

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7032662号

(P7032662)

(45)発行日 令和4年3月9日(2022.3.9)

(24)登録日 令和4年3月1日(2022.3.1)

(51)国際特許分類

F I

C 0 7 K 16/40 (2006.01)

C 0 7 K 16/40

Z N A

C 0 7 K 19/00 (2006.01)

C 0 7 K 19/00

C 0 7 K 16/46 (2006.01)

C 0 7 K 16/46

C 1 2 N 15/13 (2006.01)

C 1 2 N 15/13

C 1 2 N 15/62 (2006.01)

C 1 2 N 15/62

Z

請求項の数 33 (全38頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2018-533863(P2018-533863)

(86)(22)出願日 平成28年12月20日(2016.12.20)

(65)公表番号 特表2019-509254(P2019-509254
A)

(43)公表日 平成31年4月4日(2019.4.4)

(86)国際出願番号 PCT/CN2016/111053

(87)国際公開番号 WO2017/114230

(87)国際公開日 平成29年7月6日(2017.7.6)

審査請求日 令和1年12月19日(2019.12.19)

(31)優先権主張番号 201511024618.2

(32)優先日 平成27年12月31日(2015.12.31)

(33)優先権主張国・地域又は機関
中国(CN)

(73)特許権者 510166892

ジェンス ヘンルイ メディシンカンパニ
ー リミテッドJ I A N G S U H E N G R U I M E D
I C I N E C O . , L T D .中華人民共和国 ジェンス 2 2 2 0 0 2
リエンユンガン エコノミック・アンド
・テクノロジカル・ディベロップメント
・ゾーン クンルンシャン ロード ナン
パー7

(73)特許権者 508209602

シャンハイ ヘンルイ ファーマスーティ
カル カンパニー リミテッドS H A N G H A I H E N G R U I P H
A R M A C E U T I C A L C O . , L

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 P C S K 9 抗体、その抗原結合フラグメント及び医薬用途

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

それぞれ配列番号：12、配列番号：13及び配列番号：14で示されるHCDR1、HCDR2及びHCDR3を含み；及びそれぞれ配列番号：15、配列番号：16及び配列番号：17で示されるLCDR1、LCDR2及びLCDR3を含む、PCSK9抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項2】

前記PCSK9抗体またはその抗原結合フラグメントがマウス抗体またはそのフラグメントである、請求項1に記載のPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項3】

PCSK9抗体軽鎖可変領域が、更にマウス 鎖に由来する軽鎖FR領域、またはマウス 鎖に由来する軽鎖FR領域を含み；PCSK9抗体重鎖可変領域が、更にマウスIgG1に由来する重鎖FR領域、マウスIgG2に由来する重鎖FR領域、またはマウスIgG3に由来する重鎖FR領域を含む、請求項2に記載のPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項4】

配列番号：10の重鎖可変領域及び配列番号：11の軽鎖可変領域を含む、請求項3に記載のPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項5】

PCSK9抗体軽鎖が、更にマウス 鎖に由来する軽鎖定常領域、またはマウス 鎖に由来する軽鎖定常領域を含み；PCSK9抗体重鎖が、更にマウスIgG1に由来する重鎖定常領域、マウスIgG2に由来する重鎖定常領域、またはマウスIgG3に由来する重鎖定常領域を含む

、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載のPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 6】

PCSK9抗体またはその抗原結合フラグメントがキメラ抗体またはそのフラグメントである、請求項 1 に記載のPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 7】

PCSK9抗体またはその抗原結合フラグメントがヒト化抗体またはそのフラグメントである、請求項 1 に記載のPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 8】

ヒト化抗体の重鎖可変領域の重鎖FR配列が、ヒト生殖系列重鎖IGHV1-2*02及びhjh2の組合せ配列に由来し；該ヒト化抗体が、ヒト生殖系列重鎖IGHV1-2*02のFR1、FR2、FR3及びhjh2を含む、請求項 7 に記載のPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメント。

10

【請求項 9】

ヒト化抗体が、配列番号：18の重鎖可変領域；または配列番号：18の変異体で示される重鎖可変領域を含み；該配列番号：18の変異体が、配列番号：18で示される重鎖可変領域に1~10個のアミノ酸変化を有する配列である、請求項 8 に記載のPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 10】

配列番号：18の変異体が、配列番号：18で示される重鎖可変領域のFR領域に1~10個のアミノ酸逆突然変異を有する、請求項 9 に記載のPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメント。

20

【請求項 11】

逆突然変異が、T30N、R87T、R72A、T74K、M48I、V68A、M70L、R38K及びR67Kから成る群より選択される、請求項 10 に記載のPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 12】

ヒト化抗体が、配列番号：19、配列番号：20、配列番号：21、配列番号：22及び配列番号：23から成る群より選択される重鎖可変領域を含む、請求項 8 に記載のPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 13】

ヒト化抗体の軽鎖可変領域の軽鎖FR配列が、ヒト生殖系列軽鎖IGKV1-39*01及びhjk2.1の組合せ配列に由来し；該ヒト化抗体が、ヒト生殖系列IGKV1-39*01のFR1、FR2、FR3及びhjk2.1のFR4を含む、請求項 7 に記載のPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメント。

30

【請求項 14】

ヒト化抗体が、更に配列番号：24で示される軽鎖可変領域または配列番号：24の変異体で示される軽鎖可変領域を含み；該配列番号：24の変異体が、配列番号：24で示される軽鎖可変領域に1~10個のアミノ酸変化を有する、請求項 13 に記載のPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 15】

配列番号：24の変異体が、配列番号：24で示される軽鎖可変領域のFR領域に1~10個のアミノ酸逆突然変異を有する、請求項 14 に記載のPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメント。

40

【請求項 16】

逆突然変異が、T5S、S66D、Q3V及びA49Sから成る群より選択される、請求項 15 に記載のPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 17】

ヒト化抗体が、配列番号：25、配列番号：26及び配列番号：27から成る群より選択される軽鎖可変領域を含む、請求項 13 に記載のPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 18】

50

ヒト化抗体は、1つの重鎖可変領域及び/または1つの軽鎖可変領域を含み、該重鎖可変領域が、配列番号：19、配列番号：20、配列番号：21、配列番号：22及び配列番号：23から成る群より選択され、または該重鎖可変領域が、配列番号：19、配列番号：20、配列番号：21、配列番号：22及び配列番号：23に対して少なくとも95%の配列同一性を有する配列から成る群より選択され；該軽鎖可変領域が、配列番号：25、配列番号：26及び配列番号：27から成る群より選択され、または該軽鎖可変領域が、配列番号：25、配列番号：26及び配列番号：27に対して少なくとも95%の配列同一性を有する配列から成る群より選択される、請求項7に記載のPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項19】

PCSK9抗体が、

- 1) 配列番号：18の重鎖可変領域配列及び配列番号：25の軽鎖可変領域配列、
 - 2) 配列番号：18の重鎖可変領域配列及び配列番号：26の軽鎖可変領域配列、
 - 3) 配列番号：18の重鎖可変領域配列及び配列番号：27の軽鎖可変領域配列、
 - 4) 配列番号：19の重鎖可変領域配列及び配列番号：24の軽鎖可変領域配列、
 - 5) 配列番号：19の重鎖可変領域配列及び配列番号：25の軽鎖可変領域配列、
 - 6) 配列番号：19の重鎖可変領域配列及び配列番号：26の軽鎖可変領域配列、
 - 7) 配列番号：19の重鎖可変領域配列及び配列番号：27の軽鎖可変領域配列、
 - 8) 配列番号：20の重鎖可変領域配列及び配列番号：24の軽鎖可変領域配列、
 - 9) 配列番号：20の重鎖可変領域配列及び配列番号：25の軽鎖可変領域配列、
 - 10) 配列番号：20の重鎖可変領域配列及び配列番号：26の軽鎖可変領域配列、
 - 11) 配列番号：20の重鎖可変領域配列及び配列番号：27の軽鎖可変領域配列、
 - 12) 配列番号：21の重鎖可変領域配列及び配列番号：24の軽鎖可変領域配列、
 - 13) 配列番号：21の重鎖可変領域配列及び配列番号：25の軽鎖可変領域配列、
 - 14) 配列番号：21の重鎖可変領域配列及び配列番号：26の軽鎖可変領域配列、
 - 15) 配列番号：21の重鎖可変領域配列及び配列番号：27の軽鎖可変領域配列、
 - 16) 配列番号：22の重鎖可変領域配列及び配列番号：24の軽鎖可変領域配列、
 - 17) 配列番号：22の重鎖可変領域配列及び配列番号：25の軽鎖可変領域配列、
 - 18) 配列番号：22の重鎖可変領域配列及び配列番号：26の軽鎖可変領域配列、
 - 19) 配列番号：22の重鎖可変領域配列及び配列番号：27の軽鎖可変領域配列、
 - 20) 配列番号：23の重鎖可変領域配列及び配列番号：24の軽鎖可変領域配列、
 - 21) 配列番号：23の重鎖可変領域配列及び配列番号：25の軽鎖可変領域配列、
 - 22) 配列番号：23の重鎖可変領域配列及び配列番号：26の軽鎖可変領域配列、
 - 23) 配列番号：23の重鎖可変領域配列及び配列番号：27の軽鎖可変領域配列、及び
 - 24) 配列番号：18の重鎖可変領域配列及び配列番号：24の軽鎖可変領域配列。
- から成る群より選択される1つの重鎖可変領域及び1つの軽鎖可変領域を含む、請求項7に記載のPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項20】

PCSK9抗体の重鎖が、更にヒトIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4、またはそれらの配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列に由来する重鎖定常領域を含み；PCSK9抗体が、更にヒト鎖、ヒト鎖、またはそれらの配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列に軽鎖定常領域を含む、請求項6～19のいずれか1項に記載のPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項21】

PCSK9抗体の重鎖が、ヒトIgG1、IgG2またはIgG4に由来する重鎖定常領域を含むか、またはアミノ酸変異を介して血清中の抗体の半減期を延長させるヒトIgG1、IgG2またはIgG4変異体の重鎖定常領域を含む、請求項20に記載のPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項22】

PCSK9抗体の重鎖が、YTE突然変異が導入されたIgG1、IgG2またはIgG4の重鎖定常領域を含む、請求項21に記載のPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 2 3】

ヒト化抗体が、

1) 配列番号：28の重鎖及び配列番号：30の軽鎖、及び

2) 配列番号：32の重鎖及び配列番号：30の軽鎖。

から成る群より選択される1つの重鎖及び1つの軽鎖を含む、請求項 2 0 に記載のPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 2 4】

請求項 1 ~ 2 3 のいずれか 1 項に記載の治療的有効量のPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメント及び1つ以上の薬学的に許容される担体、希釈剤または賦形剤を含有する、医薬組成物。

10

【請求項 2 5】

請求項 1 ~ 2 3 のいずれか 1 項に記載のPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメントをコードするDNA分子。

【請求項 2 6】

請求項 2 5 に記載のDNA分子を含む発現ベクター。

【請求項 2 7】

宿主細胞が、原核細胞及び真核細胞から成る群より選択される、請求項 2 6 に記載の発現ベクターで形質転換された宿主細胞。

【請求項 2 8】

宿主細胞が、真核細胞である、請求項 2 7 に記載の発現ベクターで形質転換された宿主細胞。

20

【請求項 2 9】

宿主細胞が、哺乳動物細胞である、請求項 2 7 に記載の発現ベクターで形質転換された宿主細胞。

【請求項 3 0】

請求項 1 ~ 2 3 のいずれか 1 項に記載のPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメント、または請求項 2 4 に記載の医薬組成物の、PCSK9媒介性疾患または障害を治療するための医薬品の調製における使用。

【請求項 3 1】

疾患または障害が、コレステロール関連疾患である、請求項 3 0 に記載の使用。

30

【請求項 3 2】

疾患または障害が、高コレステロール血症、心臓病、メタボリックシンドローム、糖尿病、冠状動脈性心疾患、脳卒中、心血管疾患、アルツハイマー病及び一般的な脂質異常症から成る群より選択される、請求項 3 0 に記載の使用。

【請求項 3 3】

疾患または障害が、高コレステロール血症、脂質異常症、粥状動脈硬化、CVDまたは冠状動脈性心疾患である、請求項 3 0 に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【発明の分野】

【0 0 0 1】

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

40

【発明の背景】

【0 0 0 2】

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

50

とは、粥状動脈硬化症を治療及び予防するための主な手段となる。

【0003】

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

10

【0004】

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

20

【0005】

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

30

【0006】

プロタンパク質転換酵素サブチリシン/ケクシン9型（PCSK9）は、プロタンパク質転換酵素であり、分泌性枯草菌ファミリーに属するプロテアーゼKのサブファミリーである。コードされたタンパク質は、可溶性の酵素前駆体として合成され、自己触媒作用によって小胞体内で分子内処理される。実験結果によると、PCSK9はLDL受容体の分解を促進し、血漿中のLDLコレステロールの量を増加させるが、LDL受容体は肝臓におけるLDLの形質膜陥入の過程を媒介し、後者は循環系からLDLを除去する主経路である。研究者らは、高コレステロール血症（ADH）患者の12.5%においてPCSK9遺伝子変異が同定されていることを発見した。様々なタイプのPCSK9突然変異が存在している。PCSK9によって調節されるLDL-cレベルに対する突然変異の異なる影響によって、突然変異は機能喪失型及び機能獲得型の2つのグループに分けることができる。機能喪失突然変異は、低血中コレステロールレベルと関連し、粥状動脈硬化性心疾患の発症を予防する効果を有する。低コレステロールに関連するPCSK9突然変異の割合は、他の人種よりアフリカ人種において高い。PCSK9機能獲得突然変異はPCSK9機能を増大させ、LDLR発現を低下させることにより血漿コレステロールレベルを上昇させ、重篤な高コレステロール血症及び早期冠動脈と粥状動脈硬化性の心疾患を引き起こす。現在、PCSK9の機能獲得突然変異には、D374Y、S127R、F216L、N157K、R306S等は含まれることが判明されている。PCSK9野生型と比較し、細胞表面上のLDLRはD374Y変異体では36%減少し、S127R変異体では10%減少した。

