



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106084058 B

(45)授权公告日 2019.08.27

(21)申请号 201610540921.6

(22)申请日 2016.07.11

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 106084058 A

(43)申请公布日 2016.11.09

(66)本国优先权数据
201510415198.4 2015.07.15 CN

(73)专利权人 北京天广实生物技术股份有限公司

地址 101111 北京市大兴区经济技术开发区
科创十四街九十九号3号楼102室

(72)发明人 刘方杰 耿树生 李锋

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专
利商标事务所 11038

代理人 刘海罗

(51)Int.Cl.

C07K 16/40(2006.01)

C12N 15/13(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/573(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

A61P 7/02(2006.01)

A61P 9/10(2006.01)

A61P 3/06(2006.01)

(56)对比文件

CN 102245641 A,2011.11.16,

CN 104540852 A,2015.04.22,

CN 102652139 A,2012.08.29,

审查员 靳春鹏

权利要求书3页 说明书17页
序列表8页 附图5页

(54)发明名称

抗人PCSK9单克隆抗体

(57)摘要

本发明属于抗体领域,具体涉及抗人PCSK9单克隆抗体,以及所述抗体用于制备降低血液中的脂蛋白水平、预防或治疗心血管疾病或失调、血栓闭塞性疾病或失调的药物的用途。本发明的抗人PCSK9单克隆抗体亲和力更高,具有良好的应用前景。

1. 抗PCSK9抗体或其抗原结合部分,其中:
所述抗PCSK9抗体的重链可变区包含:氨基酸序列分别如SEQ ID NOs:1-3所示的V_H CDR1-V_H CDR3;
和
所述抗PCSK9抗体的轻链可变区包含:氨基酸序列分别如SEQ ID NOs:4-6所示的V_L CDR1-V_L CDR3。
2. 根据权利要求1所述的抗PCSK9抗体或其抗原结合部分,其重链可变区FR1、FR2、FR3、FR4区分别包含如SEQ ID NOs:7-10所示的序列;
和
其轻链可变区FR1、FR2、FR3、FR4区分别包含如SEQ ID NOs:11-14所示的序列。
3. 根据权利要求1-2中任一权利要求所述的抗PCSK9抗体或其抗原结合部分,其重链恒定区选自来源于人的IgG、IgM、IgE、IgD和IgA。
4. 根据权利要求3所述的抗PCSK9抗体或其抗原结合部分,其中,所述IgG为IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。
5. 根据权利要求1-2中任一权利要求所述的抗PCSK9抗体或其抗原结合部分,其轻链恒定区为来源于人的κ或λ。
6. 根据权利要求1-2中任一权利要求所述的抗PCSK9抗体或其抗原结合部分,其为全抗体、双特异性抗体、scFv、Fab、Fab'、F(ab')₂或Fv。
7. 根据权利要求1至2中任一权利要求所述的抗PCSK9抗体或其抗原结合部分,其中,所述的抗PCSK9抗体以小于10⁻⁵M的K_D结合PCSK9蛋白。
8. 根据权利要求1至2中任一权利要求所述的抗PCSK9抗体或其抗原结合部分,其中,所述的抗PCSK9抗体以小于10⁻⁶M的K_D结合PCSK9蛋白。
9. 根据权利要求1至2中任一权利要求所述的抗PCSK9抗体或其抗原结合部分,其中,所述的抗PCSK9抗体以小于10⁻⁷M的K_D结合PCSK9蛋白。
10. 根据权利要求1至2中任一权利要求所述的抗PCSK9抗体或其抗原结合部分,其中,所述的抗PCSK9抗体以小于10⁻⁸M的K_D结合PCSK9蛋白。
11. 根据权利要求1至2中任一权利要求所述的抗PCSK9抗体或其抗原结合部分,其中,所述的抗PCSK9抗体以10⁻⁹M数量级的K_D结合PCSK9蛋白。
12. 一种核酸分子,其含有编码权利要求1-11中任一权利要求所述的抗PCSK9抗体或其抗原结合部分。
13. 根据权利要求12所述的核酸分子,其中,所述核酸分子具有SEQ ID NO:17所示的核苷酸序列。
14. 根据权利要求12所述的核酸分子,其中,所述核酸分子具有SEQ ID NO:18所示的核苷酸序列。
15. 一种载体,其含有权利要求12至14中任一权利要求所述的核酸分子。
16. 一种宿主细胞,其含有权利要求12至14中任一权利要求所述的核酸分子或权利要求15所述的载体。
17. 一种偶联物,其包括抗体或其抗原结合片段以及偶联部分,其中,所述抗体为权利要求1至11中任一权利要求所述的抗PCSK9抗体或其抗原结合部分,所述偶联部分为可检测

的标记。

18. 根据权利要求17所述的偶联物,其中,所述偶联部分为放射性同位素、发光物质、有色物质或酶。

19. 根据权利要求17所述的偶联物,其中,所述偶联部分为荧光物质。

20. 一种试剂盒,其包括权利要求1至11中任一权利要求所述的抗PCSK9抗体或其抗原结合部分,或者包括权利要求17至19中任一权利要求所述的偶联物。

21. 根据权利要求20所述的试剂盒,其中,所述试剂盒还包括第二抗体,其特异性识别所述抗PCSK9抗体或其抗原结合部分。

22. 根据权利要求20所述的试剂盒,其中,所述第二抗体还包括可检测的标记。

23. 根据权利要求22所述的试剂盒,其中,所述可检测的标记为放射性同位素、发光物质、有色物质或酶。

24. 根据权利要求22所述的试剂盒,其中,所述可检测的标记为荧光物质。

25. 权利要求1至11中任一权利要求所述的抗PCSK9抗体或其抗原结合部分或者权利要求17至19中任一权利要求所述的偶联物在制备试剂盒中的用途,所述试剂盒用于检测PCSK9在样品中的存在或其水平。

26. 一种药物组合物,其含有权利要求1—11中任一权利要求所述的抗PCSK9抗体或其抗原结合部分或者权利要求17至19中任一权利要求所述的偶联物。

27. 根据权利要求26所述的药物组合物,其还包含药学上可接受的载体。

28. 根据权利要求26所述的药物组合物,其还包含药学上可接受的赋形剂。

29. 根据权利要求26至28中任一权利要求所述的药物组合物,其还含有他汀类药物。

30. 根据权利要求29所述的药物组合物,其中,所述他汀类药物选自西利维司汀、阿托伐他汀、辛伐他汀、匹伐他汀、瑞舒伐他汀、氟伐他汀、洛伐他汀和普伐他汀中的一种或者多种。

31. 权利要求1—11中任一权利要求所述的抗PCSK9抗体或其抗原结合部分或者权利要求17至19中任一权利要求所述的偶联物在制备预防或治疗心血管疾病或者血栓闭塞性疾病的药物中的用途。

32. 根据权利要求31所述的用途,其中所述的心血管疾病选自血脂异常、冠状动脉硬化性心脏病、急性心肌梗塞、无症状颈动脉粥样硬化、中风和外周动脉闭塞性疾病。

33. 根据权利要求32所述的用途,其中所述的血脂异常选自血液中的胆固醇升高、甘油三脂升高、低密度脂蛋白升高和高密度脂蛋白降低。

34. 根据权利要求32所述的用途,其中所述的血栓闭塞性疾病选自肺栓塞和视网膜中央静脉栓塞。

35. 权利要求1—11中任一权利要求的抗PCSK9抗体或其抗原结合部分或者权利要求17至19中任一权利要求所述的偶联物在制备降低血液中脂蛋白水平的药物中的用途。

36. 权利要求1—11中任一权利要求的抗PCSK9抗体或其抗原结合部分或者权利要求17至19中任一权利要求所述的偶联物在制备如下药物中的用途:

