过 Biacore 所确定的,该位置可以是 A、F、S、V 或 Y。

[0384] 关于轻链 FR1, (E/Q)IV (M/L)TQSPATLSVSPGERATLSC (SEQ ID NO:76), 如通过

Biacore 所确定的,在加下划线的第 1 和 4 位上,保守性替代是耐受的。例如,第 1 位的氨基酸可以是 A、D、E、N 或 Q。第 4 位的氨基酸可以是 V、I、L 或 M。如通过 Biacore 所确定的,第 1-4 位为 QIVL (SEQ ID NO:69) (如小鼠亲本 LFU720、LGT209 和 LGT211Vk 中的) 时比第 1-4 位为 EIVM (SEQ ID NO:67) (如 LGT210Vk 中的) 时具有改良的结合。

[0385] 关于轻链 CDR1, RASQSVSYM<sup>H</sup> (SEQ ID NO:71), 以加粗表示的残基的间距对结合具有影响,因为在 Lc CDR1 的该位置中具有 2 个额外氨基酸的人克隆是亲和力受损的。因此,以加粗表示的残基在结合中起作用。

[0386] 关于轻链 CDR3, LQWSSDPPT (SEQ ID NO:26), 如通过 ELISA 所测定的,在这些位置上改变为人种系是不耐受的。因此,以加粗表示的残基在结合中起作用。

[0387] 应理解的是,本文中描述的实施例和实施方案仅为了举例说明目的,本领域技术人员明了基于它们的各种修改和改变,这些修改和改变应该包括在本申请的精神和范围以及所附加的权利要求的范围内。本文中引用的所有出版物、专利、专利申请和序列登录条目为了所有目的以引用的方式就其全部内容并入本文中。

## 亲本小鼠 mAb LFU720 的可变区序列

### LFU720 重链可变区

EVQLQQSGAELMKPGASVKLSCTASGFNIKDMYMSWVRQRPEQGLEWIGRIDPAN  
GHTNYDPKFQAKATITTTDTSSKTAYLHLSSLTSEDTAVYYCARSSYYYAMDYWGQ  
GTSVTVSS

### LFU720 轻( $\kappa$ )链可变区

QIVLTQSPAIMASAPGEEKVTMTCSASSVSMHWYQQKPGSSPRLWIYLTFNLA  
SGVPARFSGSGSGTSSYSLSISSMEAEAAATYYCLOWSSDPPTFGSGTKLEIK

图 1

## Ab NVP-LGT209 的可变区序列

### pJG04(Vh)+pJG10(Vk)

#### pJG04 Vh

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFSTMYMSWVRQAPGQGLEWMGRIDPA  
NEHTNYAOKFOGRVTMTRDTSISTAYMELSRLLTSDDTAVYYCARSSYYYNMDYW  
GQGLVTVSS

#### pJG10 Vk

QIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRASOSVSMHWYQQKPGQAPRLLIYGVFERRATGI  
PDRFSGSGSGTDFTLTIGRLEPEDFAVYYCLOWSSDPPTFGQGTKLEIK

图 2

**Ab NVP-LGT210 的可变区序列****pJG04(Vh)+pJG01 (Vk)****pJG04 Vh**

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSTMYMSWVRQAPGQGLEWMGRRDPA  
NEHTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLLTSDDTAVYYCARSSYYYYNMDYW  
 GQGTLVTVSS

**pJG01 Vk**

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASOSVSYMHWYQQKPGQAPRLLIYGVFRRATG  
 IPDRFSGSGSGTDFTLTIGRLEPEDFAVYYCLOWSSDPPTFGQGTKLEIK

图 3

**Ab NVP-LGT211 的可变区序列****pSR74(Vh)+pJG10 (Vk)****pSR074 Vh**

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSTMYMSWVRQAPGQGLEWMGRRDPA  
NEHTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLLTSDDTAVYYCARSSYYYAMDYW  
 GQGTLVTVSS

**pJG10 Vk**

QIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRASOSVSYMHWYQQKPGQAPRLLIYGVFRRATGI  
 PDRFSGSGSGTDFTLTIGRLEPEDFAVYYCLOWSSDPPTFGQGTKLEIK