40

50

【 0 0 0 7 】

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

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 0 8 】

【 文献 】 WO2011111007

10

WO2011072263

WO2013170367

WO2013169886

WO2013148284

WO2013091103

WO2013039958

WO2013039969

WO2013016648

WO2013008185

WO2012170607

20

WO2012168491

WO2012154999

WO2012109530

WO2012101251

WO2012088313

US8829165B2

US8563698B2

US8859741B2

US8871913B2

US8871914B2

30

US8883983B2

WO2012058137

WO2012054438

【 0 0 0 9 】

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

【 発明の概要 】

【 0 0 1 0 】

本発明は、以下から選択される1つ以上のCDRを含むPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメントを提供する：配列番号：12、配列番号：13または配列番号：14で示されるHCDR、または配列番号：12、配列番号：13または配列番号：14に対して少なくとも95%の配列同一性を有する配列で示されるHCDR；及び配列番号：15、配列番号：16または配列番号：17で示されるLCDR、または配列番号：15、配列番号：16または配列番号：17に対して少なくとも95%の配列同一性を有する配列で示されるLCDR。

40

【 0 0 1 1 】

本発明の別の好ましい実施態様では、本発明によるPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメントは、それぞれ配列番号：12、配列番号：13及び配列番号：14で示されるHCDR1、HCDR2及びHCDR3を含み；またはそれぞれ配列番号：12、配列番号：13及び配列番号：14に対して少なくとも95%の配列同一性を有する配列で示されるHCDR1、HCDR2及びHCDR3を含む。

50

【 0 0 1 2 】

本発明の別の好ましい実施態様では、本発明によるPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメントは、それぞれ配列番号：15、配列番号：16及び配列番号：17で示されるLCDR1、LCDR2及びLCDR3を含み、またはそれぞれ配列番号：15、配列番号：16及び配列番号：17に対して少なくとも95%の配列同一性を有する配列で示されるLCDR1、LCDR2及びLCDR3を含む。

【 0 0 1 3 】

親和性成熟化の方法で本発明のCDR領域に突然変異を誘導することにより、少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を得ることができる。

【 0 0 1 4 】

本発明の別の好ましい実施態様では、本発明によるPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメントは、マウス抗体またはそのフラグメントである。

【 0 0 1 5 】

本発明によるPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメントの別の好ましい実施態様では、PCSK9抗体軽鎖可変領域は、更にマウス鎖またはその変異体に由来する軽鎖FR領域、またはマウス鎖またはその変異体に由来する軽鎖FR領域を含み；PCSK9抗体重鎖可変領域は、更にマウスIgG1またはその変異体に由来する重鎖FR領域、またはマウスIgG2またはその変異体に由来する重鎖FR領域、またはマウスIgG3またはその変異体に由来する重鎖FR領域を含む。

【 0 0 1 6 】

本発明によるPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメントの別の好ましい実施態様では、マウス抗体は、配列番号：10の重鎖可変配列及び配列番号：11の軽鎖可変配列を含む。

【 0 0 1 7 】

本発明によるPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメントの別の好ましい実施態様では、PCSK9抗体軽鎖は、更にマウス鎖またはその変異体に由来する軽鎖定常領域、またはマウス鎖またはその変異体に由来する軽鎖定常領域を含み；PCSK9抗体重鎖は、更にマウスIgG1またはその変異体に由来する重鎖定常領域、またはマウスIgG2またはその変異体に由来する重鎖定常領域、またはマウスIgG3またはその変異体に由来する重鎖定常領域を含む。

【 0 0 1 8 】

本発明によるPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメントの別の好ましい実施態様では、抗体またはその抗原結合フラグメントは、キメラ抗体またはそのフラグメントである。

【 0 0 1 9 】

本発明によるPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメントの別の好ましい実施態様では、抗体またはその抗原結合フラグメントは、ヒト化抗体またはそのフラグメントである。

【 0 0 2 0 】

本発明によるPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメントの別の好ましい実施態様では、ヒト化抗体の重鎖可変領域の重鎖FR配列は、ヒト生殖系列重鎖IGHV1-2*02及びhjh2の組合せ配列及びそれらの変異体配列に由来し、好ましくは、ヒト生殖系列重鎖IGHV1-2*02のFR1、FR2、FR3及びhjh2のFR4、及びそれらの変異体配列、またはそれらの配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【 0 0 2 1 】

本発明によるPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメントの別の好ましい実施態様では、ヒト化抗体は、配列番号：18で示される重鎖可変領域または配列番号：18の変異体で示される重鎖可変領域を含む。ここで、配列番号：18の変異体が、配列番号：18で示される重鎖可変領域に0～10個のアミノ酸変化を有する配列である。該アミノ酸変化は、親和性または半減期を改善するための当技術分野の技術（例えば、親和性成熟化によるCDRのアミノ酸の修飾、または逆突然変異によるFRのアミノ酸の修飾）に基づいて行うことができる。

【 0 0 2 2 】

10

20

30

40

50

本発明によるPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメントの別の好ましい実施態様では、ヒト化抗体の重鎖FR配列は、0～10個のアミノ酸逆突然変異、好ましくは、T30N、R87T、R72A、T74K、M48I、V68A、M70L、R38K及びR67Kから成る群より選択される1つ以上の逆突然変異を有する。

【0023】

本発明によるPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメントの別の好ましい実施態様では、ヒト化抗体は、配列番号：19、配列番号：20、配列番号：21、配列番号：22及び配列番号：23から成る群より選択される重鎖可変領域を含む。

【0024】

本発明によるPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメントの別の好ましい実施態様では、ヒト化抗体の軽鎖可変領域の軽鎖FR配列は、ヒト生殖系軽鎖IGKV1-39*01及びhjk2.1の組合せ配列、及びそれらの変異体配列に由来し、IGKV1-39*01のFR1、FR2、FR3、及びhjk2.1のFR4、及びそれらの変異体配列、またはそれらの配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

10

【0025】

本発明によるPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメントの別の好ましい実施態様では、ヒト化抗体は、更に配列番号：24で示される軽鎖可変領域または配列番号：24の変異体で示される軽鎖可変領域を含む；該配列番号：24の変異体は、配列番号：24で示される軽鎖可変領域に1～10個のアミノ酸変化を有する。該アミノ酸変化は、親和性または半減期を改善するための当技術分野の技術（例えば、親和性成熟化によるCDRのアミノ酸の修飾、または逆突然変異によるFRのアミノ酸の修飾）に基づいて行うことができる。

20

【0026】

本発明によるPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメントの別の好ましい実施態様では、配列番号：24の変異体は、配列番号：24で示される軽鎖可変領域のFR配列に0～10個のアミノ酸逆突然変異を有する。好ましくは、該逆突然変異がT5S、S66D、Q3V及びA49Sから成る群より選択され；好ましくはA43Sである。

【0027】

本発明によるPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメントの別の好ましい実施態様では、ヒト化抗体は、配列番号：25、配列番号：26及び配列番号：27から成る群より選択される軽鎖可変領域を含む。

30

【0028】

本発明によるPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメントの別の好ましい実施態様では、ヒト化抗体は、1つの重鎖可変領域及び/または1つの軽鎖可変領域を含み、該重鎖可変領域が、配列番号：19、配列番号：20、配列番号：21、配列番号：22及び配列番号：23から成る群より選択され、または該重鎖可変領域が、配列番号：19、配列番号：20、配列番号：21、配列番号：22及び配列番号：23に対して少なくとも95%の配列同一性を有する配列から成る群より選択される；該軽鎖可変領域が、配列番号：25、配列番号：26及び配列番号：27から成る群より選択される、または該軽鎖可変領域が、配列番号：25、配列番号：26及び配列番号：27に対して少なくとも95%の配列同一性を有する配列から成る群より選択される。

40

【0029】

本発明によるPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメントの別の好ましい実施態様では、PCSK9抗体は、

- 1) 配列番号：18の重鎖可変領域及び配列番号：25の軽鎖可変領域；
- 2) 配列番号：18の重鎖可変領域及び配列番号：26の軽鎖可変領域；
- 3) 配列番号：18の重鎖可変領域及び配列番号：27の軽鎖可変領域；
- 4) 配列番号：19の重鎖可変領域及び配列番号：24の軽鎖可変領域；
- 5) 配列番号：19の重鎖可変領域及び配列番号：25の軽鎖可変領域；
- 6) 配列番号：19の重鎖可変領域及び配列番号：26の軽鎖可変領域；
- 7) 配列番号：19の重鎖可変領域及び配列番号：27の軽鎖可変領域；

50

- 8) 配列番号：20の重鎖可変領域及び配列番号：24の軽鎖可変領域；
 9) 配列番号：20の重鎖可変領域及び配列番号：25の軽鎖可変領域；
 10) 配列番号：20の重鎖可変領域及び配列番号：26の軽鎖可変領域；
 11) 配列番号：20の重鎖可変領域及び配列番号：27の軽鎖可変領域；
 12) 配列番号：21の重鎖可変領域及び配列番号：24の軽鎖可変領域；
 13) 配列番号：21の重鎖可変領域及び配列番号：25の軽鎖可変領域；
 14) 配列番号：21の重鎖可変領域及び配列番号：26の軽鎖可変領域；
 15) 配列番号：21の重鎖可変領域及び配列番号：27の軽鎖可変領域；
 16) 配列番号：22の重鎖可変領域及び配列番号：24の軽鎖可変領域；
 17) 配列番号：22の重鎖可変領域及び配列番号：25の軽鎖可変領域；
 18) 配列番号：22の重鎖可変領域及び配列番号：26の軽鎖可変領域；
 19) 配列番号：22の重鎖可変領域及び配列番号：27の軽鎖可変領域；
 20) 配列番号：23の重鎖可変領域及び配列番号：24の軽鎖可変領域；
 21) 配列番号：23の重鎖可変領域及び配列番号：25の軽鎖可変領域；
 22) 配列番号：23の重鎖可変領域及び配列番号：26の軽鎖可変領域；
 23) 配列番号：23の重鎖可変領域及び配列番号：27の軽鎖可変領域；及び
 24) 配列番号：18の重鎖可変領域及び配列番号：24の軽鎖可変領域。

から成る群より選択される1つの重鎖可変領域及び1つの軽鎖可変領域を含む。

【0030】

本発明によるPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメントの別の好ましい実施態様では、PCSK9抗体の重鎖は、更にヒトIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4またはそれらの変異体、またはそれらの配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列に由来する重鎖定常領域を含み、好ましくはヒトIgG1、IgG2またはIgG4に由来する重鎖定常領域を含むか、またはアミノ酸変異を介して血清中の抗体の半減期を延長させるIgG1、IgG2またはIgG4変異体の重鎖定常領域を含み、最も好ましくはYTE突然変異が導入されたIgG1、IgG2またはIgG4の重鎖定常領域を含む；

PCSK9抗体の軽鎖は、更にヒト鎖、ヒト鎖またはそれらの変異体、またはそれらの配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列に由来する定常領域を含む。

【0031】

本発明によるPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメントの別の好ましい実施態様では、ヒト化抗体は、

- 1) 配列番号：28の重鎖及び配列番号：30の軽鎖；及び
 2) 配列番号：32の重鎖及び配列番号：30の軽鎖。

から成る群より選択される1つの重鎖及び1つの軽鎖を含む。

【0032】

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

【0033】

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

【0034】

更に本発明は、上記のDNA分子を含む発現ベクターを提供する。

【0035】

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

【0036】

更に本発明は、PCSK9抗体またはその抗原結合フラグメント、または本発明による医薬組

10

20

30

40

50

成物の、PCSK9媒介性疾患または障害を治療するための医薬品の調製における使用を提供する。該疾患または障害が、好ましくは、コレステロール関連疾患（「血清コレステロール関連疾患」を含む）であり；より好ましくは、高コレステロール血症、心臓病、メタボリックシンドローム、糖尿病、冠状動脈性心疾患、脳卒中、心血管疾患、アルツハイマー病及び一般的な脂質異常症から成る群より選択され；最も好ましくは、高コレステロール血症、脂質異常症、粥状動脈硬化、CVDまたは冠状動脈性心疾患である。

【0037】

本発明による抗体で診断され得る典型的な疾患には、コレステロール関連疾患（「血清コレステロール関連疾患」を含む）が含まれる。これには高コレステロール血症、心臓病、メタボリックシンドローム、糖尿病、冠状動脈性心疾患、脳卒中、心血管疾患、アルツハイマー病及び一般的な脂質異常症から選択される1つ以上のもの（これらの特徴は、総血清コレステロールの増加、LDLの増加、トリグリセリドの増加、超低密度リポタンパク質（VLDL）の増加及び/またはHDLの低下である。）が含まれる。

10

【0038】

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

20

【図面の簡単な説明】

【0039】

【図1】本発明による抗体のベクターを構築するためのプライマー設計の概略図である。

【図2】本発明による抗体のベクターを構築するための概略図である。

【図3】異なる濃度のh001-4-YTE PCSK9抗体でのHepG2細胞によるLDL取込みの変化。本結果では、PCSK9抗体がHepG2細胞によるLDL取込みを促進できることが示されている。