特异性与PCSK9结合的药物,

阻断PCSK9与LDL-R结合的药物,

提高细胞表面LDL-R数量或者血浆中LDL-R水平的药物,

降低血浆中LDL或LDL-c水平的药物，
抑制血浆中LDL积聚的药物，
抑制PCSK9所介导的LDL-R降解的药物，或者
提高LDL所携带胆固醇和/或TG的代谢水平的药物。

37. 一种在体外的方法，包括使用有效量的权利要求1—11中任一权利要求的抗PCSK9抗体或其抗原结合部分或者权利要求17至19中任一权利要求所述的偶联物的步骤，所述方法选自如下：

特异性与PCSK9结合的方法，
阻断PCSK9与LDL-R结合方法，
提高细胞表面LDL-R数量或者血浆中LDL-R水平的方法，
降低血浆中LDL或LDL-c水平的方法，
抑制血浆中LDL积聚的方法，
抑制PCSK9所介导的LDL-R降解的方法，或者
提高LDL所携带胆固醇和/或TG的代谢水平的方法。

抗人PCSK9单克隆抗体

技术领域

[0001] 本发明属于抗体领域,具体涉及抗人PCSK9单克隆抗体,以及所述抗体用于制备降低血液中的脂蛋白水平、预防或治疗心血管疾病或失调、血栓闭塞性疾病或失调的药物的用途。

背景技术

[0002] 前蛋白转化酶枯草杆菌蛋白酶/kexin9 (Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin type 9, PCSK9) 是一个属于丝氨酸蛋白酶K亚类的独特前蛋白转化酶。该前蛋白转化酶 (PCSK9) 基因定位于人类染色体1p32.3, 全长为29kb, 由12个外显子构成, 编码区约为2kb, 编码包含692个氨基酸残基的蛋白质。PCSK9主要由信号肽, 前结构域, 催化结构域, 和羧基末端结构域组成。PCSK9前体蛋白在内质网中合成一种可溶性酶原, 即PCSK9酶原 (apo-PCSK9, 74KD), 在内质网或高尔基体中apo-PCSK9 151-152残基处发生自动催化分裂释放前肽 (14KD) 形成成熟蛋白酶 (60KD) 并分泌到血液中。PCSK9主要在肝脏、小肠中表达, 但只在肝脏表达的PCSK9可分泌到血液中。

[0003] 血清低密度脂蛋白水平是衡量血脂水平的主要指标, LDL升高是动脉粥样硬化性心脏病的主要危险因素, 可诱发和促进动脉粥样硬化的发生发展。众多研究表明PCSK9可与细胞表面的低密度脂蛋白胆固醇受体 (low-density lipoprotein receptor, LDL-R) 结合并将其内化引导至溶酶体降解, 抑制其再循环到肝细胞表面, 从而减弱肝脏代谢血浆中低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-c) 的能力。流行病学研究发现, PCSK9基因不同部位碱基突变会导致两种截然不同的生物学效应, 一种是功能获得型突变, 另一种是功能缺失型突变。功能获得型突变会增强降解肝细胞LDLR的能力, 从而使得血液中的LDL-c清除减少, 导致高胆固醇血症的发生。功能缺失型突变会破坏PCSK9的正常功能, 导致肝细胞表面LDLR增多, 从而使得血液中LDL-c清除增加。研究表明, 这种因PCSK9基因功能缺陷而导致的低水平的血液LDL-c能显著的降低动脉粥样硬化以及冠心病的发病率。遗传学研究进一步发现在PCSK9蛋白完全缺失的人群中, 他们体内的低密度脂蛋白水平仅是普通人群的十分之一, 而这种情况并没有对他们的健康造成任何影响。这说明通过药物抑制PCSK9的功能应该不存在任何副作用。因此, 通过抑制PCSK9从而达到降低LDL-c的目的, 成为近些年研究的热点。

[0004] 在众多PCSK9抑制剂的研发中, 抗PCSK9单克隆抗体备受瞩目。目前多家大型国际制药公司都在积极开发针对huPCSK9的单抗药物, 其中Amgen的Evolocumab和赛诺菲/再生元的Alirocumab已完成了III期临床试验。III期临床数据显示, 跟标准疗法相比, 这两种抗体均能多降低61%的LDL-c, 一年降低50%心血管事件, 长期疗效看好。

[0005] 全人源抗体是治疗性抗体发展的主要方向, 噬菌体抗体库技术的出现为全人源抗体的制备提供了良好的技术平台。噬菌体抗体库技术采用PCR方法体外扩增人抗体VH和VL部分基因, 然后将VH和VL随机重组克隆至噬菌体展示载体上。呈现在噬菌体表面的抗体能够在体外与固相化的靶向抗原相互作用, 通过反复洗涤去除非特异性结合抗体, 然后洗脱并收集与抗原结合的噬菌体, 该噬菌体再次感染大肠杆菌, 使特异性的噬菌体得到富集。最

后通过DNA测序工作,获得与靶向抗原特异性结合的抗体序列。噬菌体抗体库技术模拟了体内免疫系统的选择作用和抗体亲和力成熟的过程,无需经过杂交瘤技术,甚至无需经过免疫过程即可获得特异性的和高亲和力的各种抗体分子片段,大大缩短了抗体的研发时间。

[0006] 本领域仍然缺乏具有更高亲和力的抗人PCSK9全人源抗体。

发明内容

[0007] 本发明先从naive噬菌体抗体库中快速地筛选出抗huPCSK9的单克隆抗体,然后应用构建小容量定点突变的全合成噬菌体抗体库的方法,在筛选出的抗体基础上对抗体的重链可变区CDR1,2,3区突变建库进行抗体的体外亲和力成熟,获得了高亲和力的抗体,由此完成了本发明。

[0008] 本发明的第一方面涉及抗PCSK9抗体或其抗原结合部分,其包括选自于如下一组的CDR区:

[0009] 重链可变区CDR1、CDR2、CDR3区分别包含如SEQ ID NO:1、2、3所示的序列,轻链可变区CDR1、CDR2、CDR3区分别包含如SEQ ID NO:4-6所示的序列;

[0010] 8D8F VH CDR1:SGFAFGGYAMN(SEQ ID NO:1)

[0011] 8D8F VH CDR2:TISGSGGSTN(SEQ ID NO:2)

[0012] 8D8F VH CDR3:AKDSNWGNFDL(SEQ ID NO:3)

[0013] 8D8F VL CDR1:KSSESVMYRRNARNFLG(SEQ ID NO:4)

[0014] 8D8F VL CDR2:WASTRESGVPDR(SEQ ID NO:5)

[0015] 8D8F VL CDR3:QQYYTHPYT(SEQ ID NO:6)

[0016] 在本发明的一个实施方案中,所述的抗PCSK9抗体或其抗原结合部分,其中:

[0017] 所述抗PCSK9抗体的重链可变区包含氨基酸序列为SEQ ID NO:1-3的CDR1-CDR3;

[0018] 和/或

[0019] 所述抗PCSK9抗体的轻链可变区包含氨基酸序列为SEQ ID NO:4-6的CDR1-CDR3。

[0020] 在本发明的一个实施方案中,所述抗体或其抗原结合部分的重链可变区FR1、FR2、FR3、FR4区分别包含如SEQ ID NO:7-10所示的序列,或者包含与上述序列的同一性大于70%,例如大于75%、80%、85%、90%、95%、99%的序列。

[0021] VH FR1:EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA(SEQ ID NO:7)

[0022] VH FR2:WVRQAPGKGLDWVS(SEQ ID NO:8)

[0023] VH FR3:

[0024] YADSVKGRFIIISRDKHTLYLQMNSLRAEDTAVYYC(SEQ ID NO:9)

[0025] VH FR4:WGRGTLVTVSS(SEQ ID NO:10)

[0026] 在本发明的一个实施方案中,所述抗体或其抗原结合部分的轻链可变区FR1、FR2、FR3、FR4区分别包含如SEQ ID NO:11-14所示的序列,或者包含与上述序列的同一性大于70%,例如大于75%、80%、85%、90%、95%、99%的序列。

[0027] VL FR1:DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC(SEQ ID NO:11)

[0028] VL FR2:WYQQKPGQPPNLLIY(SEQ ID NO:12)

[0029] VL FR3:FSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC (SEQ ID NO:13)

[0030] VL FR4:FGQGTKLEIK (SEQ ID NO:14)

[0031] 在本发明的一个具体实施方案中,所述抗体或其抗原结合部分的重链可变区的序列如SEQ ID NO:15所示。下划线部分为CDR序列。

[0032] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFGGYAMNWVRQAPGKGLDWVSTISGSGGSTNYADSVKGRF
IISRDSSKHTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDSNWGNFDLWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO:15)

[0033] 在本发明的一个具体实施方案中,所述抗体或其抗原结合部分的轻链可变区的序列如SEQ ID NO:16所示。下划线部分为CDR序列。

[0034] DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSESVMYRRNARNFLGWYQQKPGQPPNLLIYWASTRESGVPDRF
SGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYTHPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:16)

[0035] 在本发明的一个实施方案中,所述抗体或其抗原结合部分的重链恒定区来源于人。

[0036] 在本发明的一个实施方案中,所述抗体或其抗原结合部分的重链恒定区选自来源于人的IgG、IgM、IgE、IgD和IgA。

[0037] 在本发明的一个实施方案中,所述抗体或其抗原结合部分的轻链恒定区选自来源于人的IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。

[0038] 在本发明的一个具体实施方案中,所述抗体或其抗原结合部分的重链恒定区为来源于人的IgG1,所述IgG1重链恒定区的氨基酸序列例如如SEQ ID NO:19所示。

[0039] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:19)

[0040] 编码IgG1重链恒定区的核酸序列

**gctagcacca agggcccatc ggtettcccc ctggcaccct ctccaagag cacctctggg
 ggacacagegg cectgggctg cctgggtaag gactacttec ceagaaccggg gacgggtgctg
 tggaaactcag gcgcacctgac cageggcgctg cacaccttec cggtctgctt acagtctca
 ggacttactt cectcagcag cgtgggtgact gtgcctctta gcagcttggg caccagaccc
 tacatctgca acgtgaatca caagccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc
 aaatcttctg acaaaaactca cacatgccc cegtgcaccag cacctgaact cctggggggg
 cegtcagtct tectettccc cccaaaacce aaggacaccc teatgatctc cgggacctt
 gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgagggtcaa gtccaactgg
 tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcggggagga gcagtacaac
 agcacgtacc gtgtggctcag cgtctcacc gtctgcacc aggactgggt gaatggcaag
 gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aacctctcc
 aaagccaaag ggcagccccc agaaccacag gtgtacaccc tgcacctc cgggatgag
 ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc
 gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gctcctcctg
 ctggaactccg acggctctt ctctctctac agcaagctca cctgggacaa gacgaggtgg
 cagcagggga acgtctctc atgtctcctg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacag**

[0041] **cagaagagcc tctcctgtc tccgggt (SEQ ID NO: 20)**

[0042] 在本发明的一个实施方案中,所述抗体或其抗原结合部分的轻链恒定区来源于人。

[0043] 在本发明的一个实施方案中,所述抗体或其抗原结合部分的轻链恒定区为来源于人的 κ 或 λ 型。

[0044] 在本发明的一个具体实施方案中,所述抗体或其抗原结合部分的轻链恒定区为来源于人的 κ 型,所述 κ 型轻链恒定区的氨基酸序列例如如SEQ ID NO:21所示。

[0045] RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:21)

[0046] 编码 κ 型轻链恒定区的核酸序列:

[0047]

**cgtaecgggtg ctgcaccatc tgtcttctc ttcccgcct ctgatgagca gttgaaatct
 ggaactgcct ctgttctgtg cctgctgaat aactctctc ccagagagge caaagctacag
 tggaaaggtg ataacgcct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac
 agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc acctgacgc tgagcaaage agactacgag
 aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgc cgtcacaag
 agcttcaaca ggggagagtg t (SEQ ID NO: 22)**

[0048] 在本发明的一个实施方案中,所述抗体为全抗体、双特异性抗体、scFv、Fab、Fab'、

F(ab')₂或Fv。

[0050] 在本发明的一个实施方案中,所述抗体为人源抗体。

[0051] 在本发明的一个实施方案中,所述PCSK9为人PCSK9。

[0052] 在本发明的一个实施方案中,所述的抗PCSK9抗体或其抗原结合部分,其中,所述的抗PCSK9抗体以小于大约10⁻⁵M,例如小于大约10⁻⁶M、10⁻⁷M、10⁻⁸M、10⁻⁹M或10⁻¹⁰M或更小的K_D结合PCSK9蛋白。

[0053] 本发明还涉及核酸分子,其含有编码本发明第一方面任一项的抗PCSK9抗体或其抗原结合部分或其片段的序列;优选地,所述核酸分子具有SEQ ID NO:17所示的核苷酸序列和/或SEQ ID NO:18所示的核苷酸序列。

[0054] 在本发明的一个实施方案中,所述核酸分子含有编码本发明第一方面任一项的抗PCSK9抗体或其抗原结合部分的重链可变区的CDR区(例如CDR1、CDR2、CDR3)序列。

[0055] 在本发明的一个实施方案中,所述核酸分子含有编码本发明第一方面任一项的抗PCSK9抗体或其抗原结合部分的轻链可变区的CDR区(例如CDR1、CDR2、CDR3)序列。

[0056] 在本发明的一个实施方案中,所述核酸分子含有编码本发明第一方面任一项的抗PCSK9抗体的重链可变区的序列。在本发明的具体实施方案中,所述核酸分子含有如SEQ ID NO:17所示的序列。

[0057]

**gaggtgcagc tgggtggagag cgggtggtggc ctggtgcagc cgggceggcag cctgcgtctg
agctgcgccg ccageggctt cgetttcggc ggtaacgcta tgaactgggt gcgccaggcc
cctggcaagg gcctggactg ggtgagcacc attagecgta gcggtggcag caccaactac
gccgacagcg tgaagggccg ttctatcacc agcccgacaca gcagcaagca caccctgtac
ctgcagatga acagcctgcg tgccgaggac accgacctgt actactgcgc caaggacagc
aactggggca acttcgacct gtggggccgc ggcacctgg tgacctgag cagc (SEQ ID
NO: 17)**

[0058] 在本发明的一个实施方案中,所述核酸分子含有编码本发明第一方面任一项的抗PCSK9抗体的轻链可变区的序列。在本发明的具体实施方案中,所述核酸分子含有如SEQ ID NO:18所示的序列。

[0059]

**gacatcgtga tgaccagag cccggacagc ctggcctga gcctgggcca gcgcgccacc
atcaactgca agagcagcga aagegtgatg taccgtcgca acgctcgcaa cttctgggc
tggtaccagc agaagcctgg ccagcctcct aacctgctga tctactgggc cagcaccctg
gagagcgccg tgctgaccg cttctctggt ageggtctg gcaccgaact caccctgacc
atcagcagcc tgcaggccga ggacgtggcc gtgtactact gccagcagta ctacaccac
ccttacacct teggccaggc caccaagctg gagatcaag (SEQ ID NO: 18)**