图 4

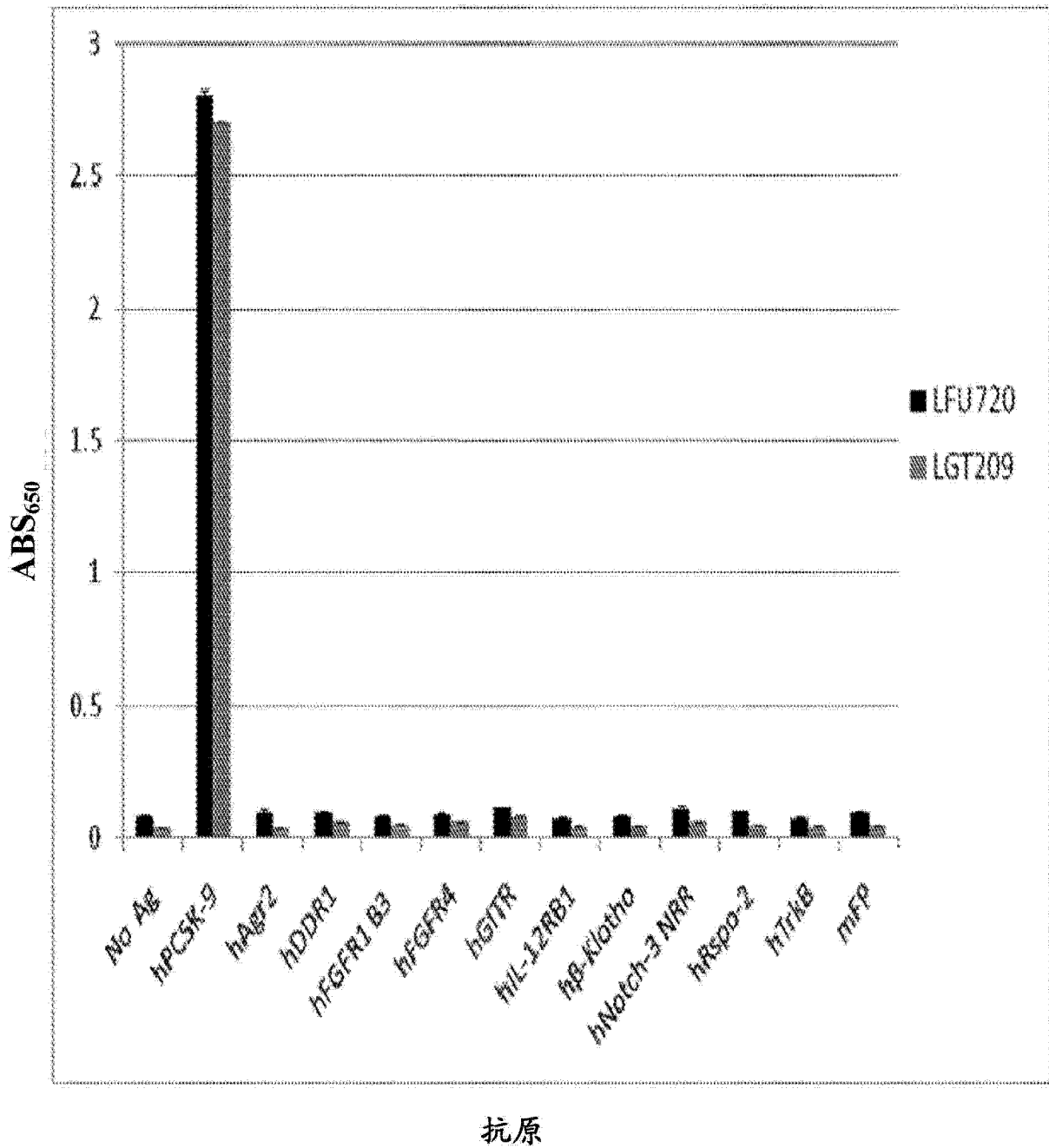
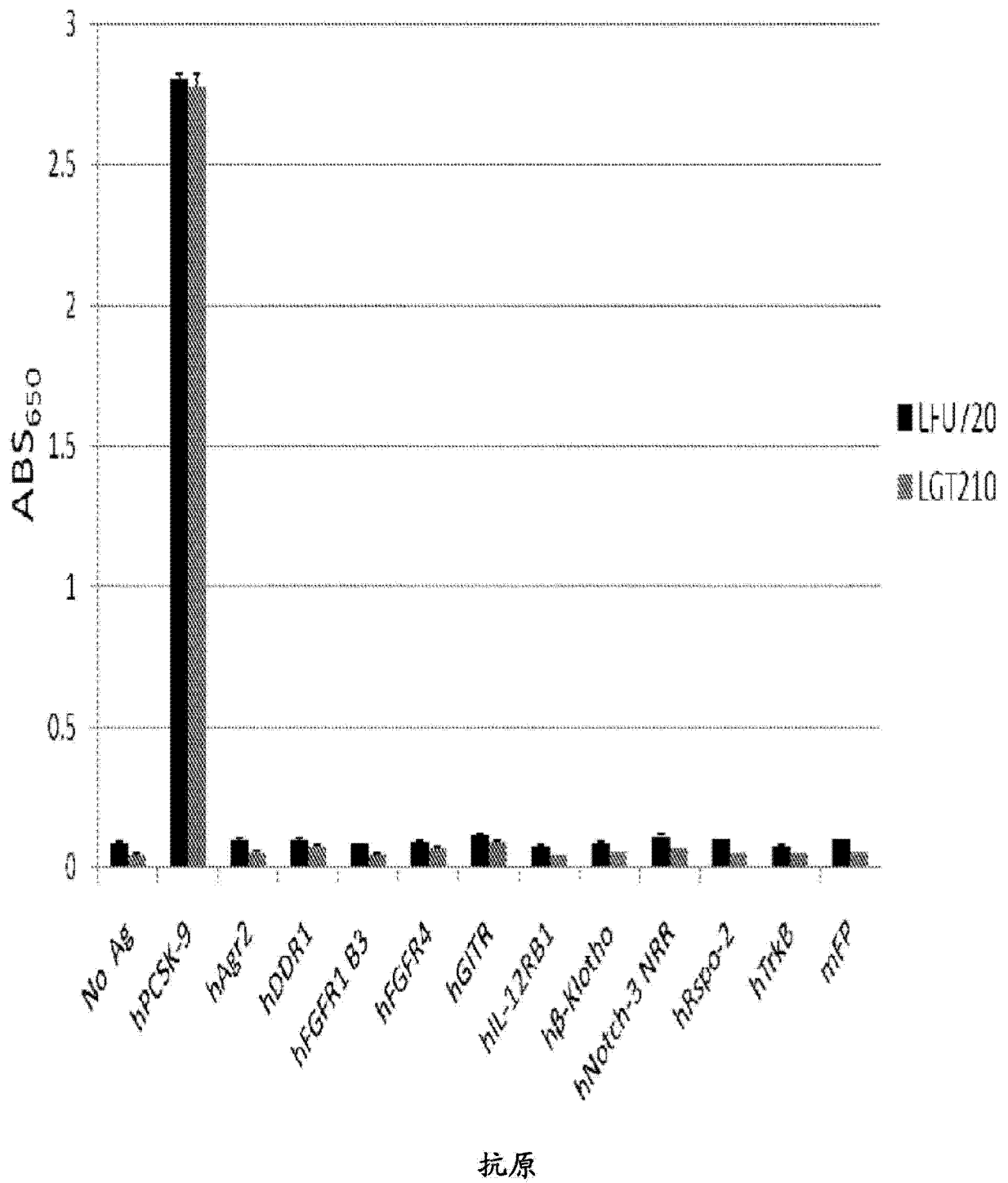