【図4】異なる濃度のh001-4-WT PCSK9抗体でのHepG2細胞によるLDL取込みの変化。本結果では、PCSK9抗体がHepG2細胞によるLDL取込みを促進できることが示されている。

30

【図5】マウスへのh001-4-WT PCSK9抗体（* : p 0.05, vs IgG, ** : p 0.01, vs IgG）注射による血清中LDL-c濃度の経時的変化。本結果では、PCSK9抗体が、ヒトPCSK9過剰発現マウスにおけるLDL-cの血清中濃度を低下させることが示されている。

【図6】マウスへのh001-4-WT PCSK9抗体注射による血清中LDL-c濃度のIgG群と相対的な変化。本結果では、PCSK9抗体が、IgG群と比べ、ヒトPCSK9過剰発現マウスにおけるLDL-cの血清中濃度を減少させることができることが示されている。

【図7】本発明による抗体のカニクイザルマカクにおけるin vivoでの薬力学的及び薬物動態学的試験。図では、h001-4-WT及びh001-4-YTEの両者ともカニクイザルマカクにおけるLDLの量を著しく減少させることができ、h001-4-YTEによる減少の持続時間はh001-4-WTによるものより優れていることが示されている。発明の詳細な説明

40

【0040】

[用語]

本発明をより理解しやすくするため、専門用語及び科学用語を以下に具体的に定義する。本明細書の他の場所で具体的に定義されている場合を除き、ここで使用される他の全ての専門用語及び科学用語は、当業者により一般に理解される意味をもつ。

【0041】

ここで用いられるアミノ酸の1文字記号及び3文字記号は、J. Biol. Chem, 243, (1968), p3558で記述されているものと同様である。

【0042】

50

ここで用いられる「抗体」とは、免疫グロブリンをいう。即ち、2つの同一の重鎖と2つの同一の軽鎖との間にジスルフィド結合により一緒に連結された4つのペプチド鎖構造である。異なる免疫グロブリン重鎖定常領域は、異なるアミノ酸組成及び順位を示し、従ってそれらは異なる種類の抗原性を有する。そのため、免疫グロブリンは、IgM、IgD、IgG、IgA及びIgEと呼ばれる5つのカテゴリー、または免疫グロブリンアイソタイプに分けることができ、対応する重鎖はそれぞれ μ 鎖、 δ 鎖、 γ 鎖、 ϵ 鎖及び α 鎖である。ヒンジ領域のアミノ酸組成及び重鎖ジスルフィド結合の数及び位置によって、同種のIgは異なるサブタイプに分けることができ、例えば、IgGはIgG1、IgG2、IgG3及びIgG4に分けることができる。軽鎖は、異なる定常領域によって鎖または鎖に分けることができる。5種のIgGは、いずれも鎖または鎖を有することができる。

10

【0043】

本発明で言及される抗体軽鎖可変領域は、更にヒトまたはマウス鎖、鎖またはそれらの変異体を含有する軽鎖定常領域を含む。

【0044】

本発明で言及される抗体重鎖可変領域は、更にヒトまたはマウスIgG1、2、3、4またはそれらの変異体を含有する重鎖定常領域を含む。

【0045】

抗体重鎖及び軽鎖のN末端付近では、約110個のアミノ酸が大きく変化する(可変領域(Fv領域)として知られている)が、残りのC末端付近のアミノ酸は比較的安定である(定常領域(C領域)として知られている)。可変領域は、3つの超可変領域(HVR)及び4つの比較的保護されたフレームワーク領域(FR)を含む。該3つの超可変領域は抗体の特異性を決定する(相補性決定領域(CDR)としても知られている)。各軽鎖可変領域(LCVR)及び各重鎖可変領域(HCVR)は3つのCDR領域及び4つのFR領域から成り、そのアミノ末端からカルボキシル末端までの配列順位はFR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3及びFR4である。3つの軽鎖CDRとは、LCDR1、LCDR2及びLCDR3をいい; 3つの重鎖CDRとは、HCDR1、HCDR2及びHCDR3をいう。ここでの抗体または抗原結合フラグメントのLCVR及びHCVR領域におけるCDR領域アミノ酸残基の数及び位置は、既知のKabat付番基準(LCDR1-3、HCDE2-3)に従うか、またはKabat及びChothia付番基準(HCDR1)に従う。

20

【0046】

本発明の抗体は、マウス抗体、キメラ抗体及びヒト化抗体を含み、好ましくはヒト化抗体である。

30

【0047】

本発明における用語「マウス抗体」とは、当該分野の知識及び技術に従って調製された抗ヒトPCSK9モノクローナル抗体をいう。調製の過程において、試験対象にPCSK9抗原を注射した後、所望の配列または機能的特徴を有するハイブリドーマ発現抗体を分離した。本発明の好ましい実施態様では、マウスPCSK9抗体またはその抗原結合フラグメントは、更にマウス鎖、鎖またはそれらの変異体の軽鎖定常領域を含み、または更にマウスIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4、またはそれらの変異体の重鎖定常領域を含む。

【0048】

用語「キメラ抗体」はマウス抗体の可変領域をヒト抗体の定常領域と融合することによって形成される抗体である。キメラ抗体はマウス抗体誘発免疫応答を緩和することができる。キメラ抗体を確立するには、まず、特定のマウスモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを確立し、マウスハイブリドーマ細胞から可変領域遺伝子をクローニングした後、ヒト抗体の定常領域遺伝子を所望通りにクローニングし、マウス可変領域遺伝子をヒト定常領域遺伝子と結合し、ヒトベクターに挿入することができるキメラ遺伝子を形成し、最後に、キメラ抗体分子は真核または原核生物の工業系で発現される。本発明の好ましい実施態様では、該PCSK9キメラ抗体の軽鎖は、更にヒト鎖、鎖またはそれらの変異体の軽鎖Fc領域を含む。該PCSK9キメラ抗体の重鎖は、更にヒトIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4、またはそれらの変異体の重鎖Fc領域を含み、好ましくは、ヒトIgG1、IgG2、Ig

40

50

G3またはIgG4の重鎖定常領域を含むか、または好ましく、はアミノ酸変異（例えば、YTE変異）を有するヒトIgG1、IgG2またはIgG4変異体の重鎖定常領域を含み、血清における抗体の半減期を延長する。

【0049】

用語「ヒト化抗体」（CDR移植抗体としても知られている）とは、マウスCDR配列をヒト抗体の可変領域フレームワーク、即ち、異なるタイプのヒト生殖系列抗体フレームワークの配列に移植することによって生成される抗体をいう。ヒト化抗体は、大量のマウスタンパク質成分を有するキメラ抗体によって誘導される強い抗体応答の欠点を克服する。そのようなフレームワーク配列は、生殖系列抗体の遺伝子配列を網羅する公的なDNAデータベースまたは公開された参考文献から得ることができる。例えば、ヒト重鎖及び軽鎖可変領域遺伝子の生殖系列DNA配列は、「VBase」ヒト生殖系列配列データベース（ウェブwww.mrcce.com.ac.uk/vbaseで入手可能）及びKabat, EAら, 1991 免疫学的観点からのタンパク質配列、第5版に発見できる。免疫原性が低下している間の活性低下を回避するために、ヒト抗体の可変領域中のフレームワーク配列は、最小限の逆突然変異に供され、活性を維持する。また、本発明のヒト化抗体は、CDR親和性成熟化がファージディスプレイによって行われるヒト化抗体を含む。本発明の好ましい実施態様では、PCSK9ヒト化抗体のマウスCDR配列は、配列番号：12,13,14,15,16及び17から成る群より選択される。ヒト抗体の可変領域フレームは選択されるように設計されている。ここで、抗体の軽鎖可変領域の軽鎖FR配列は、ヒト生殖系列軽鎖IGKV1-39*01及びhjk2.1の組合せ配列に由来し；抗体の重鎖可変領域の重鎖FR配列は、ヒト生殖系列重鎖IGHV1-2*02及びhjh2の組合せ配列に由来する。免疫原性の低下によって引き起こされる活性低下を回避するために、ここに記載のヒト抗体の可変領域は、最小限の逆突然変異に供せられ、抗体の活性を維持することができる。

【0050】

本発明における「抗原結合フラグメント」とは、抗原結合活性を有するFabフラグメント、Fab'フラグメント、F(ab')₂フラグメント、及びヒトPCSK9に結合するFvフラグメントscFvフラグメントをいう。これは、配列番号：12～配列番号：17から成る群より選択される、本発明に記載の抗体の1つ以上のCDR領域を含む。Fvフラグメントは、定常領域を含まず、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む。これは全ての抗原結合部位を有する最小の抗体フラグメントである。一般に、Fv抗体は、更にVHドメインとVLドメインとの間のポリペプチドリンカーを含み、抗原結合に必要な構造を形成することができる。また、異なるリンカーを用いて2つの抗体の可変領域を連結し、単鎖抗体または単鎖Fv（scFv）と呼ばれるポリペプチド鎖を形成することができる。本発明での用語「PCSK9への結合」は、これがヒトPCSK9と相互作用することができることを意味する。本発明での用語「抗原結合部位」とは、本発明の抗体または抗原結合フラグメントによって認識される、抗原上の不連続な三次元部位をいう。

【0051】

ここでの用語「Fc領域」は、定常領域の少なくとも一部を含む免疫グロブリン重鎖のC末端領域を明確にするために使用される。この用語は、天然配列Fc領域及び変異体Fc領域を含む。1つの実施態様では、ヒトIgG重鎖Fc領域は、Cys226、またはPro230から、重鎖のカルボキシル末端まで伸びる。しかし、Fc領域のC末端リジン（Lys447）は存在しても、または存在しなくてもよい。ここで他に特定されない限り、Fc領域または定常領域におけるアミノ酸残基の付番は、Kabatら、免疫学的観点からのタンパク質配列、第5版、公衆衛生サービス、国立衛生研究所、Bethesda, MD, 1991に記載のEU付番システム（EUインデックスとも呼ばれる）に従う。Fc領域は、抗体のエフェクター機能に必須である。該エフェクター機能には、補体依存性細胞傷害（CDC）を引き起こすこと、貧食及び抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ADCC）を引き起こすこと、及び細胞壁を越えての経細胞質輸送により抗体を移動させることが含まれる。更に、Fc領域は、クラスIgGの抗体の血清半減期を維持するために重要である（Ward及びGhetie, Ther. Immunol. 2 : 77-94(1995)）。研究者らは、IgG抗体の血清半減期が新生児Fc受容体（FcRn）へのFcの結合と関

10

20

30

40

50

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

【0052】

抗体及び抗原結合フラグメントの生産方法及び精製方法は、当該分野で周知されており、例えば、Cold Spring Harborの抗体実験技術ガイド、第5~8及び15章から参照できる。例えば、マウスをヒトPCSK9またはそのフラグメントで免疫化し、次いで当技術分野で周知されている従来法により、得られた抗体を再生し、精製して配列決定することができる。抗原結合フラグメントも従来法により調製できる。本発明の抗体または抗原結合フラグメントを遺伝子操作し、非ヒト由来CDRに1つ以上のヒトフレームワーク領域(FR)を導入する。ヒトFR生殖系列配列は、<http://imgt.cines.fr>を通じImMunoGeneTics(IMG T)、またはThe Immunoglobulin FactsBook, 2001 ISBN012441351より得ることができる。

【0053】

本発明の操作された抗体または抗原結合フラグメントは、従来法により調製及び精製することができる。例えば、重鎖(配列番号：28)及び軽鎖(配列番号：30)をコードするcDNA配列をクローニングし、GS発現ベクターに組換える。次いで、組換えられた免疫グロブリン発現ベクターを安定にCHO細胞に遺伝子導入することができる。当技術分野で周知され、またより推奨される方法として、哺乳動物発現系は、典型的にはFc領域の高度に保護されたN末端で抗体の糖鎖付加をもたらすことであろう。安定なクローンは、ヒトPCSK9と特異的に結合する抗体の発現によって得ることができる。陽性クローンは、バイオリアクターにおける抗体産生のために無血清培養培地中で増殖させることができる。抗体が分泌された培養培地は、従来技術により精製できる。例えば、該培地は、調節された緩衝液で平衡化されたプロテインAまたはGセファロースFFカラムに好都合に負荷できる。該カラムを洗浄し、非特異的結合成分を除去する。結合した抗体をPHグラジェントにより溶出し、抗体フラグメントをSDS-PAGEにより検出した後、プールする。抗体は、一般的な技術により濃縮することができる。可溶性凝集体及び多量体は、サイズ排除法またはイオン交換法を含む一般的な技術により効果的に除去できる。得られた生成物は直ちに凍結し(例えば-70度でもよく)、または凍結乾燥してもよい。

【0054】

動物、ヒト、実験対象、細胞、組織、器官、または体液に適用する場合の「投与」及び「治療」とは、外来の医薬品、治療剤、診断剤または組成物を動物、ヒト、実験対象、細胞、組織、器官、または体液と接触させることをいう。「投与」及び「治療」とは、例えば、治療的、薬物動態学的、診断的、研究的及び実験的な方法をいうことができる。細胞の処理は、試薬を細胞と接触させること、及び試薬を体液と接触させることを含み、該体液は細胞と接触する。また、「投与」及び「治療」は、例えば、細胞のin vitro及びex vitroでの試薬、診断、結合化合物または別の細胞による処理を意味する。ヒト、獣医、または研究対象に適用される場合の「治療」とは、研究及び診断用途での治療的処置、予防的または防止的措置をいう。