[0060] 本发明还涉及载体,其含有本发明任一项的核酸分子。

[0061] 本发明还涉及宿主细胞,其含有本发明任一项的核酸分子或载体。

[0062] 本发明的再一方面涉及一种偶联物,其包括抗体或其抗原结合片段以及偶联部分,其中,所述抗体为本发明任一项所述的抗PCSK9抗体或其抗原结合部分,所述偶联部分为可检测的标记;优选地,所述偶联部分为放射性同位素、荧光物质、发光物质、有色物质或酶。

[0063] 本发明的再一方面涉及一种试剂盒,其包括本发明中任一项所述的抗PCSK9抗体或其抗原结合部分,或者包括本发明的偶联物;

[0064] 优选地,所述试剂盒还包括第二抗体,其特异性识别所述抗PCSK9抗体或其抗原结合部分;任选地,所述第二抗体还包括可检测的标记,例如放射性同位素、荧光物质、发光物质、有色物质或酶。

[0065] 本发明的再一方面涉及本发明任一项所述的抗PCSK9抗体或其抗原结合部分或者本发明的偶联物在制备试剂盒中的用途,所述试剂盒用于检测PCSK9在样品中的存在或其水平。

[0066] 本发明还涉及组合物(例如药物组合物),其含有本发明第一方面任一项的抗PCSK9抗体或其抗原结合部分、本发明任一项的核酸分子、载体或者宿主细胞,以及任选的药学上可接受的载体或赋形剂。

[0067] 在本发明的实施方案中,所述组合物中还含有他汀类药物。

[0068] 在本发明的实施方案中,所述他汀类药物例如选自西利维司汀、阿托伐他汀、辛伐他汀、匹伐他汀、瑞舒伐他汀、氟伐他汀、洛伐他汀和普伐他汀。

[0069] 本发明还涉及本发明第一方面任一项的抗PCSK9抗体或其抗原结合部分、本发明任一项的核酸分子、载体、宿主细胞或者组合物在制备预防或治疗心血管疾病或失调、血栓闭塞性疾病或失调的药物的用途。

[0070] 在本发明的一个实施方案中,其中所述的心血管疾病或失调选自血脂异常、冠状动脉粥样硬化性心脏病、急性心肌梗塞、无症状颈动脉粥样硬化、中风和外周动脉闭塞性疾病。

[0071] 在本发明的一个实施方案中,其中所述的血脂异常选自血液中的胆固醇升高、甘油三酯升高、低密度脂蛋白(LDL)升高和高密度脂蛋白(HDL)降低。在本发明的一个具体实施方案中,所述的血脂异常是指高胆固醇血症。

[0072] 在本发明的一个实施方案中,其中所述的血栓闭塞性疾病或失调选自肺栓塞和视网膜中央静脉栓塞。

[0073] 本发明还涉及本发明第一方面任一项的抗PCSK9抗体或其抗原结合部分、本发明任一项的核酸分子、载体、宿主细胞或者组合物在制备降低血液中脂蛋白水平的药物的用途。

[0074] 在本发明的实施方案中,所述脂蛋白选自胆固醇、甘油三酯和低密度脂蛋白。

[0075] 本发明的再一方面涉及本发明任一项所述的抗PCSK9抗体或其抗原结合部分、本发明的核酸分子、本发明的载体、本发明的宿主细胞、本发明的偶联物或者本发明的组合物在制备如下药物中的用途:

[0076] 特异性与PCSK9结合的药物,

[0077] 阻断PCSK9与LDL-R结合的药物,

- [0078] 提高细胞表面LDL-R数量或者血浆中LDL-R水平的药物，
- [0079] 降低血浆中LDL或LDL-c水平的药物，
- [0080] 抑制血浆中LDL积聚的药物，
- [0081] 抑制PCSK9所介导的LDL-R降解的药物，或者
- [0082] 提高LDL所携带胆固醇和/或TG的代谢水平的药物。
- [0083] 本发明的再一方面涉及一种在体内或体外的方法，包括使用有效量的本发明任一项所述的抗PCSK9抗体或其抗原结合部分、本发明的核酸分子、本发明的载体、本发明的宿主细胞、本发明的偶联物或者本发明的组合物的步骤，所述方法选自如下：
- [0084] 特异性与PCSK9结合的方法，
- [0085] 阻断PCSK9与LDL-R结合方法，
- [0086] 提高细胞表面LDL-R数量或者血浆中LDL-R水平的方法，
- [0087] 降低血浆中LDL或LDL-c水平的方法，
- [0088] 抑制血浆中LDL积聚的方法，
- [0089] 抑制PCSK9所介导的LDL-R降解的方法，或者
- [0090] 提高LDL所携带胆固醇和/或TG的代谢水平的方法。
- [0091] 本发明还涉及预防或治疗心血管疾病或失调、血栓闭塞性疾病或失调的方法，所述方法包括给有需要的受试者预防或治疗有效量的本发明第一方面任一项的抗PCSK9抗体或其抗原结合部分、本发明任一项的核酸分子、载体、宿主细胞、或者组合物的步骤。
- [0092] 在本发明的一个实施方案中，其中所述的心血管疾病或失调选自血脂异常、冠状动脉粥样硬化性心脏病、急性心肌梗塞、无症状颈动脉粥样硬化、中风和外周动脉闭塞性疾病。
- [0093] 在本发明的一个实施方案中，其中所述的血脂异常选自血液中的胆固醇升高、甘油三脂升高、低密度脂蛋白 (LDL) 升高和高密度脂蛋白 (HDL) 降低。在本发明的一个具体实施方案中，所述的血脂异常是指高胆固醇血症。
- [0094] 在本发明的一个实施方案中，其中所述的血栓闭塞性疾病或失调选自肺栓塞和视网膜中央静脉栓塞。
- [0095] 本发明还涉及降低血中脂蛋白水平的方法，所述方法包括给有需要的受试者预防或治疗有效量的本发明第一方面任一项的抗PCSK9抗体或其抗原结合部分、本发明任一项的核酸分子、载体、宿主细胞或者组合物的步骤。
- [0096] 在本发明的实施方案中，所述脂蛋白选自胆固醇、甘油三脂和低密度脂蛋白。
- [0097] 本发明从噬菌体抗体库和小容量定点突变的噬菌体抗体库中筛选获得了高亲和力的抗PCSK9抗体。实验证明，本发明的抗PCSK9抗体与现有的抗体相比，具有更高的亲和力和能更有效的降低高脂血症恒河猴体内LDL-c，具有良好的应用前景。
- [0098] 以下对本发明做进一步描述：
- [0099] 在本发明中，除非另有说明，否则本文中使用的科学和技术名词具有本领域技术人员所通常理解的含义。并且，本文中所用的蛋白质和核酸化学、分子生物学、细胞和组织培养、微生物学、免疫学相关术语和实验室操作步骤均为相应领域内广泛使用的术语和常规步骤。同时，为了更好地理解本发明，下面提供相关术语的定义和解释。
- [0100] 在本发明中，当提及PCSK9蛋白 (Proprotein convertase subtilisin/kexin

type 9)的氨基酸序列时,其包括PCSK9蛋白的全长(例如人源NP_777596.21、鼠源NP_705793.1或猴源NP_001106130.1);还包括其融合蛋白,例如与小鼠或人IgG的Fc蛋白片段(mFc或hFc)进行融合片段。然而,本领域技术人员理解,在PCSK9蛋白的氨基酸序列中,可天然产生或人工引入突变或变异(包括但不限于置换,缺失和/或添加),而不影响其生物学功能。

[0101] 在本发明中,术语EC₅₀是指半最大效应浓度(concentration for 50% of maximal effect),是指能引起50%最大效应的浓度。