图 5A





抗原

图 5B

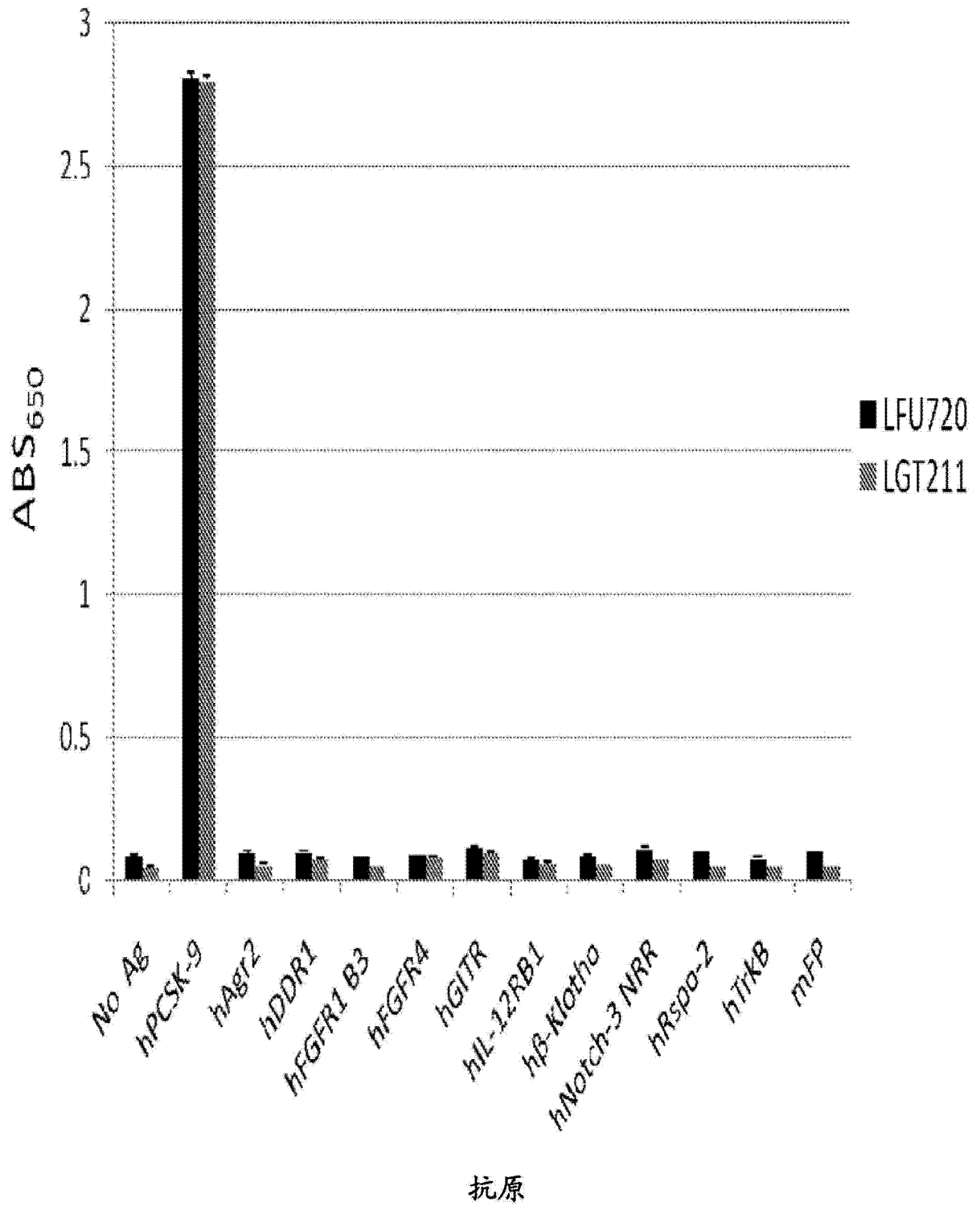


图 5C

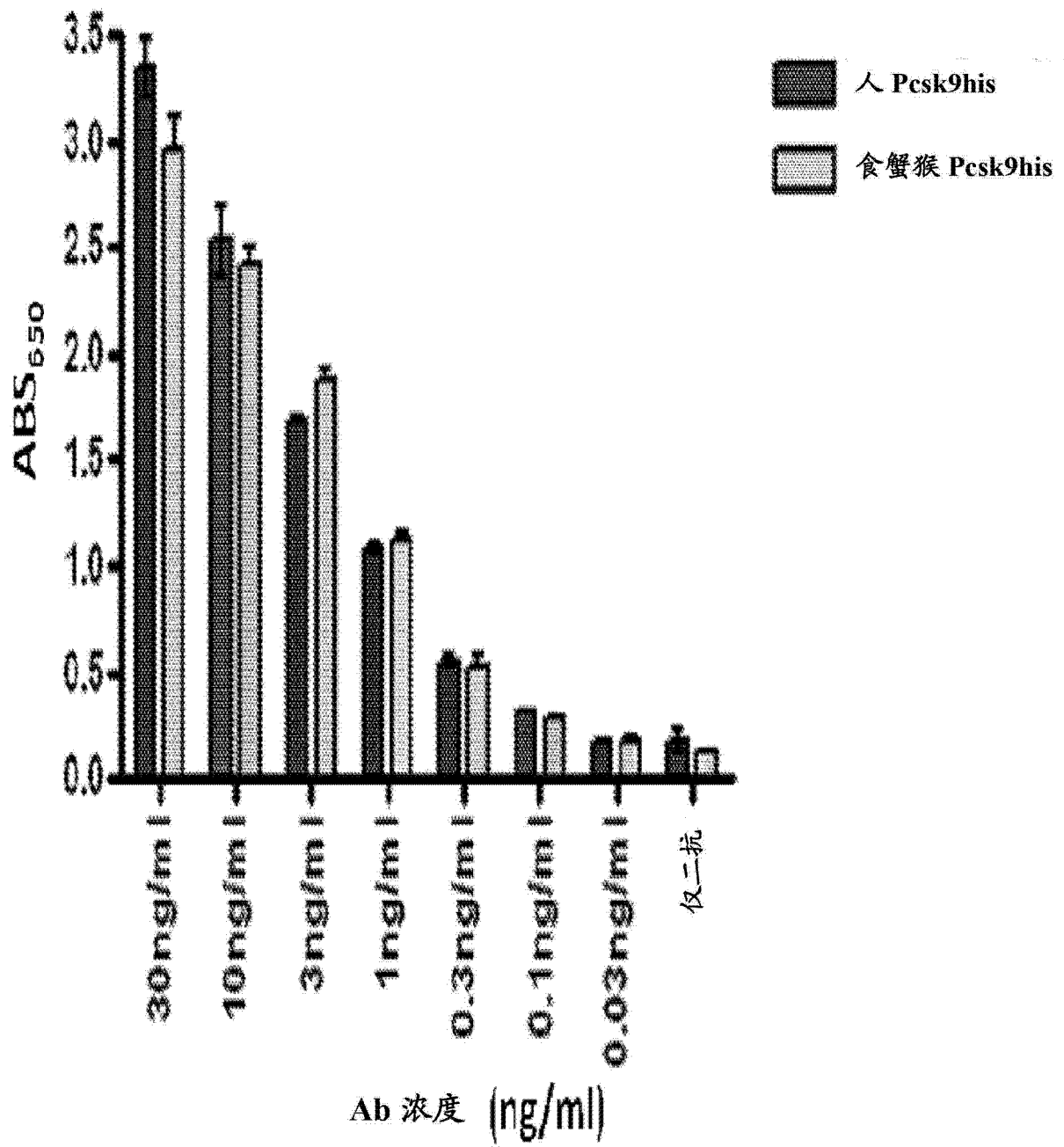


图 6A

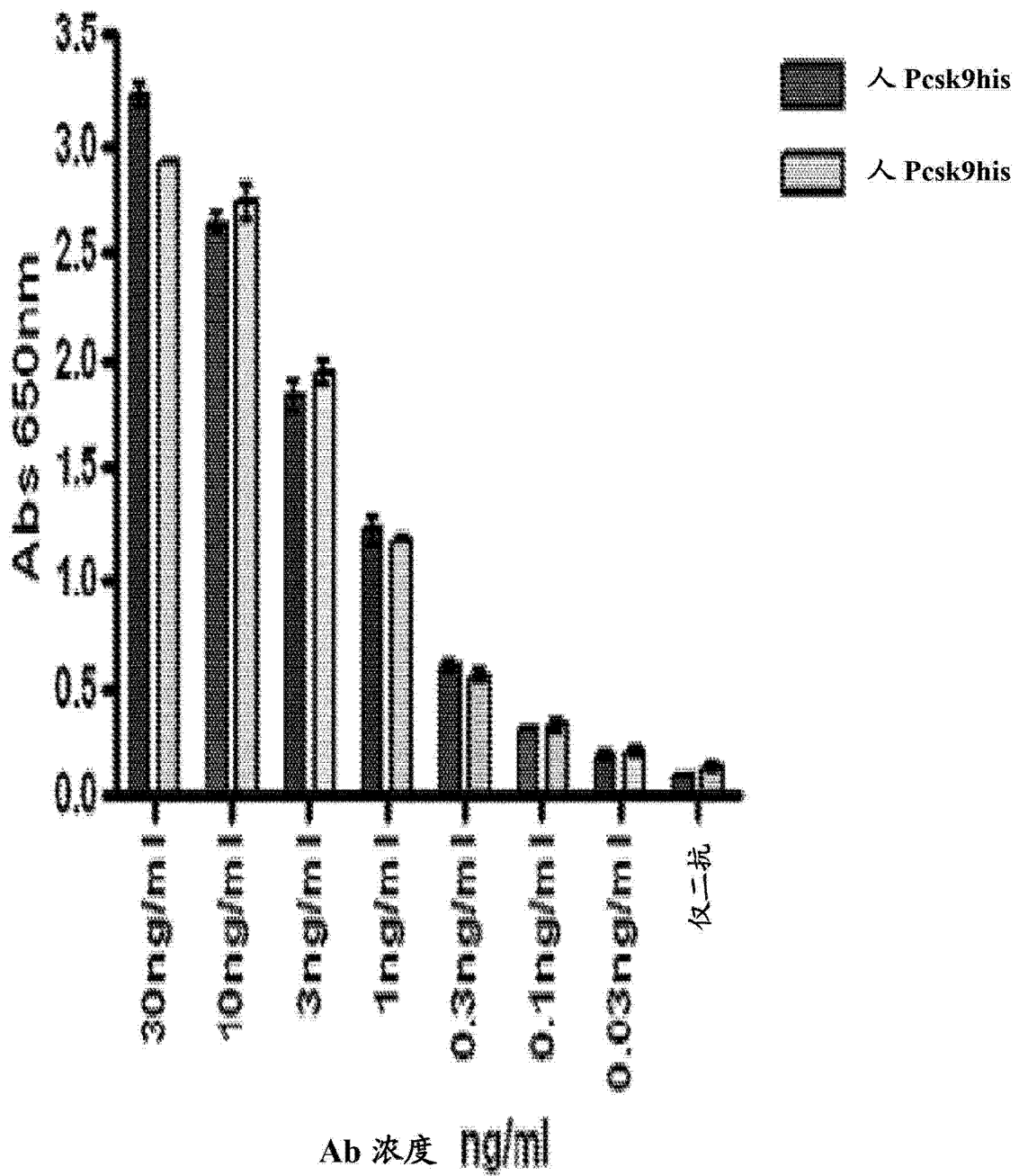