10

【0055】

「治療する」とは、本発明の結合化合物のいずれかを含有する組成物のような治療剤を、該薬剤が既知の治療活性を有する1つ以上の疾患症状を有する患者の体の内部または外部に投与することを意味する。代表的には、薬剤は、処置された患者または集団において1つ以上の疾患症状を緩和するのに有効な量で投与され、臨床的に測定可能な程度へ、そのような症状の進行の退縮を誘導するか、またはその症状の進行を抑制する。任意の特定の疾患症状を緩和するのに有効な治療薬の量（「治療有効量」ともいう）は、疾患の状態、患者の年齢及び体重、ならびに患者において所望の反応を誘発する薬剤の性能等の要因によって変動する。疾患症状が緩和されたかどうかは、その症状の重篤度または進行状況を評価するために医師または他の熟練した医療従事者が典型的に用いる任意の臨床測定によって評価できる。本発明の実施態様（例えば、治療方法または製造物品）は、全ての患者において関連の疾患症状を緩和するのに有効ではないかも知れないが、当技術分野で知られている任意の統計試験（例えば、Student's t検定、カイ二乗検定、Mann及びWhitneyによるU検定、Kruskal-Wallis検定（H検定）、Jonckheere-Terpstra検定及びWilcoxon検定）によって決定されるようにな統計的に有意な数の患者において目的の標的疾患症状を緩和するはずである。

20

【0056】

「保存的修飾」または「保存的代替または置換」とは、タンパク質の中で類似した特性（例えば、電荷、側鎖サイズ、疎水性/親水性、骨格コンフォメーション及び剛性等）を有する他のアミノ酸とのアミノ酸置換をいう。これにより、タンパク質の生物学的活性を変化させることなく頻繁に変化させることができる。当業者は、一般に、ポリペプチドの非必須領域における単一アミノ酸置換が生物学的活性を実質的に変化させないことを認識している（例えば、Watsonら(1987) 遺伝子の分子生物学、The Benjamin/Cummings Pub. Co., p.224(4th Ed.)）。更に、構造的または機能的に類似したアミノ酸の置換は、生物学的活性を妨害する可能性が低い。

30

【0057】

「有効量」は、疾病の症状または兆候を改善または予防するのに十分な量を包含する。また、有効量は診断を可能にするかまたは容易にするのに十分な量を意味する。特定の患者または獣医学的对象に対する有効量は、治療される状態、患者の全般的な健康状態、投与の経路及び用量、及び副作用の重症度等の要素によって変動する。有効量は、著しい副作用または毒性作用を回避する最大用量または投薬プロトコールであり得る。

40

【0058】

「外因性」とは、状況に応じて生物、細胞、または人体の外で産生される物質をいう。「内因性」とは、状況に応じて細胞、生物、または人体の中で産生される物質をいう。

【0059】

「相同性」とは、2つのポリヌクレオチド配列間または2つのポリペプチド間の配列類似性をいう。2つの比較された配列の両方の位置が同じ塩基またはアミノ酸の単量体サブユニットによって占有される場合（例えば、2つのDNA分子のそれぞれの位置がアデニンによって占有される場合）、その分子はその位置で相同である。2つの配列間の相同性のパーセンテージは、2つの配列によって共有される一致または相同の位置の数を比較される

50

位置の数で割った関数に100を掛けたものである。例えば、2つの配列中の10箇所の位置のうち6箇所で配列が最適に整列されている場合に一致または相同である場合、該2つの配列は60%相同である。一般に、2つの配列が整列し、相同性を最大にしている場合に比較が行われる。

【0060】

ここで用いる表現「細胞」、「細胞株」及び「細胞培養物」は互換的に使用され、そのような指定は全て後代を含む。従って、「形質転換体」及び「形質転換細胞」という用語は、転移の数を考慮することなく、主要な対象細胞及びそこから誘導される培養物を含む。意図的または偶然の突然変異により、全ての後代がDNA含量において正確に同一でないこともあることも理解される。最初に形質転換された細胞でスクリーニングされたのと同じ機能または生物学的活性を有する突然変異後代が含まれる。異なる名称が意図されている場合は、文脈からは明らかであろう。

10

【0061】

ここで用いる「ポリメラーゼ連鎖反応」または「PCR」とは、例えば、米国特許第4,683,195号に記載されているように、微量の核酸、RNA及び/またはDNAの特定部分が増幅される方法または技術をいう。一般に、関心のある領域の末端またはそれ以降の配列情報が利用可能になる必要がある。これによってオリゴヌクレオチドプライマーを設計することができる。これらのプライマーは、増幅されるテンプレートの対応する鎖と配列が同一または類似である。2つのプライマーの5'末端ヌクレオチドは、増幅されるべき物質の末端と同一であり得る。PCRは、全ゲノムDNAから特定のRNA配列、特定のDNA配列、及び全細胞RNA、バクテリオファージまたはプラスミド配列等から転写されたcDNAを増幅するために使用できる。Mullisら(1987) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:263; Erlich, ed, (1989) PCR TECHNOLOGY (Stockton Press, N.Y.)の概要を参照。ここで用いられるPCRは、核酸検査試料を増幅するための核酸ポリメラーゼ反応方法の一例(唯一ではない)として考えられる。これは、既知のプライマーとしての核酸及び核酸ポリメラーゼを用い、核酸の特定部分を増幅または生成させることを含む。

20

【0062】

「任意の」または「任意に」は、続く事象または状況が必ずしも起こる必要はないことを意味し、その記載は、事象または状況が起こるまたは起こらない場合を含む。例えば、「場合により1~3個の抗体重鎖可変領域を含む」とは、特定の配列を有する抗体重鎖可変領域が必ずしも存在する必要はないことを意味する。

30

【0063】

「医薬組成物」とは、本発明による1つ以上の化合物またはその生理学的/薬学的に許容される塩もしくはプロドラッグと、他の化学成分、ならびに生理学的/薬学的に許容される担体及び賦形剤等のさらなる成分との混合物を含むものをいう。医薬組成物は、生物への投与を促進し、活性成分の吸収を促進し、それにより生物学的効果を発揮することを目的とする。

【実施例と試験例】

【0064】

以下、本発明を実施例により更に説明する。しかし、本発明の範囲はこれに限定されるものではない。特定の条件は記載されない本発明の実施例では、一般的にCold Spring Harborの抗体技術ラボマニュアル及び分子クローニングマニュアルに記載されている従来の条件下で、または材料または製品の製造業者によって提案された条件下で実験は行われる。試薬の供給源は特に示されない場合、試薬は市販の慣用試薬である。

40

【実施例1】

【0065】

PCSK9抗原及び試験タンパク質の調製

タンパク質の設計と発現

本発明のPCSK9のテンプレートとしてUniprotプロタンパク質転換酵素サブチリシン/ケクシン9型(ヒトPCSK9、Uniprot No.:Q8MBP7)を用いて、抗原及び試験タンパク質

50

のアミノ酸配列を設計する。必要に応じて、PCSK9タンパク質をPADREペプチド等の免疫化を促進するhisタグまたはペプチド等の異なる標識と融合させ、次いでpTT5ベクター(Biovector, Cat#:102762)またはpTargetベクター(promega, A1410)にそれぞれクローニングし、一時的に293細胞に、または安定にCHO-Sに発現し、精製した。最後に、本発明の抗原及び試験タンパク質を得た。

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

MGTVSSRRSWWPLPLLLLLLLLLLGPAGARAQEDEDGDYEELVLAALRSEEDGLAEAPEHG
TTATFHRCADPWRLPGTYVVVLKEETHLSQSERTARRLQAQAARRGYLTKILHVFHGL
LPGFLVKMSGDLLELALKLPHVDYIEEDSSVFAQSIPWNLERITPPRYRADEYQPPDGGSL
VEVYLLDTSIQSDHREIEGRVMVTDNFENVPEEDGTRFHRQASKCDSHGTHLAGVVSGRDA
GVAKGASMRSLRVLNQCQKGTVSGTLIGLEFIRKSQLVQPVGPLVLLPLAGGYSRVLNA
ACQLARAGVVLVTAAGNFRDDACLYSPASAPEVITVGATNAQDQPVTLGTGTNFGRC
VDLFAPGEDIIIGASSDCSTCFVSQSGTSQAAAHVAGIAAMMLSAEPELTLAELRQRLIHFS
AKDVINEAWFPEDQRVLTPNLVAALPPSTHGAGWQLFCRTVWSAHS GPTRMATAVARC
APDEELLSCSSFSRSGKRRGERMEAQGGKLVCRAHNAFGGEGVYAIARCCLLPQANCSVH
TAPPAEASMGTRVHCHQQGHVLTGCSHWEVEDLGTHKPPVLRPRGQPNQCVGHREAS
IHASCCHAPGLECKVKEHGIPAPQEQVTVACEEGWTLTGCSALPGTSHVLGAYAVDNTC
VVRSRDVSTTGSTSEGAVTAVAICCRSRHLAQASQELQH HHHHHH 配列番号: 1

10

注: 下線付きの配列はシグナルペプチドであり、斜体部分はHis-タグ配列(His6-タグ)である。

20

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

MGTVSSRRSWWPLPLLLLLLLLLLGPAGARAQEDEDGDYEELVLAALRSEEDGLAEAPEHG
TTATFHRCADPWRLPGTYVVVLKEETHLSQSERTARRLQAQAARRGYLTKILHVFHGL
LPGFLVKMSGDLLELALKLPHVDYIEEDSSVFAQSIPWNLERITPPRYRADEYQPPDGGSL
VEVYLLDTSIQSDHREIEGRVMVTDNFENVPEEDGTRFHRQASKCDSHGTHLAGVVSGRDA
GVAKGASMRSLRVLNQCQKGTVSGTLIGLEFIRKSQLVQPVGPLVLLPLAGGYSRVLNA
ACQLARAGVVLVTAAGNFRDDACLYSPASAPEVITVGATNAQDQPVTLGTGTNFGRC
VDLFAPGEDIIIGASSDCSTCFVSQSGTSQAAAHVAGIAAMMLSAEPELTLAELRQRLIHFS
AKDVINEAWFPEDQRVLTPNLVAALPPSTHGAGWQLFCRTVWSAHS GPTRMATAVARC
APDEELLSCSSFSRSGKRRGERMEAQGGKLVCRAHNAFGGEGVYAIARCCLLPQANCSVH
TAPPAEASMGTRVHCHQQGHVLTGCSHWEVEDLGTHKPPVLRPRGQPNQCVGHREAS
IHASCCHAPGLECKVKEHGIPAPQEQVTVACEEGWTLTGCSALPGTSHVLGAYAVDNTC
VVRSRDVSTTGSTSEGAVTAVAICCRSRHLAQASQELQGS GAKFVAAWTLKAAAHHHHH
H 配列番号: 2

30

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

TEV切断部位及びHis-タグを有するPCSK9の融合タンパク質: PCSK9-TEV-His6、N-PCSK9(N末端PCSK9ドメイン)、免疫原として使用され、TEV酵素で得られる;

40

MGTVSSRRSWWPLPLLLLLLLLLLGPAGARAQEDEDGDYEELVLAALRSEEDGLAEAPEHG
TTATFHRCADPWRLPGTYVVVLKEETHLSQSERTARRLQAQAARRGYLTKILHVFHGL
LPGFLVKMSGDLLELALKLPHVDYIEEDSSVFAQSIPWNLERITPPRYRADEYQPPDGGSL
VEVYLLDTSIQSDHREIEGRVMVTDNFENVPEEDGTRFHRQASKCDSHGTHLAGVVSGRDA
GVAKGASMRSLRVLNQCQKGTVSGTLIGLEFIRKSQLVQPVGPLVLLPLAGGYSRVLNA
ACQLARAGVVLVTAAGNFRDDACLYSPASAPEVITVGATNAQDQPVTLGTGTNFGRC
VDLFAPGEDIIIGASSDCSTCFVSQSGTSQAAAHVAGIAAMMLSAEPELTLAELRQRLIHFS
AKDVINEAWFPEDQRVLTPNLVAALPPSTH ENLYFQ GAGWQLFCRTVWSAHS GPTRMA
TAVARCAPDEELLSCSSFSRSGKRRGERMEAQGGKLVCRAHNAFGGEGVYAIARCCLLPQ
ANCSVHTAPPAEASMGTRVHCHQQGHVLTGCSHWEVEDLGTHKPPVLRPRGQPNQCV

50

GHREASIHASCCHAPGLECKVKEHGIPAPQEQVTVACEEGWTLTGCSALPGTSHVLGAYA
VDNTCVVRSRDVSTTGSTSEGAVTAVAICCRSRHLAQASQELQH HHHHH

配列番号：3

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

His-タグを有するPCSK9-D374Y突然変異タンパク質：PCSK9-D374Y-His6、検出試薬として使用される；

MGTVSSRRSWWPLPLLLLLLLLLLGPAGARAQEDEDGDYEELVLALRSEEDGLAEAPEHG
TTATFHRCADPWRLPGTYVVVLKEETHLSQSERTARRLQAQAARRGYLTKILHVFHGL
LPGFLVKMSGDLLELALKLPVVDYIEEDSSVFAQSIPWNLERITPPRYRADEYQPPDGGSL
VEVYLLDTSIQSDHREIEGRVMVTD FENVPEEDGTRFHRQASKCDSHGTHLAGVVSGRDA
GVAKGASMRSLRVLNQCQKGTVSGTLIGLEFIRKSQLVQPVGPLVVLLPLAGGYSRVLNA
ACQRLARAGVVLVTAAGNFRDDACLYSPASAPEVITVGATNAQDQPVTLGTLTGNFGR
VDLFAPGEDII GASSYCSTCFVSQSGTSQAAAHVAGIAAMMLSAEPELTLAELRQRLIHFS
AKDVINEAWFPEDQRVLT PNLVAALPPSTHGAGWQLFCRTVWSAHS GPTRMATAVARC
APDEELLSCSSFSRSGKRRGERMEAQGGKLV CRAHNAFGGEGVYAIARCCLLPQANCSVH
TAPPAEASMGTRVHCHQQGHVLTGCSHWEVEDLGTHKPPVLRPRGQPNQCVGHREAS
IHASCCHAPGLECKVKEHGIPAPQEQVTVACEEGWTLTGCSALPGTSHVLGAYAVDNTC
VVRSRDVSTTGSTSEGAVTAVAICCRSRHLAQASQELQH HHHHH