[0102] 在本发明中,术语“抗体”是指通常由两对相同的多肽链(每对具有一条“轻”(L)链和一条“重”(H)链)组成的免疫球蛋白分子。抗体轻链可分类为κ和λ轻链。重链可分类为μ、δ、γ、α或ε,并且分别将抗体的同种型定义为IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。在轻链和重链内,可变区和恒定区通过大约12或更多个氨基酸的“J”区连接,重链还包含大约3个或更多个氨基酸的“D”区。各重链由重链可变区(V_H)和重链恒定区(C_H)组成。重链恒定区由3个结构域(C_{H1}、C_{H2}和C_{H3})组成。各轻链由轻链可变区(V_L)和轻链恒定区(C_L)组成。轻链恒定区由一个结构域C_L组成。抗体的恒定区可介导免疫球蛋白与宿主组织或因子,包括免疫系统的各种细胞(例如,效应细胞)和经典补体系统的第一组分(C1q)的结合。V_H和V_L区还可被细分为具有高变性的区域(称为互补决定区(CDR)),其间散布有较保守的称为构架区(FR)的区域。各V_H和V_L由按下列顺序:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4从氨基末端至羧基末端排列的3个CDR和4个FR组成。各重链/轻链对的可变区(V_H和V_L)分别形成抗体结合部位。氨基酸至各区域或结构域的分配遵循Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991)),或Chothia & Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia等人(1989) Nature 342:878-883的定义。术语“抗体”不受任何特定的产生抗体的方法限制。例如,其包括,特别地,重组抗体、单克隆抗体和多克隆抗体。抗体可以是不同同种型的抗体,例如,IgG(例如,IgG1, IgG2, IgG3或IgG4亚型), IgA1, IgA2, IgD, IgE或IgM抗体。

[0103] 在本发明中,术语抗体的“抗原结合部分”是指全长抗体的一个或多个部分,所述部分保持结合抗体所结合的共同抗原(例如,PCSK9)的能力,与完整抗体竞争对抗原的特异性结合。通常参见, Fundamental Immunology, Ch. 7 (Paul, W., ed., 第2版, Raven Press, N.Y. (1989)), 其以其全文通过引用合并入本文,用于所有目的。可通过重组DNA技术或通过完整抗体的酶促或化学断裂产生抗原结合部分。在一些情况下,抗原结合部分包括Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、dAb和互补决定区(CDR)片段、单链抗体(例如, scFv)、嵌合抗体、双抗体(diabody)和这样的多肽,其包含足以赋予多肽特异性抗原结合能力的抗体的至少一部分。

[0104] 在本发明中,术语“Fd片段”意指由V_H和C_{H1}结构域组成的抗体片段;术语“Fv片段”意指由抗体的单臂的V_L和V_H结构域组成的抗体片段;术语“dAb片段”意指由V_H结构域组成的抗体片段(Ward等人, Nature 341:544-546 (1989));术语“Fab片段”意指由V_L、V_H、C_L和C_{H1}结构域组成的抗体片段;术语“F(ab')₂片段”意指包含通过铰链区上的二硫桥连接的两个Fab片段的抗体片段。

[0105] 在一些情况下,抗体的抗原结合部分是单链抗体(例如, scFv),其中V_L和V_H结构域通过使其能够产生为单个多肽链的连接体配对形成单价分子(参见,例如, Bird等人,

Science 242:423-426 (1988) 和Huston等人, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883 (1988)。此类scFv分子可具有一般结构: $\text{NH}_2\text{-V}_L\text{-接头-V}_H\text{-COOH}$ 或 $\text{NH}_2\text{-V}_H\text{-接头-V}_L\text{-COOH}$ 。合适的现有技术接头(连接肽)由重复的GGGGS氨基酸序列或其变体组成。例如,可使用具有氨基酸序列(GGGGS)₄的接头,但也可使用其变体(Holliger等人(1993), Proc.Natl.Acad.Sci.USA90:6444-6448)。可用于本发明的其他接头由Alfthan等人(1995), Protein Eng.8:725-731, Choi等人(2001), Eur.J.Immunol.31:94-106, Hu等人(1996), Cancer Res.56:3055-3061, Kipriyanov等人(1999), J.Mol.Biol.293:41-56和Roovers等人(2001), Cancer Immunol.描述。在本发明的实施方案中,所述连接肽的序列为(GGGGS)₃。

[0106] 在一些情况下,抗体是双特异性抗体,其能够分别和两种抗原或抗原表位结合,其包括特异性结合第一抗原的抗体的轻链、重链或其抗原结合部分,以及特异性结合第二抗原的抗体的轻链、重链或其抗原结合部分。在本发明的实施方案中,所述双特异性抗体中结合第一抗原的抗体的轻链、重链或其抗原结合部分可以为本发明任一项的抗体或其抗原结合部分,所述特异性结合第二抗原的抗体的轻链、重链或其抗原结合部分可以为其它抗PCSK9抗体或其抗原结合部分或者针对其它抗原的抗体或其抗原结合部分。

[0107] 在一些情况下,抗体是双抗体,即,双价抗体,其中V_H和V_L结构域在单个多肽链上表达,但使用太短的连接体以致不允许在相同链的两个结构域之间配对,从而迫使结构域与另一条链的互补结构域配对并且产生两个抗原结合部位(参见,例如,Holliger P.等人, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448 (1993), 和Poljak R.J.等人, Structure 2:1121-1123 (1994))。

[0108] 可使用本领域技术人员已知的常规技术(例如,重组DNA技术或酶促或化学断裂法)从给定的抗体(例如单克隆抗体2E12)获得抗体的抗原结合部分(例如,上述抗体片段),并且以与对于完整抗体的方式相同的方式就特异性筛选抗体的抗原结合部分。

[0109] 在本发明中,所述抗原结合部分包括单链抗体(scFv)、嵌合抗体、双抗体、scFv-Fc二价分子、dAb和互补决定区(CDR)片段、Fab片段、Fd片段、Fab'片段、Fv和F(ab')₂片段。

[0110] 在本发明中,所述IgG1重链恒定区包括各种同种异型,如G1m(f)、G1m(z)、G1m(z, a)或G1m(z, a, x)。在本发明的实施方案中,所述IgG1重链恒定区为G1m(f)型。

[0111] 在本发明中,所述κ轻链恒定区包括各种同种异型,如Km1、Km1,2或Km3。在本发明的实施方案中,所述κ轻链恒定区为Km3型。

[0112] 在本发明中,所述λ轻链恒定区包括各种同种异型,如λI、λII、λIII、λVI。在本发明的实施方案中,所述λ轻链恒定区为λII型。

[0113] 本发明涉及的抗体核酸分子也可以利用传统的基因工程重组技术或化学合成方法获得。一方面,本发明涉及的抗体核酸分子的序列包含了抗PCSK9抗体的重链可变区或抗体分子的部分核酸序列。另一方面,本发明涉及的抗体核酸分子的序列也包括抗PCSK9抗体的轻链可变区或抗体分子的部分核酸序列。另一方面,本发明涉及的抗体核酸分子的序列还包括重链或轻链可变区的CDR序列。互补决定区(complementary determinant region, CDR)是与抗原表位结合的部位,本发明中的CDR序列通过IMGT/V-QUEST(<http://imgt.cines.fr/textes/vquest/>)进行确定。但是不同的划分方法得到的CDR序列稍有不同。

[0114] 本发明涉及含有所述核酸分子的重组表达载体,也涉及转化了这些分子的宿主细胞。而且,本发明还涉及利用包含了所述核酸分子的宿主细胞在特定条件下培养并分离得到发明所述抗体的方法。