图 6B

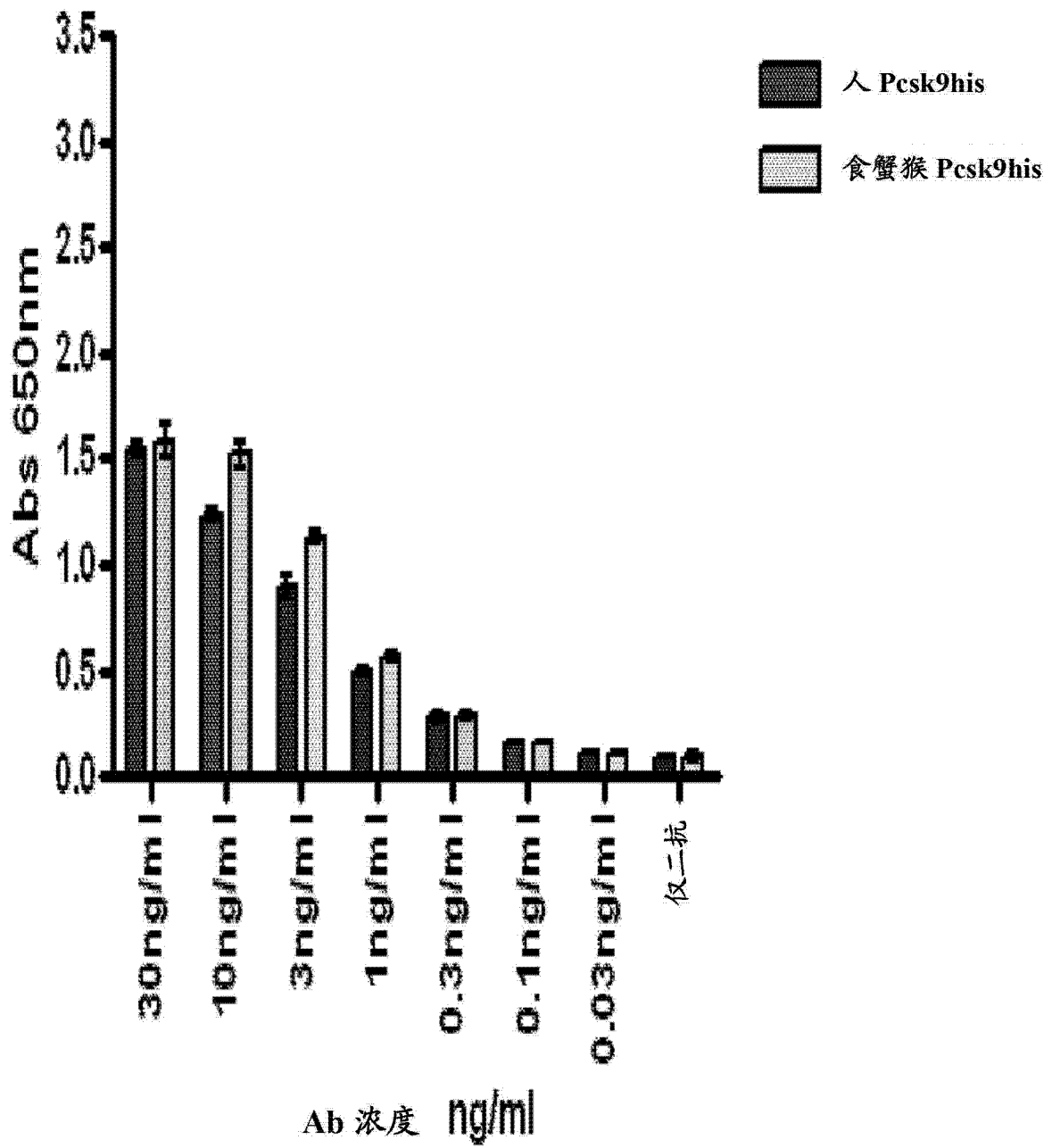


图 6C

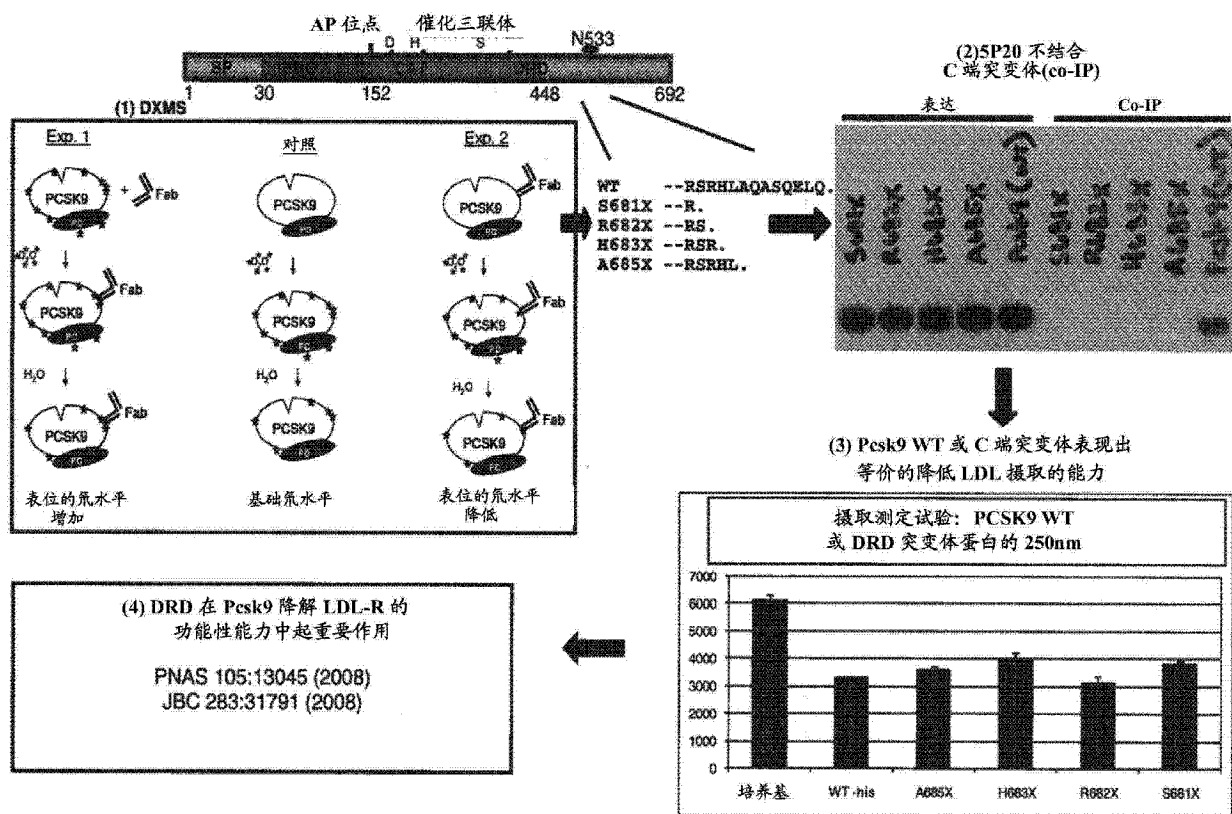


图 7

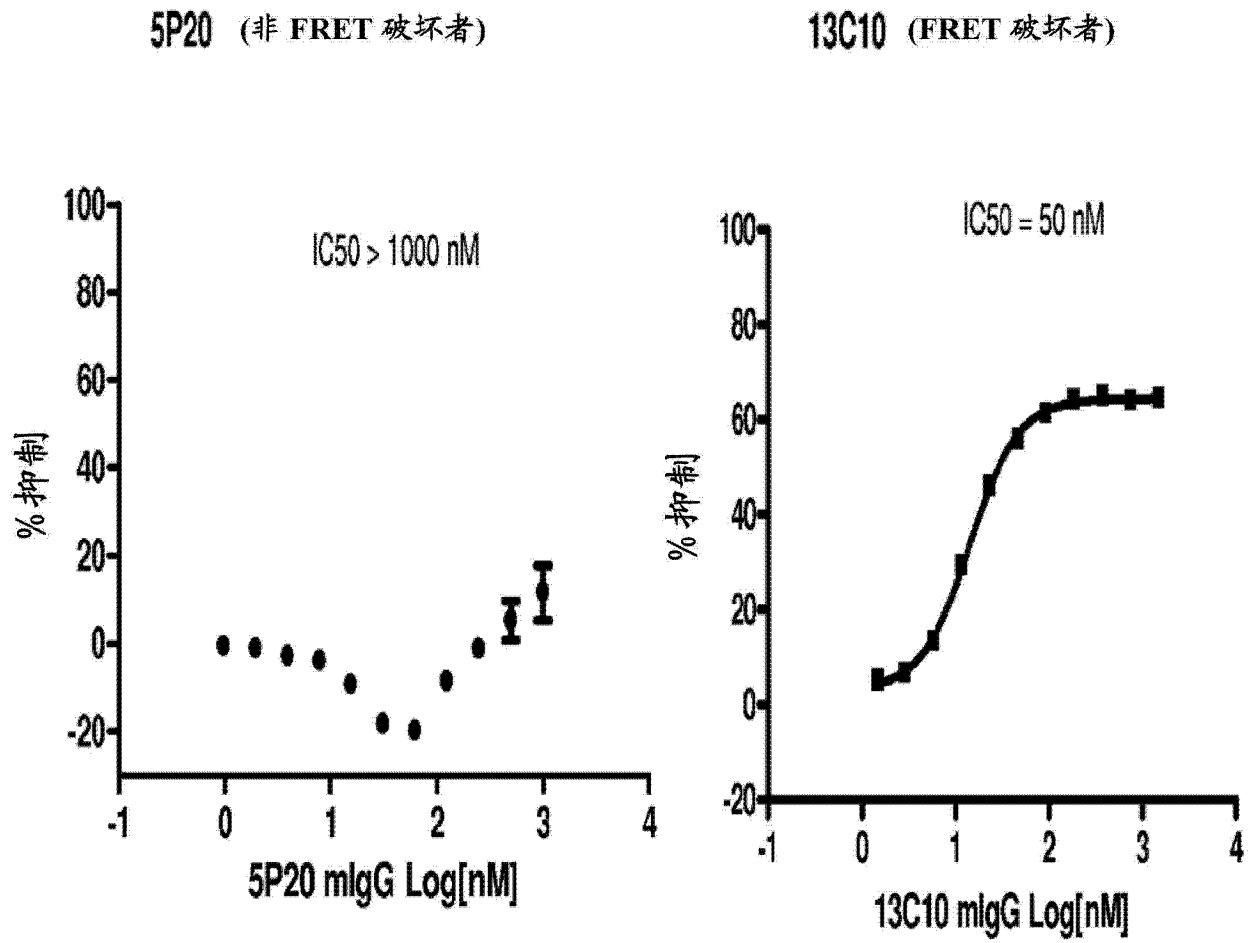


图 8

抗体	LDL-R 升高	LDL- 摄取
LGT209	480 ± 64	255 ± 25
LGT210	480 ± 48	259 ± 22
LGT211	430 ± 60	230 ± 17
NVP-LFU720	520 ± 28	294 ± 62