10

配列番号：4

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

ピオチン受容ペプチドBP15及びHisタグを挿入されたPCSK9タンパク質：PCSK9-BP15-His6。ピオチンは、検出試薬として、発現中にBP15ペプチド位置に標識され、in vitroでのピオチン標識を回避し、その結果、起こりうる立体構造の変化を回避する。

20

MGTVSSRRSWWPLPLLLLLLLLLLGPAGARAQEDEDGDYEELVLALRSEEDGLAEAPEHG
TTATFHRCADPWRLPGTYVVVLKEETHLSQSERTARRLQAQAARRGYLTKILHVFHGL
LPGFLVKMSGDLLELALKLPVVDYIEEDSSVFAQSIPWNLERITPPRYRADEYQPPDGGSL
VEVYLLDTSIQSDHREIEGRVMVTD FENVPEEDGTRFHRQASKCDSHGTHLAGVVSGRDA
GVAKGASMRSLRVLNQCQKGTVSGTLIGLEFIRKSQLVQPVGPLVVLLPLAGGYSRVLNA
ACQRLARAGVVLVTAAGNFRDDACLYSPASAPEVITVGATNAQDQPVTLGTLTGNFGR
VDLFAPGEDII GASSDCSTCFVSQSGTSQAAAHVAGIAAMMLSAEPELTLAELRQRLIHFS
AKDVINEAWFPEDQRVLT PNLVAALPPSTHGAGWQLFCRTVWSAHS GPTRMATAVARC
APDEELLSCSSFSRSGKRRGERMEAQGGKLV CRAHNAFGGEGVYAIARCCLLPQANCSVH
TAPPAEASMGTRVHCHQQGHVLTGCSHWEVEDLGTHKPPVLRPRGQPNQCVGHREAS
IHASCCHAPGLECKVKEHGIPAPQEQVTVACEEGWTLTGCSALPGTSHVLGAYAVDNTC
VVRSRDVSTTGSTSEGAVTAVAICCRSRHLAQASQELQSGSTSGSGLNDIFEAQKIEWHEH
HHHHH

30

配列番号：5

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

ピオチン受容ペプチドBP15及びHisタグを挿入されたPCSK9 D374Y突然変異タンパク質：PCSK9-D374Y-BP15-His6、検出タンパク質として：

40

MGTVSSRRSWWPLPLLLLLLLLLLGPAGARAQEDEDGDYEELVLALRSEEDGLAEAPEHG
TTATFHRCADPWRLPGTYVVVLKEETHLSQSERTARRLQAQAARRGYLTKILHVFHGL
LPGFLVKMSGDLLELALKLPVVDYIEEDSSVFAQSIPWNLERITPPRYRADEYQPPDGGSL
VEVYLLDTSIQSDHREIEGRVMVTD FENVPEEDGTRFHRQASKCDSHGTHLAGVVSGRDA
GVAKGASMRSLRVLNQCQKGTVSGTLIGLEFIRKSQLVQPVGPLVVLLPLAGGYSRVLNA
ACQRLARAGVVLVTAAGNFRDDACLYSPASAPEVITVGATNAQDQPVTLGTLTGNFGR
VDLFAPGEDII GASSYCSTCFVSQSGTSQAAAHVAGIAAMMLSAEPELTLAELRQRLIHFS
AKDVINEAWFPEDQRVLT PNLVAALPPSTHGAGWQLFCRTVWSAHS GPTRMATAVARC
APDEELLSCSSFSRSGKRRGERMEAQGGKLV CRAHNAFGGEGVYAIARCCLLPQANCSVH

50

TAPPAEASMGTRVHCHQQGHVLTGCSSHWEVEDLGTHKPPVLRPRGQPNQCVGHREAS
IHASCCHAPGLECKVKEHGIPAPQEQTVACEEGWTLTGCSALPGTSHVLGAYAVDNTC
VVRSRDVSTTGSTSEGAVTAVAICCRSRHLAQASQELQGSTSGSGLNDIFEAQKIEWHEH
HHHHH

配列番号：6

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

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

MGPWGWKLRWTVALLLAAAGTAVGDRCERNEFQCQDGK CISYKWVCDGSAECQDGSD
ESQETCLSVTCKSGDFSCGGRVNR CIPQFWRC DGQVDCDNGSDEQGCPPKTC SQDEFRC
HDGKCISRQFVCDSDRDCLDGSDEASCPVLT CGPASFCNSSTCIPQLWACDNDPDCEDG
SDEWPQRRCRGLYVFQGDSSPCSAFEFHCLSGECIHSSWRC DGGPDCKDKSDEENCAVATC
RPDEFQCS DGNCIHGSRQC DREYDCKDMSDEVGCVNVT LCEGPNKFKCHSGECITLDKV
CNMARDCRDWSDEPIKECGTNECLDNNGGCSHVCNDLKIGYECLCPDGFQLVAQRRCED
IDECQDPDTC SQLCVNLEGGYKQCCEEGFQLDPHTKACKAVGSIAYLFFTNRHEVRKMTL
DRSEYTS LIPNLRNVVALDTEVASNRIYWS DLSQRMICSTQLDRAHGVSSYDTVISRDIQA
PDGLAVDWIHSNIYWTDSVLGTVSVADTKGVKRKTLFRENGSKPRAIVVDPVHGFMYW
TDWGTPAKIKKGG LNVGDIYSLVTENIQWPNGITLDLLSGRLYWVDSKLHSISSIDVNGG
NRKTILEDEKRLAHPFSLAVFEDKVFWDIINEAIFSANRLTGSDVNLLAENLLSPEDMVL
FHNL TQPRGVNWCERTT LSNGGCQYLCLPAPQINPHSPKFTCACPDGMLLARDMR SCLT
EAEAAVATQETSTVRLKVSSTAVRTQH TTTTRPVPDTSRLPGATPGLTTVEIVTMSHQALG
DVAGRGNEKKPSSVRDYKDDDDKHHHHH

10

20

配列番号：7

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

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

MEFGLSWLFLVAILKGVQCGTNECLDNNGGCSHVCNDLKIGYECLCPDGFQLVAQRRCE
DIDECQDPDTC SQLCVNLEGGYKQCCEEGFQLDPHTKACKEPKSSDKTHTCPPCPAPELL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

30

配列番号：8

注：下線付きの配列はシグナルペプチドであり、二重下線の配列はPCSK9結合活性を有す
る切断されたLDLR細胞外ドメイン (LDLR-sECD) であり、斜線部分はhIgG1-Fcである。
より切断されたLDLR細胞外ドメインとhIgG1 Fc (PCSK9結合活性を有する)との融合タ
ンパク質：LDLR-ssECD-Fc (hIgG1)、検出試薬として；

MEFGLSWLFLVAILKGVQCGTNECLDNNGGCSHVCNDLKIGYECLCPDGFQLVAQRRCE
DIDEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

40

配列番号：9

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

【実施例 2】

【0066】

50

PCSK9の精製組換えタンパク質及びLDLR関連組換えタンパク質ならびにハイブリドーマ抗体及び組換え抗体の精製

1. His-タグを有する組換えタンパク質の精製工程：

細胞発現上清試料を高速遠心分離によって遠心分離し、不純物を除去した。緩衝液をPBSで交換し、イミダゾールを添加して最終濃度5 mMとした。ニッケルカラムを5 mMイミダゾールを含有するPBS溶液で平衡化し、カラムの2～5倍容量で洗浄した。緩衝液交換後の上清試料をIMACカラムに負荷した。該カラムを5 mMイミダゾールを含有するPBS溶液で、A₂₈₀での読み取り値がベースラインまで低下するまで洗浄した。次に、クロマトグラフィーカラムをPBS+10 mMイミダゾールで洗浄し、非特異的結合タンパク質を除去し、流出物を集めた。300 mMイミダゾールを含有するPBS溶液で標的タンパク質を溶出し、溶出ピークを集めた。集めた溶出液を濃縮し、ゲルクロマトグラフィー(GE)Superdex 200で更に精製(移動相：PBS)した。多量体ピークを除去し、溶出ピークを集めた。得られたタンパク質を電気泳動、ペプチドマップ及びLC-MSにより同定した。PCSK9-His6(配列番号：1)、PCSK9-PADRE-His6(配列番号：2)、PCSK9-TEV-His6(配列番号：3)、PCSK9-D374Y-His6(配列番号：4)、PCSK9-BP15-His6(配列番号：5)及びPCSK9-D374Y-BP15-His6(配列番号：6)を得て、本発明の免疫原または検出試薬として使用した。PCSK9-TEV-His6を精製し、TEV酵素で切断し、IMACカラムで得られた生成物からTEV酵素、不完全に切断されたPCSK9-TEV-His6またはHis-タグ付きのC末端ドメインフラグメントを除去した。IMAC流出液を濃縮し、M末端PCSK9ドメインフラグメントのみを残し、マウスを免疫化するための免疫原として使用した。

10

20

2. Hisタグ及びFlagタグを有するLDLR-ECD-Flag-His6(配列番号：7)の組換えタンパク質の精製工程：

高速遠心分離により試料を遠心分離し、不純物を除去した。次いで試料を適切な容量に濃縮した。Flag親和性カラムを0.5×PBSで平衡化し、カラムの2～5倍容量で洗浄した。不純物を除去した後、細胞発現上清試料をカラムに負荷した。該カラムを0.5×PBSで、A₂₈₀での読み取り値がベースラインまで低下するまで洗浄した。0.3M NaClを含有するPBSでカラムを洗浄し、タンパク質を洗浄し、集めた。標的タンパク質を0.1M酢酸(pH3.5～4.0)で溶出し、集めた後、pH値を中性に調整した。集めた溶出液を濃縮し、ゲルクロマトグラフィー(GE)Superdex 200で更に精製(移動相：PBS)した。多量体ピークを除去し、溶出ピークを集めた。得られたタンパク質を電気泳動、ペプチドマップ及びLC-MSにより同定した。FLAG/His6タグを有するLDLR-ECD-Flag-His6(配列番号：7)が得られ、本発明の抗体の性能試験に使用した。

30

3. LDLR Fcの融合タンパク質の精製工程：

高速遠心分離により細胞発現上清試料を遠心分離し、不純物を除去した。次いで試料を適切な容量に濃縮し、プロテインAカラムに負荷した。該カラムをPBSで、A₂₈₀での読み取り値がベースラインまで低下するまで洗浄した。標的タンパク質を100 mM酢酸ナトリウム(pH3.0)で溶出した後、1M Tris-HClで中和した。溶出した試料を適切に濃縮し、PBSで予め平衡化したゲルクロマトグラフィー(GE)Superdex 200で更に精製した。多量体を含まないピークを集めた。この方法を用いてLDLR-sECD-Fc(hIgG1)(配列番号：8)及びLDLR-ssECD-Fc(hIgG1)(配列番号：9)を精製した。両者ともPCSK9抗体の性能試験に使用できる。

40

【実施例3】

【0067】

抗ヒトPCSK9ハイブリドーマモノクローナル抗体の調製

1. 免疫処置

マウス(実験用SjL白マウス、メス、6週齢(北京Weitong Lihua実験動物技術有限公司、動物生産ライセンス番号：SCXK(Beijing)2012-0001)給餌環境：SPFレベル)を免疫して抗ヒトPCSK9モノクローナル抗体は作製した。マウスを購入した後、動物を実験室に、12/12時間の明/暗サイクル、温度20～25℃、湿度40～60%の条件で1週間保持した。環境に適応したマウスを1群あたり6～10匹で、次の2つのスキームに従って免疫

50

化した。免疫原は、Hisタグを有するヒトPCSK9-His6（配列番号：1）、PCSK9-PADRE-His6（配列番号：2）及びN-PCSK9（配列番号：3）であった。

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

スキームB：Titermax（Sigmaロット番号：T2684）及びAlum（Thremoロット番号：77161）でマウスを交叉免疫した。抗原と免疫賦活剤（titermax）の比は1：1、抗原と免疫賦活剤（Alum）の比は3：1、10～20 µg/マウス（初回免疫の場合）、5 µg/マウス（追加免疫の場合）であった。0日目に、乳化抗原をマウスに20/10 µg/マウスで腹腔内（IP）注射し、初回免疫の後は1週間に1回、Titermax及びAlumを交互に合計6～11週間使用した。免疫処置の4週間後に背部及び腹部の腫脹状態に応じ、背部または腹腔内の抗原注射方法を選択した。