[0115] 抗体氨基酸序列

[0116] 抗体8D8F重链可变区氨基酸序列分别是SEQ ID NO:15。抗体8D8F轻链可变区氨基酸序列是SEQ ID NO:16。

[0117] 抗体8D8F的重链和轻链可变区的CDR的氨基酸序列确定如下:

[0118] 抗体8D8F重链的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列分别为SEQ ID NO:1-3。

[0119] 抗体8D8F轻链的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列分别为SEQ ID NO:4-6。

[0120] 抗体8D8F的重链和轻链可变区的FR的氨基酸序列确定如下:

[0121] 抗体8D8F重链可变区FR1、FR2、FR3、FR4的序列分别为SEQ ID NO:7-10。轻链可变区FR1、FR2、FR3、FR4的序列分别为SEQ ID NO:11-14。

[0122] 另一方面,抗PCSK9抗体的重链或轻链可变区FR的氨基酸序列可能是在SEQ ID NO:7-10、11-14上出现一个或多个氨基酸的突变、增添或缺失。优选的是,突变、添加或缺失的氨基酸不超过3个氨基酸。更优选的是,突变、添加或缺失的氨基酸不超过2个氨基酸。最优选的是,突变、添加或缺失的氨基酸不超过1个氨基酸。

[0123] 上述抗体或CDR区或框架区的氨基酸发生突变、添加或缺失之后的变体仍然保留特异性结合人PCSK9的能力。本发明也包含这样的抗原结合部分的变体。

[0124] 本发明的单抗变体可以通过传统的基因工程方法获得。本领域的技术人员完全知晓利用核酸突变改造DNA分子的方法。另外,编码重链和轻链变体的核酸分子也可以通过化学合成获得。

[0125] 在本发明中,用于确定序列同一性和序列相似性百分数的算法是例如BLAST和BLAST 2.0算法,它们分别描述在Altschul等(1977) Nucl. Acid. Res. 25:3389-3402和Altschul等(1990) J. Mol. Biol. 215:403-410。采用例如文献中所述或者默认参数,BLAST和BLAST 2.0可以用于确定本发明的氨基酸序列同一性百分数。执行BLAST分析的软件可以通过国立生物技术信息中心为公众所获得。

[0126] 在本发明中,所述与氨基酸序列具有至少70%的序列同一性的氨基酸序列包括与所述氨基酸序列基本同一的多肽序列,例如当采用本文所述方法(例如采用标准参数的BLAST分析)时,与本发明多肽序列相比含有至少70%序列同一性、优选至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的序列同一性的那些序列。

[0127] 在本发明中,术语“载体”指的是,可将编码某蛋白的多聚核苷酸插入其中并使蛋白获得表达的一种核酸运载工具。载体可通过转化、转导或转染宿主细胞,使其携带的遗传物质元件在宿主细胞内表达得以表达。举例来说,载体包括:质粒;噬菌粒;柯斯质粒;人工染色体如酵母人工染色体(YAC)、细菌人工染色体(BAC)或P1来源的人工染色体(PAC);噬菌体如 λ 噬菌体或M13噬菌体及动物病毒等。用作载体的动物病毒种类有逆转录酶病毒(包括慢病毒)、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒(如单纯疱疹病毒)、痘病毒、杆状病毒、乳头瘤病毒、乳头多瘤空泡病毒(如SV40)。一种载体可能含有多种控制表达的元件,包括启动子序列、转录起始序列、增强子序列、选择元件及报告基因。另外,载体还可含有复制起始位点。

载体还有可能包括有协助其进入细胞的成分,如病毒颗粒、脂质体或蛋白外壳,但不仅仅只有这些物质。

[0128] 在本发明中,术语“宿主细胞”指的是导入载体的细胞,包括如下许多细胞类型,如大肠杆菌或枯草菌等原核细胞,如酵母细胞或曲霉菌等真菌细胞,如S2果蝇细胞或Sf9等昆虫细胞,或者如纤维原细胞,CHO细胞,COS细胞,NSO细胞,HeLa细胞,BHK细胞,HEK 293细胞或人细胞的动物细胞。

[0129] 本发明的抗体片段可以利用水解完整的抗体分子获得(参见Morimoto et al., J.Biochem.Biophys.Methods 24:107-117(1992) and Brennan et al., Science 229:81(1985))。另外,这些抗体片段也可以直接由重组宿主细胞产生(reviewed in Hudson, Curr.Opin.Immunol.11:548-557(1999); Little et al., Immunol.Today, 21:364-370(2000))。比如,Fab'片段可以直接从E.coli细胞中获得或化学耦联形成F(ab')₂片段(Carter et al., Bio/Technology, 10:163-167(1992))。再如,F(ab')₂片段可以用亮氨酸拉链GCN4连接获得。另外,Fv、Fab或F(ab')₂片段也可以直接从重组宿主细胞培养液中直接分离得到。本领域的普通技术人员完全知晓制备抗体片段的其它技术。

[0130] 在本发明中,“特异性结合”指的是,指两分子间的非随机结合反应,如抗体和产生该抗体的抗原间的反应。此处,结合第一种抗原的抗体对第二种抗原的结合亲和力是检测不到或很弱。在某些实施方式中,一个某抗原特异性抗体是指以亲和力(K_D) $\leq 10^{-5}M$ (如 $10^{-6}M$ 、 $10^{-7}M$ 、 $10^{-8}M$ 、 $10^{-9}M$ 、 $10^{-10}M$ 等)结合该抗原,其中 K_D 指解离率与结合率的比值(k_{off}/k_{on}),其可以采用本领域技术人员熟悉的方法进行测定。

[0131] 在本发明中,术语“ K_D ”是指特定抗体-抗原相互作用的解离平衡常数,其用于描述抗体与抗原之间的结合亲和力。平衡解离常数越小,抗体-抗原结合越紧密,抗体与抗原之间的亲和力越高。通常,抗体以小于大约 $10^{-5}M$,例如小于大约 $10^{-6}M$ 、 $10^{-7}M$ 、 $10^{-8}M$ 、 $10^{-9}M$ 或 $10^{-10}M$ 或更小的解离平衡常数(K_D)结合抗原。例如,可以使用表面等离子体共振术(SPR)在BIACORE仪中测定 K_D 。

[0132] 在本发明的实施方案中,本发明的抗PCSK9抗体能够特异性地与人PCSK9蛋白结合。

[0133] 在本发明中,术语“有效量”是指足以获得或至少部分获得期望的效果的量。例如,预防疾病有效量是指,足以预防,阻止,或延迟疾病的发生的量;治疗疾病有效量是指,足以治愈或至少部分阻止已患有疾病的患者的疾病和其并发症的量。测定这样的有效量完全在本领域技术人员的能力范围之内。例如,对于治疗用途有效的量将取决于待治疗的疾病的严重程度、患者自己的免疫系统的总体状态、患者的一般情况例如年龄,体重和性别,药物的施用方式,以及同时施用的其他治疗等等。

[0134] 在本发明的实施方案中,本发明的抗PCSK9抗体能够抑制huPCSK9与EGFA的结合。

[0135] 在本发明中,所述血液包括全血、血清、血浆等,各种血液样品的处理和制备方法为本领域所公知。

[0136] 在本发明中,所述高胆固醇血症包括家族性高胆固醇血症和非家族性高胆固醇血症。

[0137] 在本发明中,所述血脂异常是指与正常人群相比,血清中的胆固醇、甘油三脂、低密度脂蛋白中的一种或多种升高,和/或血清中的高密度脂蛋白降低。

[0138] 在本发明中,20种常规氨基酸和其缩写遵从常规用法。参见Immunology—A Synthesis (第2版,E.S.Golub和D.R.Gren,Eds.,Sinauer Associates,Sunderland,Mass.(1991)),其通过引用合并入本文。