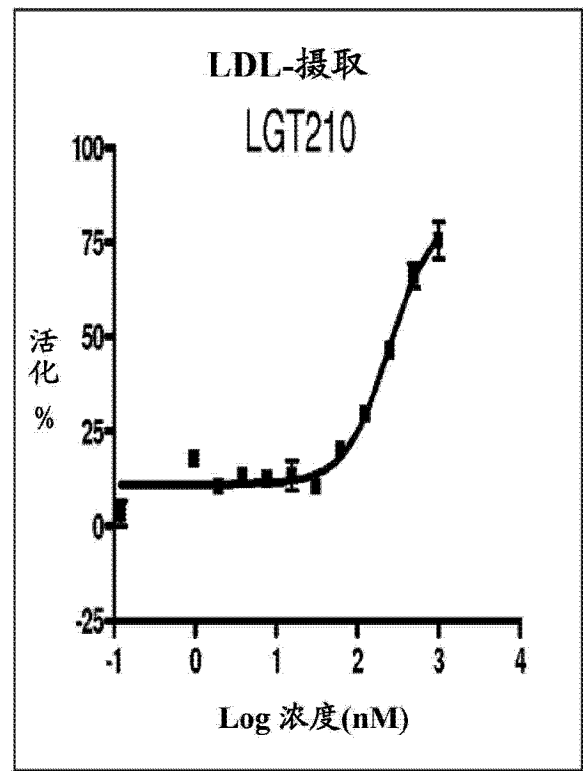
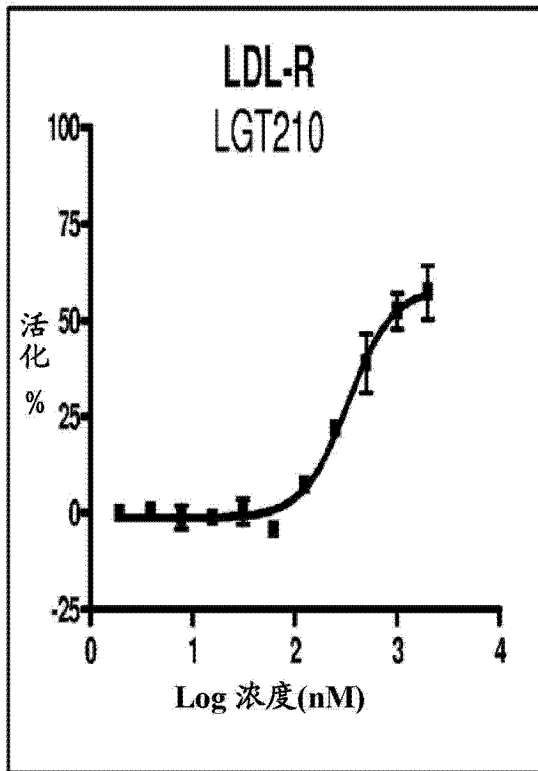
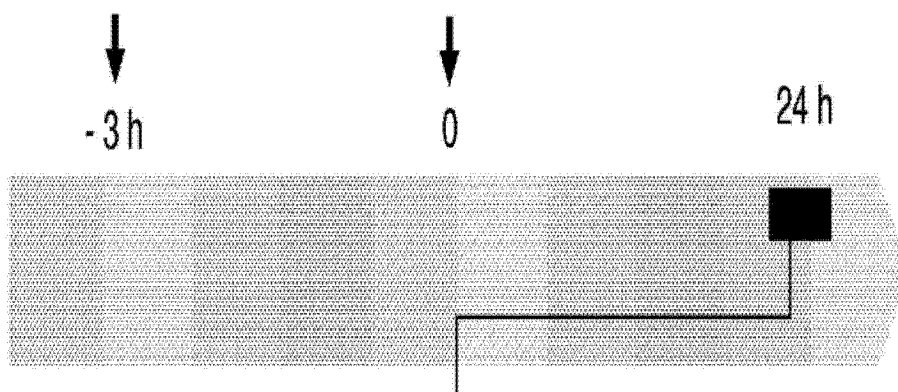


图 9



抗体 (i.p.)      具有 hPcsk9 的植入式微型渗透泵



- 野生型 C57BL/6J 小鼠(9 周龄)
- Alzet: 2001D (8  $\mu$ l/h, 24h 泵, 0.2 ml)
- i.v.输注 - 植入皮下的微型泵带颈静脉导管

- 非 HDL-C (Helena)
- 总胆固醇 (Olympus)
- hPcsk9 (ELISA)
- 抗体 (ELISA)

组别	小鼠数量
PBS (i.p.) + PBS (3 $\mu$ g/h i.v.)	7
PBS (i.p.) + hPcsk9 (3 $\mu$ g/h; i.v.)	7
mIgG (20 mpk i.p.) + hPcsk9 (3 $\mu$ g/h; i.v.)	5
LGT209 (20 mpk i.p.) + hPcsk9 (3 $\mu$ g/h i.v.)	7
LGT210 (20 mpk i.p.) + hPcsk9 (3 $\mu$ g/h i.v.)	5
LGT211 (20 mpk i.p.) + hPcsk9 (3 $\mu$ g/h i.v.)	7