2.細胞融合

脾臓細胞融合のために、血清における抗体価が高く、かつ力価が一定する傾向を示すマウス（試験1及び2をPCSK9のELISAと合わせて参照）を選択した。融合の72時間前に、選択したマウスにPCSK9-His6を10 µg/マウスで腹腔内注射により免疫した。脾臓リンパ球及び骨髄腫細胞Sp2/0（ATCC（登録商標）CRL-8287™）を融合して、PEGを介して最適化された融合手順によりハイブリドーマ細胞を得た。融合されたハイブリドーマ細胞を、HAT完全培地（20%FBS、1×HAT及び1×OPIを含有するRPMI-1640培地）で再懸濁した後、96ウェル細胞培養プレート（1×10⁵/150 µl/ウェル）に入れ、37 °C及び5%CO₂で培養した。融合後5日目に、HAT完全培地を50 µl/ウェルに加え、37 °C及び5%CO₂で培養した。融合後の7日目～8日目に、細胞増殖密度に基づいて、全培地をHT完全培地（20%FBS、1×HT及び1×OPIを含有するRPMI-1640培地）に交換し、200 µl/ウェル、37 °C、5%CO₂で培養した。

3.ハイブリドーマ細胞のスクリーニング

融合後の10日目から11日目に、細胞増殖密度に基づいて、PCSK9またはPCSK9-Y結合についてのELISA試験を行った（試験1及び2参照）。阻害ELISA試験（試験3及び試験4参照）においてLDLRに結合するPCSK9またはPCSK9-Yの阻害を試験するため、結合ELISA試験に陽性細胞を使用した。陽性ウェルの培地を交換し、細胞を細胞密度に基づいて24ウェルプレートに拡大した。24ウェルプレートに移された細胞株を保存し、再試験後に初回サブクローン化した。初回サブクローンのスクリーニング後の陽性細胞（試験1及び2参照）を保存し、2次サブクローンに供した。タンパク質発現のために2次サブクローンの後の陽性細胞（試験1及び2参照）を保存した。複数回の融合の後、PCSK9またはPCSK9-YのLDLRとの結合を阻害できるハイブリドーマ細胞を得た。

阻害アッセイ及び結合アッセイのスクリーニングによりハイブリドーマクローンmAb-001を得た。無血清細胞培養により抗体を更に調製した。例示した精製工程に従って抗体を精製し、検出に用いた。

ハイブリドーマクローンmAb-001のマウス可変領域の配列は以下の通りであった：

mAb-001 VH

QVHLQQSGAELAKPGASVKLSCKASGYTFNDYWMHWVKERPGQGLEWIGYINPSSGFT
KYHQNEFKDKATLTADKSSSTAYMQLSSLTYDDSAVYYCARQYDYDEDWYFDVWGTGTT
VTVSS

配列番号：10

mAb-001VL

DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLLSRTRKNFLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTR
ESGVPDRFTGRGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCKQSFNLFITFGSGTKLEIK

配列番号：11

10

20

30

40

50

注：順序はFR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4であり、斜線部分はFR配列であり、下線部分はCDR配列である。

【表 1】

重鎖及び軽鎖 CDR 領域配列

		重鎖	軽鎖	
mAb-001	HCDR1	DYWMH 配列番号：12	LCDR1	KSSQSLNSRTRKNFLA 配列番号：15
	HCDR2	YINPSSGFTKYHQNFKD 配列番号：13	LCDR2	WASTRES 配列番号：16
	HCDR3	QYDYDEDWYFDV 配列番号：14	LCDR3	KQSFNLFT 配列番号：17

10

【実施例 4】

【0068】

抗ヒトPCSK9ハイブリドーマモノクローナル抗体のヒト化

1. ハイブリドーマクローンmAb-001のためのヒト化フレームの選択

IMGTヒト抗体重鎖及び軽鎖可変領域生殖系列遺伝子データベース及びMOEソフトウェアを比較することにより、mAb-001と高い相同性を有する重鎖及び軽鎖可変領域遺伝子をテンプレートとして選択した。該2つのマウス抗体のCDRをそれぞれ対応するヒトテンプレートに移植して、順序FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4の可変領域配列を形成した。Kabat付番システムに従ってアミノ酸残基を付番し、注解した。

20

マウス抗体mAb-001のヒト化軽鎖テンプレートはIGKV1-39*01及びhjk2.1であり、ヒト化重鎖テンプレートはIGHV1-2*02及びhjh2である。ヒト化抗体h001-1のヒト化後の可変領域配列を以下に示す：

h001-1 VH

QVQLVQSGAEVKKKPGASVKVSVCKASGYTFTDYWMHWVRQAPGQGLEWMGYINPSSGFTKYHQNFKDRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARQYDYDEDWYFDVWGQGT

30

配列番号：18

h001-1 VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKSQSLNSRTRKNFLAWYQKPKGKAPKLLIYWASTRESGVPSRFSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCKQSFNLFTFGQGTKLEIK

配列番号：24

注：順序はFR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4であり、斜体部分はFR配列であり、下線部分はCDR配列である。

2. ハイブリドーマクローンmAb-001のテンプレート選択及び逆突然変異設計を表2に示す。ハイブリドーマの逆突然変異後のヒト化配列の組合せを表2に示す。

40

【表 2】

テンプレート選択と逆突然変異設計

VH		配列番号	VL		配列番号
h001_VH. 1	Graft	18	h001_VL. 1	Graft	24
h001_VH. 1A	T30N	19	h001_VL. 1A	S66D	25
h001_VH. 1B	R87T	20	h001_VL. 1B	T5S, S66D	26
h001_VH. 1C	T30N, R87T	21	h001_VL. 1C	T5S, S66D, Q3V, A49S	27
h001_VH. 1D	T30N, R87T, R72A, T74K	22			
h001_VH. 1E	T30N, R87T, R72A, T74K, M48I, V68A, M70L, R38K, R67K	23			

注：例えば、Kabat付番システムによれば、S66Dは、66位のSがDに逆突然変異したことを意味する。

ヒトFR領域配列に移植表現マウス抗体CDRを移植し、その突然変異可変領域の特異的な配列は表3に示すとおりである：

10

20

30

40

50

【表 3】

配列番号	配列
19	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFMDYWMH</u> <u>WVRQAPGQGLEWMGY</u> <u>INPSSGFTKY</u> <u>HQNFKDRVTMTRDTSISTAYMEL</u> <u>SRLRSDDTAVYYCAR</u> <u>QYDYDEDWYFDV</u> <u>WGQGT</u> <u>TVTVS</u> S
20	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFDYWMH</u> <u>WVRQAPGQGLEWMGY</u> <u>INPSSGFTKY</u> <u>HQNFKDRVTMTRDTSISTAYMEL</u> <u>SRLTSDDTAVYYCAR</u> <u>QYDYDEDWYFDV</u> <u>WGQGT</u> <u>TVTVS</u> S
21	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFMDYWMH</u> <u>WVRQAPGQGLEWMGY</u> <u>INPSSGFTKY</u> <u>HQNFKDRVTMTRDTSISTAYMEL</u> <u>SRLTSDDTAVYYCAR</u> <u>QYDYDEDWYFDV</u> <u>WGQGT</u> <u>TVTVS</u> S
22	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFMDYWMH</u> <u>WVRQAPGQGLEWMGY</u> <u>INPSSGFTKY</u> <u>HQNFKDRVTMTADKSISTAYMEL</u> <u>SRLTSDDTAVYYCAR</u> <u>QYDYDEDWYFDV</u> <u>WGQGT</u> <u>TVTVS</u> S
23	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFMDYWMH</u> <u>WVKQAPGQGLEWIGY</u> <u>INPSSGFTKY</u> <u>HQNFKDKATLTADKSISTAYMEL</u> <u>SRLTSDDTAVYYCAR</u> <u>QYDYDEDWYFDV</u> <u>WGQGT</u> <u>TVTVS</u> S
25	<u>DIQMTQSPSSLSASVGD</u> <u>RVITITCKSSQSL</u> <u>LSRTRKNFLAWYQQKPGKAPKLLIYWASTR</u> <u>ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISS</u> <u>LQPEDFATYYCKQSFNLF</u> <u>FGQG</u> <u>TKLEIK</u>
26	<u>DIQMSQSPSSLSASVGD</u> <u>RVITITCKSSQSL</u> <u>LSRTRKNFLAWYQQKPGKAPKLLIYWASTR</u> <u>ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISS</u> <u>LQPEDFATYYCKQSFNLF</u> <u>FGQG</u> <u>TKLEIK</u>
27	<u>DIVMSQSPSSLSASVGD</u> <u>RVITITCKSSQSL</u> <u>LSRTRKNFLAWYQQKPGKSPKLLIYWASTR</u> <u>ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISS</u> <u>LQPEDFATYYCKQSFNLF</u> <u>FGQG</u> <u>TKLEIK</u>

注：下線部はCDR領域である。

【表 4】

マウス抗体 mAb-001 のヒト化配列の組合せ

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

注：表は、各配列とその変異体配列を組合せることによって得られたヒト化抗体可変領域

の組合せを示す。例えば、h001-1は、ヒト化抗体h001-1の可変領域が、軽鎖h001_VL1及び重鎖h001_VH.1Aから成ることを示す。その他も同様である。

3. 上記ヒト化配列を組合せて、重鎖定常領域がヒトIgG1由来であり、軽鎖定常領域がヒト鎖由来である抗体を形成した。対応するヒト化抗体を得て、ELISA法（試験1参照）によりPCSK9への結合について検出し、ELISA法（試験2参照）によりPCSK9-Yへの結合について検出した。上記ELISA法で検出された結合陽性細胞を、阻害ELISA試験（試験4参照）におけるPCSK9/LDLR結合の阻害について更に検出し、阻害ELISA試験（試験3参照）におけるPCSK9-Y/LDLR結合の阻害について更に検出した。それらの結果を表5～8に示す。

その結果、本発明で得られたPCSK9抗体は、PCSK9及びPCSK9-Yとの結合活性が高く、また、該抗体はPCSK9/PCSK9-YとLDLRとの結合を効果的に阻害できることが示された。

【実施例5】

【0069】

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

抗ヒトPCSK9ヒト化抗体の構築及び発現の方法を以下に示す：

1. プライマー設計：オンラインソフトウェアDNAWorks(v3.2.2, <http://helixweb.nih.gov/dnaworks/>)を用いて、組換えに必要な遺伝子フラグメント：

5'～30bpシグナルペプチド+VH/VK+30bp CH1/CL-3'を含有するVH/VKを合成し、複数のプライマーを設計した。プライマー設計の原則：標的遺伝子2が2つのアミノ酸中の標的遺伝子1と異なる場合、図1に示すように、突然変異部位に位置する更なるプライマーを設計した。

2. フラグメントスプライシング：TakaRa Primer STAR GXL DNAポリメラーゼのマニュアルに従って、上記で設計した複数のプライマーを用いて2段階PCR増幅を行い、組換えに必要な遺伝子フラグメントを含有するVH/VKを得た。

3. 発現ベクターpHr（シグナルペプチド及び定常領域遺伝子（CH1-FC/CL）フラグメントを有する）の構築及び制限酵素消化

図2に示すように、酵素消化部位とは異なる配列を認識するBsmBIのようないくつかの特別な復帰酵素を用いて、発現ベクターpHr（シグナルペプチド及び定常領域遺伝子（CH1-FC/CL）フラグメントを有する）を設計し、構築した。BsmBIを用いてベクターを切断し、ゲルを切断し、使用のため回収した。

4. 組換え発現ベクターVH-CH1-FC-pHr/VK-CL-pHrの構築

組換えに必要な遺伝子フラグメントを含有するVH/VK及びBsmBI酵素で消化した回収発現ベクターpHr（シグナルペプチド及び定常領域遺伝子（CH1-FC/CL）フラグメントを含む）をDH5 適格細胞に3：1の比率で加え、0 の氷浴中で30分間培養し、42 で90秒間熱ショックし、5倍量のLB培地を添加し、37 で45分間培養し、LB-Ampプレートに移し、37 で終夜培養した。単一クローンを採取し、配列決定を行った。

上記の方法で本発明の抗体を構築できるが、この方法に限定されない。例えば、抗体h001-4及びその変異体を設計し、次のものを得る。：1) h001-4-WT：h001-4のIgGフォーマット、即ち、ヒトIgG1由来の重鎖定常領域及びヒト鎖由来の軽鎖定常領域を有するヒト化配列の組合せh001-4；2) h001-4-YTE：h001-4-IgG1-YTEフォーマット、即ち、変異体ヒトIgG1（YTE突然変異）の重鎖定常領域及びヒト鎖由来の軽鎖定常領域を有するヒト化配列の組合せh001-4。突然変異ヒトIgG1は、他の形態の突然変異であってもよい。得られた抗体及び変異体抗体をBIAcore検出（試験6）により親和性について検出し、その結果を表9に示す。

構築及び発現された抗ヒトPCSK9ヒト化抗体（IgG1及びそのIgG1-YTEフォーマット）の配列を以下に示す：

H001-4 IgG1フォーマット、重鎖定常領域はヒトIgG1に由来し、軽鎖定常領域はヒト軽鎖に由来する：

重鎖アミノ酸配列（ヒトIgG1）：

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYWMHWVRQAPGQGLEWMGYINPSSGFT

10

20

30

40

50

ga

配列番号：31

h001-4-IgG1-YTE (軽鎖はh001-4- : 配列番号：30)

重鎖アミノ酸配列：IgG1-YTE

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYWMHWVRQAPGQGLEWMGYINPSSGFT
 KYHQNFKDRVTMTRDTSISTAYMELSRLSDDTAVYYCARQYDYDEDWYFDVWGQGT
 VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPA
 VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
 ELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
 REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
 PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT
 VDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