[0139] 在本发明的实施方案中,采用噬菌体抗体库技术筛选到一株抗PCSK9单克隆抗体。跟现有抗PCSK9抗体相比,这一株抗体的亲和力更高,更能有效的降低高血脂猴子体内的LDL-c水平,因此预计它们将会有更好的疗效,并且能降低药物的有效剂量,从而进一步降低药物的毒副作用。而且,高亲和力的抗体在高浓度液体制剂的稳定性和成药性方面具有一定的优势。

附图说明

[0140] 图1:单克隆phage ELISA鉴定phage—Abs的相对亲和力。

[0141] 其中每组柱形图中从左至右依次为待测抗体、阳性对照(抗体mi166)和阴性对照(BSA)。

[0142] 图2:梯度稀释phage ELISA鉴定phage—Abs的相对亲和力。

[0143] 图3:pTGS—1质粒图谱。

[0144] 图4:PCR扩增8D—CDR1,2M—Vkappa DNA片段全长(其中DNA marker为Marker III (TIANGEN,MD103)),全长约为763bp。

[0145] 图5:梯度稀释phage ELISA鉴定phage—Abs的相对亲和力。

[0146] 图6:Mi166和8D8F与PCSK9的结合实验。

[0147] 图7:Mi166和8D8F与PCSK9竞争抑制实验。

[0148] 图8:Mi166和8D8F对LDL吸收的细胞生物学活性。

[0149] 图9:Mi166,Mi168-4抗体对LDL-c的调节作用。

[0150] 图10:Mi166,Mi168-4抗体对LDL-c的调节作用(下降百分比)。

[0151] 图11:Mi166,Mi168-4抗体对TC的调节作用。

[0152] 图12:Mi166,Mi168-4抗体对TC的调节作用(下降百分比)。

具体实施方式

[0153] 下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述。本领域技术人员将会理解,下面的实施例仅用于说明本发明,而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体技术或条件者,按照本领域内的文献所描述的技术或条件(例如参考J. 萨姆布鲁克等著,黄培堂等译的《分子克隆实验指南》,第三版,科学出版社)或按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,为可以通过市场购买获得的常规产品。

[0154] 实施例1:抗huPCSK9单链抗体的生物淘选

[0155] 以huPCSK9-his (NP_777596.2)为抗原包被免疫管,抗原包被量为5 μ g/管,4 $^{\circ}$ C包被过夜。采用4%的脱脂奶粉/PBST分别封闭免疫管和naive噬菌体抗体库(实验室自己制备),37 $^{\circ}$ C封闭1h。封闭后的噬菌体抗体库加入免疫管中进行抗体抗原结合,噬菌体的投入量约为 10^{12} ,37 $^{\circ}$ C反应1h。PBS (T)洗去未结合的噬菌体,0.1M的HCL—Glycine洗脱抗体,用1.5M的Tris—HCL (pH8.8)中和洗脱下来的噬菌体。

[0156] 取550 μ l中和后的噬菌体感染约10mL生长至对数生长期的TG1菌液,37 $^{\circ}$ C静置

30min。加入9mL含氨苄的2YT培养基。取出适量菌液铺板测定cfu,其余细菌37℃培养3h,扩大体积到50mL,加入2mL辅助病毒VCSM13 ($\text{pfu}=1 \times 10^{13}$),30℃振荡培养过夜。次日回收上清,常规PEG沉淀,所得次级噬菌体抗体库可进行下一轮的筛选。

[0157] 实施例2:抗huPCSK9单链抗体阳性克隆的筛选

[0158] 挑取经过三轮筛选后产出的分隔良好的单克隆菌落,接种1mL 2YTAG (Ampicilline:100 $\mu\text{g}/\text{ml}$,Glucose:2%)培养基中,37℃,220rpm培养过夜。第二天转接至新的96孔深孔板,培养至其对数生长期,每孔加入约 10^{10} 的辅助噬菌体VCSM13。37℃静止感染30min后,4000rpm,4℃离心15min,弃去上清,菌体用2YTAK (Ampicilline:100 $\mu\text{g}/\text{ml}$,kanamycin:70 $\mu\text{g}/\text{ml}$)重悬沉淀,28℃,220rpm培养过夜。吸取扩增后的噬菌体上清进行ELISA鉴定(参见图1)。对获得的阳性克隆进行测序,共获得4种不同的抗体序列。

[0159] 实施例3:phage ELISA测定抗huPCSK9单链抗体的亲和力

[0160] 将实施例2中获得的克隆进行单克隆phage的展示和纯化,进行phage梯度稀释ELISA实验鉴定phage-abs的亲和力。

[0161] 用pH7.4的磷酸盐缓冲液包被huPCSK9,4℃包被过夜。PBST洗涤三次,4% milk-PBST 37℃封闭1h。将纯化后的单克隆phage按比例稀释于4%的脱脂奶粉中,每孔加入100 μl 稀释后的样品,RT静置1h。用PBST洗涤ELISA板,将4%脱脂奶粉稀释后的HRP-anti-M13单克隆抗体加入ELISA板中,室温放置1h。TMB显色试剂盒显色,室温显色5min。用10% H_2SO_4 终止显色,50 $\mu\text{l}/\text{孔}$ 。酶标仪450nm单波长测定光密度值。结果显示筛选出的几株不同的噬菌体抗体均能与huPCSK9进行结合,而且8D的亲和力明显高于其它克隆(参见图2)。

[0162] 实施例4:对筛选出的抗huPCSK9单链抗体8D进行体外亲和力成熟

[0163] 采用一系列基因克隆的方法对pComb3载体(购自中国质粒载体菌株细胞株基因保藏中心)进行改造,使之适用于噬菌体单链抗体库的构建和表达:采用一系列基因克隆的方法去掉pComb3中的light chain cloning region区域,同时对heavy chain cloning region进行改造,去掉heavy chain cloning region中的CH1部分,然后通过PCR法在多克隆位点处加入NcoI和NotI酶切位点,使之可以克隆并表达ScFv单链抗体。改造后的载体命名为pTGS-1,其质粒图谱如图3所示,并以pTGS-1为基础对8D的VH部分构建定点突变抗体库,进行抗体体外亲和力成熟。

[0164] 1.8D-CDR1,2M抗体库的构建

[0165] 分别以8D为模板,利用定点突变PCR反应扩增重链8D-CDR1,2区基因和8D-CDR3-Vkappa区基因(其中Vkappa是指轻链的可变区)。QIAgene胶回收试剂盒回收PCR片段。将上述两部分PCR反应获得的DNA片段进行Overlap PCR,扩增8D-CDR1,2M-Vkappa全长。反应条件:95℃30s,【95℃10s,60℃30s,72℃50s】3cycle,【95℃10s,72℃50s】25cycles,72℃2min,4℃保存。QIAgene胶回收试剂盒回收PCR片段(参见图4)。

[0166] 用NcoI-HF和NotI分别对质粒pTGS-1和8D-CDR1,2M-Vkappa PCR全长进行双酶切。质粒pTGS-1经1.5%琼脂糖凝胶电泳,切胶回收。PCR片段采用QIAgene PCR purification kit试剂盒进行回收。回收后的PCR片段与pTGS-1质粒按摩尔比8:1比例经T4DNA连接酶室温连接过夜。将连接片段电击法转化至TG1感受态中。使用SOC培养基37℃培养1h复苏细菌。取一定菌液,涂平板,计算库容量。其余菌液4000rpm,室温下离心15min。弃上清,沉淀涂布于2~3个2YTGC大平板上,37℃倒置培养过夜。