图 10

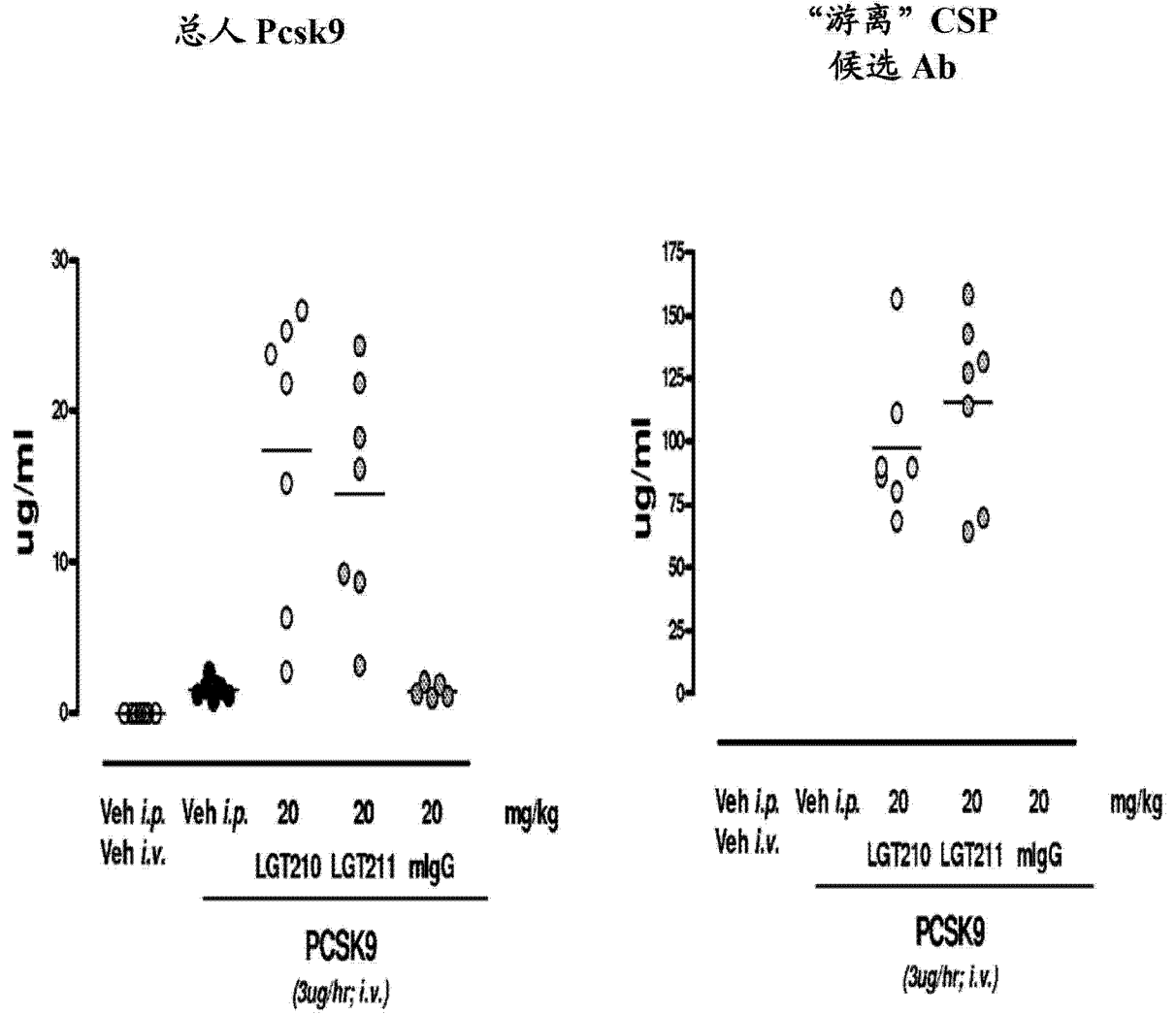


图 11

### 肝脏膜制品的 LDL-R Western 印迹

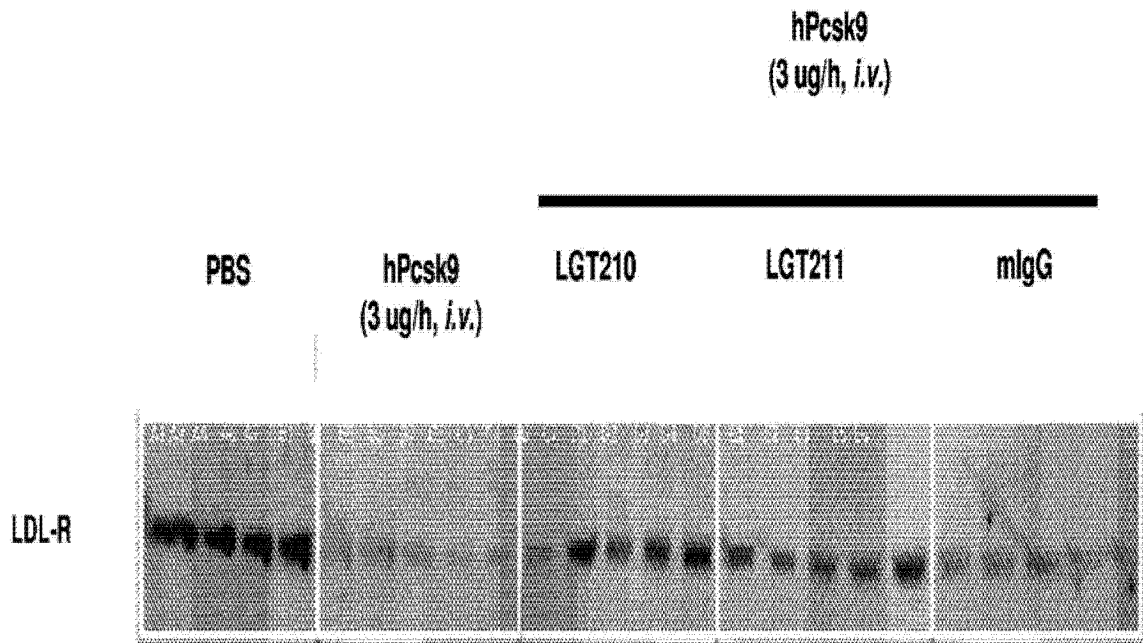
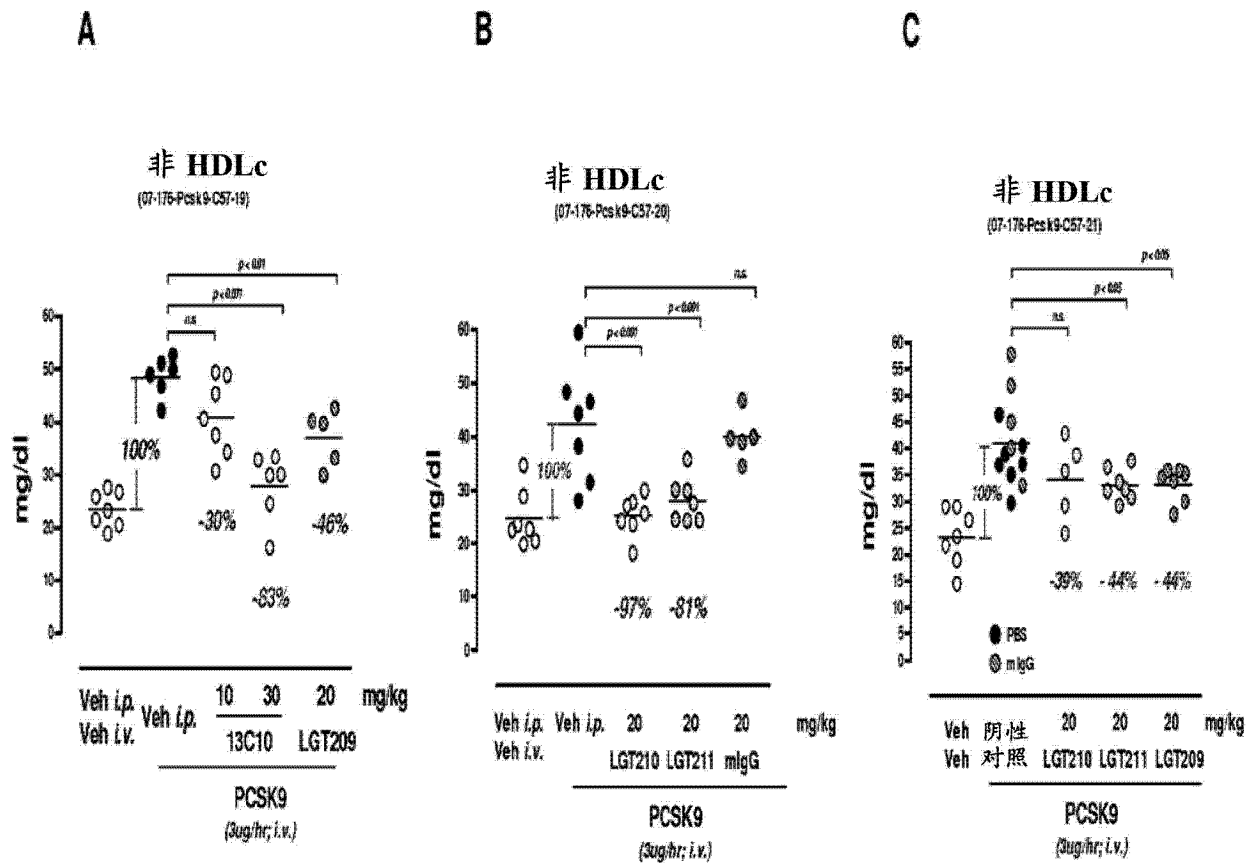