配列番号：32

重鎖DNA配列：

AtggagtttgggctgagctggccttttcttgtcgcgattcttaaggggtgtccagtgcCAGGTGCAGCTGGT
 GCAGAGCGGCGCTGAGGTGAAGAAGCCCGGAGCGAGCGTAAAGGTGAGCTGCAAGGCC
 AGCGGATACACCTTCACCGACTACTGGATGCACTGGGTGAGGCAGGCCCCAGGACAGGG
 CCTGGAGTGGATGGGCTACATCAACCCAGCAGCGGCTTTACCAAGTATCACCAGAACT
 TCAAAGACAGGGTGACCATGACCAGGGACACCAGCATCAGCACCGCCTACATGGAGCTG
 AGCAGGCTGAGGAGCGACGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGCAATACGACTACGA
 CGAGGACTGGTACTTCGACGTGTGGGGCCAAGGAACCACCGTGA CTGTGAGCAGCgcttc
 gaccaagggcccatcggcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggcacagcggccctggg
 ctgcctgggtcaaggactacttccccgaaccgggtgacgggtgctggtggaactcagggcgcctgaccagcggcgt
 gcacaccttcccggtgtcctacagtctcaggactctactccctcagcagcgtgggtgaccgtgccctccagca
 gcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagtg
 agcccaaactctgtgacaaaactcacacatgccaccgtgccagcacctgaactcctggggggaccgtcagt
 cttccttccccccaaaacccaaggacaccctctacatcaccgggagcctgaggtcacatgctggtggtg
 gacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaa
 acaaagccgcgaggagcagtagacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggac
 tggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatc
 tccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatcccggtatgagctgaccaa
 gaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagacaa
 tgggcagccggagaaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttctctacagc
 aagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgc
 acaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaatga

20

30

配列番号：33

注：下線部分はシグナルペプチドDNA配列である。

本発明の性能及び利点は、以下に示す生化学試験によって確認されている。

【試験1】

【0070】

PCSK9抗体の野生型PCSK9タンパク質への結合に関するELISA試験

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

ストレプトアビジン (Sigma, CAT # S4762) をPBSで2 μg/mlに希釈し、96ウェルのE
 LISAプレートに4 で終夜コーティングした。プレートを洗浄した後、37 でトリス緩衝
 液 (0.9 mM CaCl₂、0.05% Tween 20及び5% スキムミルクを含有する) で2時間プロ
 ッキングした。次いでプレートを再度洗浄し、自家調製のピオチン標識PCSK9 (0.9 mM
 CaCl₂、0.05% Tween 20及び1% スキムミルクを含有するトリス緩衝液で希釈したbio-
 WT-PCSK9) を100 μl/ウェルで添加し、37 で1時間培養した。洗浄後、プレートに

40

50

異なる濃度に希釈されたPCSK9抗体の試料を加え、37℃で1時間培養した。次いでプレートを再度洗浄し、HRP-ヤギ抗ヒト(H+L)抗体(jackson, CAT#109-035-088)を添加し、37℃で1時間培養した。次いでプレートを再度洗浄し、現像のためにテトラメチルベンジジン溶液を添加した。最後に、停止溶液を加え、マイクロプレートリーダーでOD450値を計測した後、EC50を計算した。

本発明のキメラ抗体及び逆突然変異抗体のヒトPCSK9タンパク質へ結合する能力に関するELISA試験の結果を表5に示す。

【表5】

本発明のPCSK9抗体のPCSK9への結合アッセイ

クローン番号	EC50 ($\mu\text{g/ml}$)
h001-1	0.0084
h001-2	0.0123
h001-3	0.0113
h001-4	0.012
h001-5	0.0141
h001-6	0.01
h001-7	0.012
h001-8	0.009
h001-9	0.0136
h001-10	0.0176
h001-11	0.0129
h001-12	0.0103
h001-13	0.0071
h001-14	0.0084
h001-15	0.011
h001-16	0.0082
h001-17	0.0114
h001-18	0.0147
h001-19	0.0139
h001-20	0.0126
h001-21	0.0145
h001-22	0.0123
h001-23	0.0118
h001-24	0.0092
Ch-001	0.0084

10

20

30

40

本データは、本発明のヒト化抗体が、ヒトPCSK9タンパク質に対してより高い結合活性を有することを示す。

50

【試験2】

【0071】

PCSK9抗体のPCSK9-Yへの結合に関するELISA試験

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

ストレプトアビジン（Sigma, CAT# S4762）をPBSで2 µg/mlに希釈し、96ウェルのELISAプレートに4℃で終夜コーティングした。プレートを洗浄した後、37℃でトリス緩衝液（0.9 mM CaCl₂、0.05% Tween 20及び5% スキムミルクを含有する）で2時間ブロッキングした。次いで、プレートを再度洗浄し、自家調製のビオチン標識PCSK9-Y（0.9 mM CaCl₂、0.05% Tween 20及び1% スキムミルクを含有するトリス緩衝液で希釈したbio-PCSK9-Y）を100 µl/ウェルで添加し、37℃で1時間培養した。洗浄後、プレートに異なる濃度に希釈されたPCSK9抗体の試料を加え、37℃で1時間培養した。次いでプレートを再度洗浄し、HRP-ヤギ抗ヒト（H+L）抗体（jackson, CAT# 109-035-088）を添加し、37℃で1時間培養した。次いでプレートを再度洗浄し、現像のためにテトラメチルベンジジン溶液を添加した。最後に、停止溶液を加え、マイクロプレートリーダーでOD 450値を計測した後、EC50を計算した。

本発明のキメラ抗体及び逆突然変異抗体の変異体PCSK9へ結合する能力に関するELISA試験の結果を表6に示す。

10

20

30

40

50

【表 6】

PCSK9-Y に対する本発明の PCSK9 抗体の結合アッセイ

クローン番号	EC50 (μ g/ml)
h001-1	0.0132
h001-2	0.0157
h001-3	0.0152
h001-4	0.0179
h001-5	0.0152
h001-6	0.0144
h001-7	0.0137
h001-8	0.0165
h001-9	0.0194
h001-10	0.0209
h001-11	0.0170
h001-12	0.0124
h001-13	0.0096
h001-14	0.0112
h001-15	0.0178
h001-16	0.0111
h001-17	0.0161
h001-18	0.0191
h001-19	0.0204
h001-20	0.0170
h001-21	0.0119
h001-22	0.0111
h001-23	0.0125
h001-24	0.0170
Ch-001	0.0132

10

20

30

40

本データは、本発明のヒト化抗体がPCSK9-Yに対してより高い結合活性を有することを示す。

【試験 3】

【0072】

抗PCSK9抗体はLDLR-FC/PCSK9-Yの結合を阻害する

抗PCSK9抗体がLDLR-FC(配列番号:8)のPCSK9-Y(変異体PCSK9、配列番号:6)への結合を阻害する能力は、該抗体の存在下でLDLRに結合するPCSK9-Yの量を計測することにより測定した。

LDLR-FCをリン酸塩緩衝液で2 μ g/mlに希釈し、96ウェルのELISAプレート(Costar,

50

CAT#3590)にコーティングした後、4で終夜培養した。プレートを洗浄した後、37でトリス緩衝液(0.9 mM CaCl₂、0.05% Tween 20及び5% スキムミルクを含有する)で2時間ブロッキングした。次いでプレートを再度洗浄し、ビオチン標識PCSK9-Y(0.9 mM CaCl₂、0.05% Tween 20及び1% スキムミルクを含有するトリス緩衝液で最終濃度1 µg/mlに希釈したbio-PCSK9-Y)及び抗体試料(0.9 mM CaCl₂、0.05% Tween 20及び1% スキムミルクを含有するトリス緩衝液で希釈)の混合物を100 µl/ウェルで加え、37で1時間培養した。次いでプレートを再度洗浄し、西洋ワサビペルオキシダーゼ-ストレプトアビジン(Sigma, CAT#S2438)を添加し、37で1時間培養した。次いでプレートを洗浄し、現像のためにテトラメチルベンジジン溶液を添加した。最後に、停止溶液を添加し、OD450値をマイクロプレートリーダーで計測した後、IC50を計算した。LDLR-FC/PCSK9-Yの結合に対する本発明のキメラ抗体及び逆突然変異抗体の阻害効果の阻害試験の結果を表7に示す。

10

【表7】

PCSK9-YのLDLRへの結合に対するPCSK9抗体の阻害効果

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

20

30

40

データは、本発明のPCSK9抗体がPCSK9-YのLDLRへの結合を効率的に阻害できることを示す。

上記の方法で、本発明のPCSK9抗体は他のLDLR-FCのフォーマット(自家調製、配列番号:7または配列番号:9で示される配列)のPCSK9-Y(配列番号:5)への結合に対する阻害作用についても試験した。その結果、本発明のPCSK9抗体が、切断されたLDLRに対するPCSK9-Yの結合を効率的に阻害できることが示された。

【試験4】

【0073】

50

抗PCSK9抗体はLDLR-FC/PCSK9の結合を阻害する

本発明のPCSK9抗体がLDLR-FC（自家製、配列は配列番号：8に示す）のPCSK9（配列番号：5）への結合を阻害する能力は、該抗体の存在下でLDLRに結合するPCSK9の量を測定することにより検出した。

LDLR-FCをリン酸塩緩衝液で5 $\mu\text{g/ml}$ に希釈し、96ウェルのELISAプレートにコーティングした後、4 で終夜培養した。プレートを洗浄し、次いで37 でトリス緩衝液（0.9 mM CaCl_2 、0.05% Tween 20及び5%スキムミルクを含む）で2時間ブロッキングした。次いでプレートを再度洗浄し、ビオチン標識PCSK9（0.9 mM CaCl_2 、0.05% Tween 20及び1%スキムミルクを含有するトリス緩衝液で最終濃度2 $\mu\text{g/ml}$ に希釈したbio-WT-PCSK9）及び抗体試料（0.9 mM CaCl_2 、0.05% Tween 20及び1%スキムミルクを含有するトリス緩衝液で希釈）の混合物を100 μl /ウェルで添加し、37 で1時間培養した。次いでプレートを再度洗浄し、西洋ワサビペルオキシダーゼ-ストレプトアビジン(Sigma, CAT# S2438)を添加し、37 で1時間培養した。次いでプレートを洗浄し、現像のためにテトラメチルベンジジン溶液を添加した。最後に、停止溶液を添加し、OD450をマイクロプレートリーダーで計測した後、IC50を計算した。

LDLR-FC/PCSK9への結合に対する本発明のキメラ抗体及び逆突然変異抗体の阻害効果の阻害試験の結果を表8に示す。

【表8】

PCSK9 及び LDLR の結合に対する PCSK9 抗体の阻害効果

クローン番号	IC50 ($\mu\text{g/ml}$)
h001-1	0.4997
h001-2	0.6750
h001-3	0.7021
h001-4	0.7597
h001-5	4.322
h001-6	0.6620
h001-7	0.6521
h001-8	0.7738
h001-9	0.9230
h001-10	0.8290
Ch-001	0.8363

本データは、本発明のPCSK9抗体がPCSK9のLDLRへの結合を効率的に阻害できることを示す。

上記の方法で、本発明のPCSK9抗体は他のLDLR-FCのフォーマット（自家調製、配列番

号：7または配列番号：9で示される配列)のPCSK9(配列番号：5)への結合に対する阻害作用についても試験した。その結果、本発明のPCSK9抗体が、切断されたLDLRに対するPCSK9の結合を効率的に阻害できることが示された。

【試験5】

【0074】

LDL取込みに対するPCSK9抗体の効果

HepG2細胞(中国科学院細胞バンク、CAT#、TCHu72)をDMEM培地(Hyclone, CAT # SH30243.01B)(10%FBS, Gibco, CAT# 10099-141を含有する)中で培養した。細胞がプレートの80~90%を覆った際、細胞を吹き飛ばして温浸し、カウントし、1.5x10⁴細胞/ウェルで96ウェルプレートに蒔いた。24時間後、DMEM及びリポタンパク質を含まない10%血清(Millipore, CAT#LP4)で培地を交換した。48時間後、プレートをPBS緩衝液で2回洗浄し、次いで4で1時間プレ培養したPCSK9(配列番号：1、最終濃度10 µg/ml)及び抗体試料(培地で様々な濃度に希釈したもの)を含有する混合物及び最終濃度10 µg/mlのBODIPY-(登録商標)LDL(Invitrogen, CAT#L3483)を添加し、37で培養した。6時間後、プレートをPBS緩衝液で2回洗浄した。マイクロプレートリーダー(EX485 nm/EM535 nm)で蛍光値を読み取った後、50 µl/ウェルのCellTiter-Glo(登録商標)細胞活性発光検出試薬(Promega, G7571)を加え、化学発光値を読み取った。LDL取込みの結果を図3及び4に示したが、これは本発明のPCSK9抗体がHepG2細胞によりLDL取込みを促進できることを示している。

10

【試験6】

【0075】

PCSK9抗体親和性のためのBIAcoreアッセイ

ヒトFab捕獲キット(CAT#28-9583-25, GE)に記載の方法に従って、ヒトFab捕捉分子はCM5バイオチップ(CAT#BR-1000-12, GE)に共有結合し、試験抗体が親和性を獲得した。次に、ヒトPCSK9抗原(Hisタグを有するヒトPCSK9:PCSK9-His6、配列番号：1)をバイオチップの表面に流し、Biacore装置を用いて反応シグナルをリアルタイムで検出し、関連曲線及び解離曲線を得た。最後に、以下の表9に示すようにフィッティングし、親和性の値を得た。実験で各解離サイクルが終了した後、バイオチップを洗浄し、ヒトFab捕獲キット(GE)において再生溶液で再生した。

20

【表9】

30

PCSK9 抗体の親和性

静止期	移動相	親和性 KD(M)
h001-4-WT	huPCSK9	2.88E-10
h001-4-YTE		4.91E-10

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

40

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

【試験7】

【0076】

in vivoでのPCSK9抗体の薬力学試験

ヒトPCSK9過剰発現マウスモデルを構築し、マウスに尾静脈を介してPCSK9抗体を注射した。ヒトPCSK9過剰発現マウスにおけるin vivoでのLDL-cレベルの低下に対する本発明によるPCSK9抗体の効果を評価した。ヒトIgG(混合正常ヒト血清から、プロテインA等の伝統的アフィニティークロマトグラフィーによって精製されたヒト免疫グロブリン)を

50

ブランク対照として使用した。

C57Bl/6マウス (Shanghai Sippr-BK Laboratory Animal Co., Ltd.から購入) を実験室環境に5日間順応し、 4×10^{11} vgのAAV-PCSK9ウイルス(Benyuan Zhengyang Gene Technology Co. Ltd.)を尾静脈を介して注射した。ウイルス注射後、マウスを終夜絶食させた。翌日に眼瞼から血液を採取し、HDL及びLDL/VLDLコレステロール定量キット (BioVisionから購入、CAT # K613-100) でLDL-cを検出した。LDL-cの濃度に応じてマウスを無作為に群分し (6匹/群 (n=6))、尾静脈注射で抗体を投与した。自家調製のヒトIgG及びh001-4-WT抗体を10mg/kgの用量で投与した (ヒトIgG及びh001-4-WT抗体の調製はいずれもPBS中で行われ、濃度は1mg/mlであった)。採血の6時間前に絶食させた。投与24時間後、48時間後、72時間後及び96時間後に眼瞼から採血し、37

10

で1時間保温し、3500rpmで10分間遠心分離し、血清を-80 で保存した。最後の採血後、全ての凍結血清を同日に試験した。血清中のLDL-c濃度は、キットの取扱説明書に従ってHDL及びLDL/VLDLコレステロール定量キットで測定した。

図5に示すように、正常マウスの血清におけるLDL-c濃度が約12 mg/dlであることが結果で示された。AAV8-PCSK9ウイルスを注射した後、血清中LDL-cの平均濃度は40mg/dlであった。マウスを群分し、投薬した。表10及び図6に示すように、投与24時間後にh001-4-WT群のLDL-c濃度は、IgG群と比べ50%減少し；投与48時間後にh001-4-WT群のLDL-c濃度は49%減少し；投与72時間後にh001-4-WT群のLDL-c濃度は32%減少し；投与96時間後にh001-4-WT群のLDL-c濃度は20%減少した。

まとめとして、h001-4-WTはヒトPCSK9過剰発現マウスの血清におけるLDL-c濃度を低下させることができ、この効果は72時間持続した。

20

【表10】

マウスにおける LDL-c の血清濃度の変化

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

30

【試験8】

【0077】

競合実験

競合的ELISA実験では、プレートに1つの抗体で終夜コーティングした。次いでビオチン-PCSK9-hisとコーティング抗体の50倍濃度の競合抗体を共に加えた。コーティング抗体は競合抗体と競合して抗原に結合する。次いでプレートの抗原シグナルを測定した。その結果、h001-4と21B12 (US8030457B2) が抗原との結合に競合でき、2つの抗体の間に著しい競合結合はないことが示された。これは2つの抗体の抗原エピトープが異なることを示唆している。

40

50

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

【試験 9】

【0078】

in vivoでのカニクイザルマカクにおける薬力学試験及び薬物動態試験

本発明の抗体のin vivo効果及び代謝を調べるために、h001-4-WT及びh001-4-YTEをカニクイザルマカクにそれぞれin vivoで投与した。投与量は静脈内投与で3mg/kgであった。各群には3匹の雄カニクイザルマカクが含まれた。静脈注射の速度は約2~4mL/分であった。血清中のリポタンパク質、特に低密度リポタンパク質(LDL)の濃度及び抗体濃度を測定するために異なる時点で血液試料を採取した。リポタンパク質測定用の時点は、投与前及び投与後1、4、8、12、16、20、24及び28日であった。PK用の採血時点は、投与前及び投与後15分、30分、1時間、3時間、8時間、12時間、24時間、48時間、72時間、96時間、120時間、144時間、168時間、336時間、504時間及び672時間であった。

その結果(図7)、h001-4-WT及びh001-4-YTEとも、カニクイザルマカクにおけるLDLの量を有意に減少させることができ、h001-4-YTEによる減少の持続時間は、h001-4-WTによるものより優れていることが示された。

PKのために採取した血清試料中のh001-4-WT及びh001-4-YTEの量をELISA法(試験1に記載)で測定した。その結果、カニクイザルマカクにおけるh001-4-WTの半減期は4日間であり、カニクイザルマカクにおけるh001-4-YTEの半減期は7.3日間であることが示された。YTEはWTより著しく増加したin vivo半減期を有している。

10

20

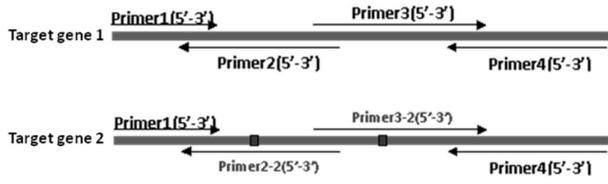
30

40

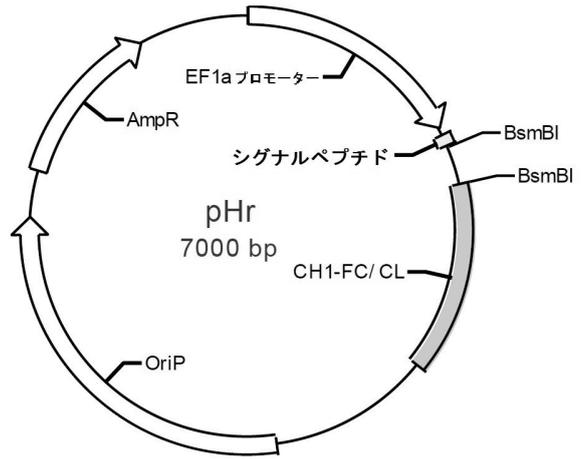
50

【 図面 】

【 図 1 】

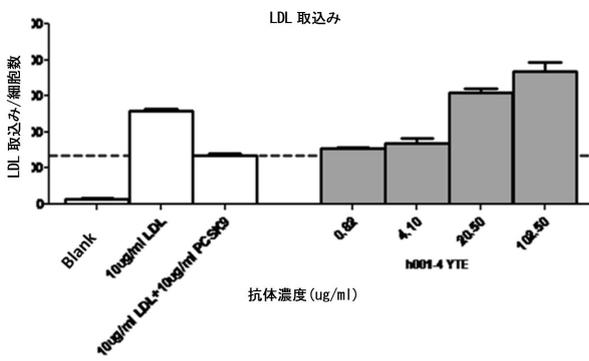


【 図 2 】

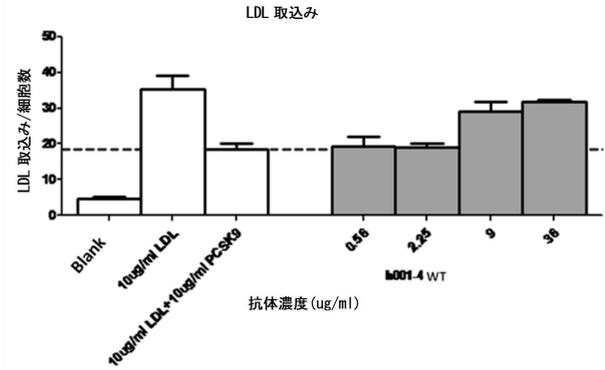


10

【 図 3 】



【 図 4 】



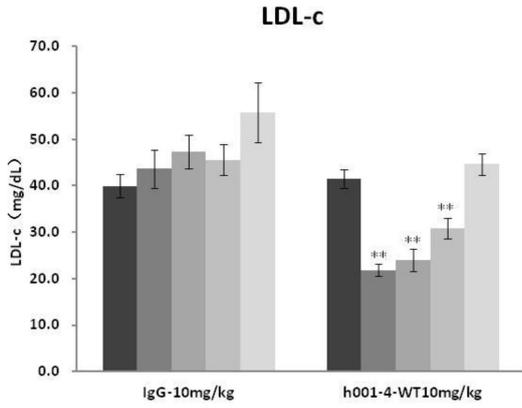
20

30

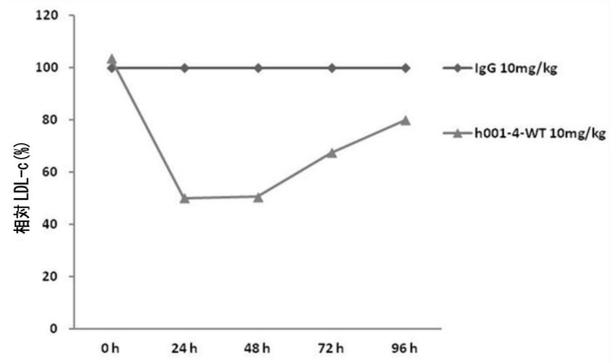
40

50

【 図 5 】

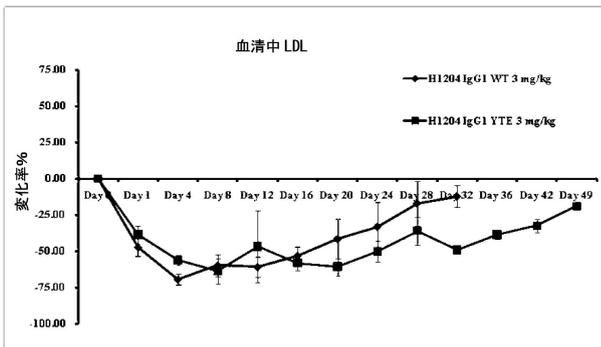


【 図 6 】



10

【 図 7 】



20

【 配列表 】

0007032662000001.app

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 1 2 N	15/63	(2006.01)	F I	C 1 2 N	15/63	Z
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	
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	D
A 6 1 P	43/00	(2006.01)		A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 P	3/06	(2006.01)		A 6 1 P	43/00	1 1 1
A 6 1 P	9/00	(2006.01)		A 6 1 P	3/06	
A 6 1 P	3/10	(2006.01)		A 6 1 P	9/00	
A 6 1 P	25/28	(2006.01)		A 6 1 P	3/10	
A 6 1 P	9/10	(2006.01)		A 6 1 P	25/28	
A 6 1 P	3/00	(2006.01)		A 6 1 P	9/10	1 0 1
C 1 2 P	21/08	(2006.01)		A 6 1 P	3/00	
				C 1 2 P	21/08	

T D .

中華人民共和国 シャンハイ, ミンシン・ディストリクト, ウェンジン・ロード No . 2 7 9

(74)代理人 100153394

弁理士 謝 卓峰

(74)代理人 100145056

弁理士 當別當 健司

(74)代理人 100116311

元山 忠行

(72)発明者 チュ、シアンドン

中華人民共和国 2 0 0 2 4 5 シャンハイ ミンハン・ディストリクト ウェンジン・ロード No . 2 7 9

(72)発明者 イエ、シン

中華人民共和国 2 0 0 2 4 5 シャンハイ ミンハン・ディストリクト ウェンジン・ロード No . 2 7 9

(72)発明者 シュ、シャオユ

中華人民共和国 2 0 0 2 4 5 シャンハイ ミンハン・ディストリクト ウェンジン・ロード No . 2 7 9

(72)発明者 ユエン、ベイ

中華人民共和国 2 0 0 2 4 5 シャンハイ ミンハン・ディストリクト ウェンジン・ロード No . 2 7 9

(72)発明者 ツェイ、ドンピン

中華人民共和国 2 0 0 2 4 5 シャンハイ ミンハン・ディストリクト ウェンジン・ロード No . 2 7 9

(72)発明者 フ、チーユエ

中華人民共和国 2 0 0 2 4 5 シャンハイ ミンハン・ディストリクト ウェンジン・ロード No . 2 7 9

(72)発明者 ジャン、レイ

中華人民共和国 2 0 0 2 4 5 シャンハイ ミンハン・ディストリクト ウェンジン・ロード No . 2 7 9

(72)発明者 シュ、ヅィピン

中華人民共和国 2 0 0 2 4 5 シャンハイ ミンハン・ディストリクト ウェンジン・ロード No . 2 7 9

(72)発明者 タオ、ウェイカン

中華人民共和国 2 0 0 2 4 5 シャンハイ ミンハン・ディストリクト ウェンジン・ロード No . 2 7 9

- (72)発明者 ジャン、リエンシャン
中華人民共和国 200245 シャンハイ ミンハン・ディストリクト ウェンジン・ロード No . 279
- (72)発明者 スン、ピアオヤン
中華人民共和国 222047 ジェンス リエンユンガン エコノミック・アンド・テクノロジーカル・ディベロップメント・ゾーン クンルンシャン ロード No . 7
- 審査官 松原 寛子
- (56)参考文献 特表2010-536384(JP,A)
特表2012-504388(JP,A)
特表2015-530867(JP,A)
特表2014-530188(JP,A)
国際公開第2015/200438(WO,A1)
特表2012-511913(JP,A)
特表2014-516953(JP,A)
薬学雑誌, 2015年01月, Vol.135, p.857-866
- (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
C07K 16/40
C07K 19/00
C07K 16/46
C12N 15/13
C12N 15/62
C12N 15/63
C12N 1/15
C12N 1/19
C12N 1/21
C12N 5/10
A61K 39/395
A61P 43/00
A61P 3/06
A61P 9/00
A61P 3/10
A61P 25/28
A61P 9/10
A61P 3/00
C12P 21/08
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
Caplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)