图 12



抗体	非 HDL-C A	非 HDL-C B	非 HDL-C C
LGT209	-46% ( $p < 0.01$ )	-	-44% ( $p < 0.05$ )
LGT210	-	-97% ( $p < 0.001$ )	-39% (n.s.)
LGT211	-	-81% ( $p < 0.001$ )	-44% ( $p < 0.05$ )

图 13

“典型”IgG mAb 在大鼠中的 PK 曲线  
非 TMD(实线) - 用实验数据覆盖

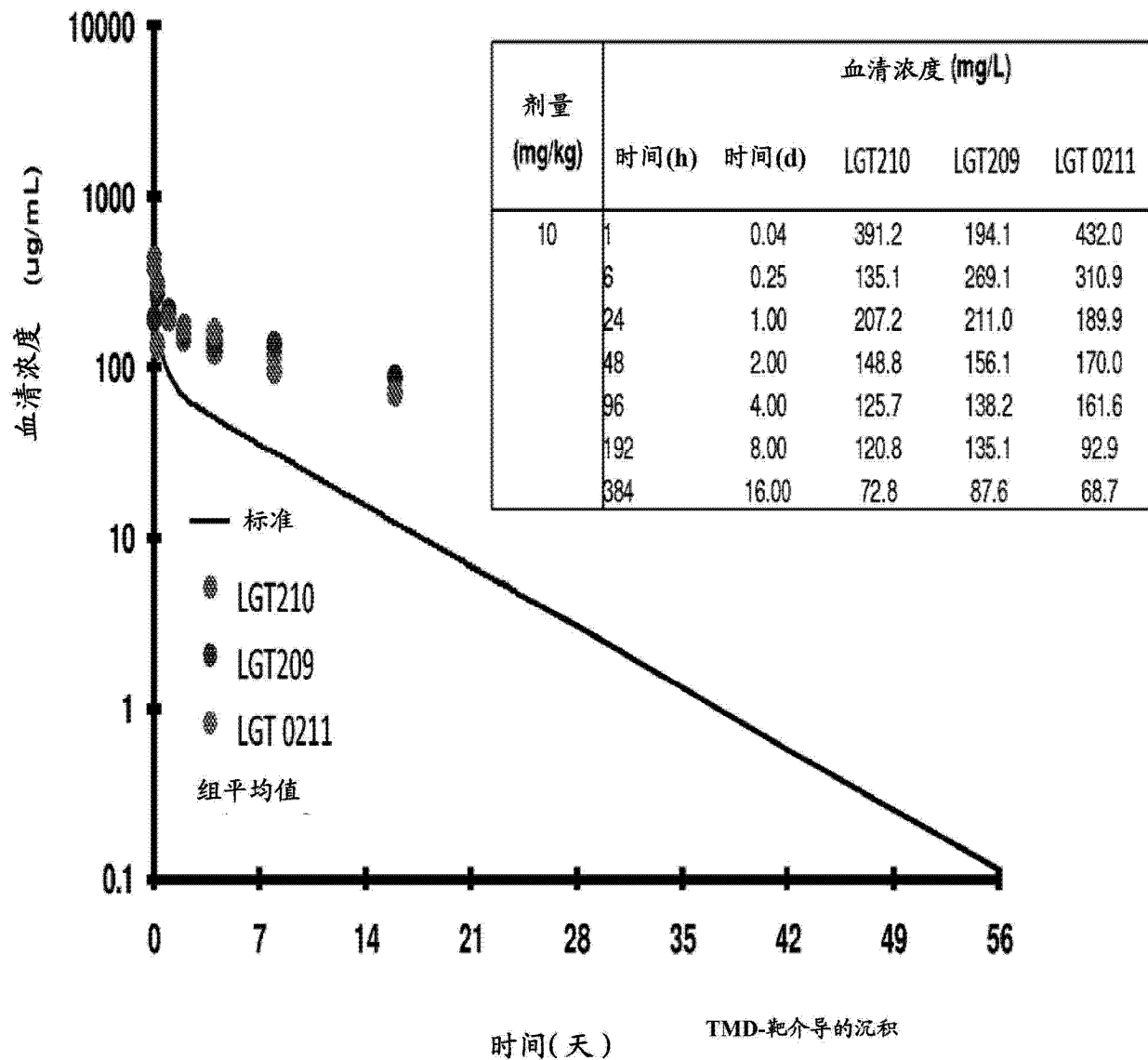


图 14