[0167] 抗体库库容大约为 10^4 ,从该抗体库中随机挑取10个克隆进行序列分析,正确率为70%。

[0168] 2.噬菌体抗体库的生物淘选和阳性克隆的筛选

[0169] 将上述构建的抗体库,进行phage展示,纯化和沉淀。然后从该库中淘选抗huPCSK9的单链抗体。噬菌体抗体库的生物淘选方法同实施例1,只是将Amp抗性替换成Cm抗性(氯霉素:Chloramphenicol),辅助病毒由VCSM13替换为M13K07。抗huPCSK9单链抗体阳性克隆的筛选方法同实施例2,只是将Amp抗性替换成Cm抗性,辅助病毒由VCSM13替换为M13K07。筛选到1株阳性单克隆,其表达序列与现有技术不同的anti-huPCSK9抗体,命名为8D8F。

[0170] 3. phage ELISA测定8D8F单链抗体的亲和力

[0171] 将8D8F进行单克隆phage的展示和纯化,phage梯度稀释ELISA实验鉴定phage-abs的亲和力,方法同实施例3。结果显示,8D8F的亲和力略低于8D(参见图5)。

[0172] 8D8F抗体的氨基酸和核苷酸序列如下:

[0173] 8D8F VH

[0174] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFGGYAMNWVRQAPGKGLDWVSTISGSGGSTNYADSVKGRFIIISRDSSKHTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDSNWGNFDLWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO:15)

[0175] 编码8D8F VH的核酸序列

[0176] GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGTGGTGGCCTGGTGCAGCCGGGCGGCAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCCGCCAGCGCTTCGCTTTCGGCGGTTACGCTATGAACTGGGTGCGCCAGGCCCTGGCAAGGGCCTGGACTGGGTGAGCACCATTAGCGGTAGCGGTGGCAGCACCAACTACGCCAGACGCTGAAGGGCCGTTTCATCATCAGCCGCGACAGCAGCAAGCACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAAGGACAGCAACTGGGGCAACTTCGACCTGTGGGGCCGCGGCACCCTGGTGACCGTGAGCAGC (SEQ ID NO:17)

[0177] 8D8F VL

[0178] DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSESVMYRRNARNFLGWYQQKPGQPPNLLIYWASTRESGVPDRSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYTHPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:16)

[0179] 编码8D8F VL的核酸序列

[0180] GACATCGTGATGACCAGAGCCCGACAGCCTGGCCGTGAGCCTGGGCGAGCGCGCCACCATCAACTGCAAGAGCAGCGAAAGCGTGATGTACCGTCGCAACGCTCGCAACTTCTGGGCTGGTACCAGCAGAAGCCTGGCCAGCCTCCTAACCTGCTGATCTACTGGCCAGCACCCGTGAGAGCGGCGTGCTGACCGCTTCTCTGGTAGCGGCTCTGGCACC GACTTACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGGCCGAGGACGTGGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTACTACACCCACCCTTACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAG (SEQ ID NO:18)

[0181] 以上序列中带下划线的部分为CDR区序列。

[0182] 其中:

[0183] 8D8F VH CDR1:SGFAFGGYAMN (SEQ ID NO:1)

[0184] 8D8F VH CDR2:TISGSGGSTN (SEQ ID NO:2)

[0185] 8D8F VH CDR3:AKDSNWGNFDL (SEQ ID NO:3)

[0186] 8D8F VL CDR1:KSESVMYRRNARNFLG (SEQ ID NO:4)

[0187] 8D8F VL CDR2:WASTRESGVPDR (SEQ ID NO:5)

[0188] 8D8F VL CDR3:QQYYTHPYT (SEQ ID NO:6)

[0189] VH FR1:EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA (SEQ ID NO:7)

- [0190] VH FR2:WVRQAPGKGLDWVS (SEQ ID NO:8)
 [0191] VH FR3:
 [0192] YADSVKGRFIIISRDKHTLYLQMNSLRAEDTAVYYC (SEQ ID NO:9)
 [0193] VH FR4:WGRGTLVTVSS (SEQ ID NO:10)
 [0194] VL FR1:DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC (SEQ ID NO:11)
 [0195] VL FR2:WYQQKPGQPPELLIY (SEQ ID NO:12)
 [0196] VL FR3:FSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYC (SEQ ID NO:13)
 [0197] VL FR4:FGQGTKLEIK (SEQ ID NO:14)

[0198] 实施例5:8D8F抗体的功能鉴定

[0199] 将8D8F的轻链可变区基因和重链可变区基因克隆至装有轻链恒定区和重链恒定区(重链恒定区为人IgG1的恒定区,其氨基酸序列如SEQ ID NO:19所示,核苷酸序列如SEQ ID NO:20所示;轻链恒定区为人kappa的恒定区,其氨基酸序列如SEQ ID NO:21所示,核苷酸序列如SEQ ID NO:22所示)基因的pCDNA3.1载体上,转染CHO-K1细胞(购自美国ATCC, CCL-61TM),进行全抗体分泌表达,经过protein A纯化,超滤管超滤后获得全抗体蛋白。以Mi166为阳性对照(与赛诺菲/再生元的Alirocumab序列完全相同,根据8D8F抗体的表达纯化方法对其表达纯化获得;其序列也可以参照INN 9620_H, INN 9620_L。),对本发明中获得的抗huPCSK9抗体8D8F进行功能验证。

[0200] 1. 梯度稀释法检测全抗体8D8F及Mi166与PCSK9的亲合力

[0201] 用PBS包被PCSK9抗原,包被浓度为5 μ g/ml,4 $^{\circ}$ C包被过夜。PBST洗ELISA板,共三次。1%BSA-PBST 37 $^{\circ}$ C封闭1h。8D8F及Mi166与PCSK9的摩尔比从1:1开始,三倍梯度稀释,当浓度至41.2ng/ μ l时,进行对倍稀释。每个样品做11个梯度稀释,最后一孔做为阴性对照。将稀释好的样品加入ELISA板中,100 μ l/孔,37 $^{\circ}$ C孵育1h。用200 μ l/孔PBST洗三次,将HRP标记的山羊抗人IgG二抗按1:2000稀释于1%BSA-PBST中,37 $^{\circ}$ C孵育1h。TMB显色试剂盒显色,100 μ l/孔,室温显色5min。用10%H₂SO₄终止显色,50 μ l/孔。在450nm的波长下读数。

[0202] 结果如图6和下面的表1。

[0203] 表1:8D8F和Mi166抗体与PCSK9结合的EC₅₀值

[0204]

	Mi166	8D8F
EC ₅₀ (ng/ml)	45.72	6.58

[0205] 结果显示,8D8F与Mi166均能与PCSK9结合。但是8D8F的结合能力明显高于Mi166,其半数有效浓度EC₅₀值比Mi166高6.6倍左右。

[0206] 2. BIAcore测定8D8F全抗体的亲合力

[0207] 采用捕获法测定全抗体的亲合力。将抗人Fc段的抗体偶联至芯片CM5的表面上,分别稀释Mi166,8D8F抗体至1 μ g/ml,保证约100RU抗体被抗人Fc的抗体捕获。将huPCSK9-his设置一系列的浓度梯度(200nm,100nm,50nm,25nm,12.5nm,6.25nm)流经固定相表面,测定抗体的亲合力。结果如下面的表2所示。

[0208] 表2:Mi166与8D8F抗体亲合力常数测定

[0209]	Sample	Kon (1/MS)	Koff(1/S)	K_D
	Mil66	2.614E+4	3.033E - 4	1.160E - 8

[0210]	8D8F	2.624E+4	3.932E - 5	1.498E - 9
--------	-------------	-----------------	-------------------	-------------------

[0211] 结果表明,8D8F抗体的K_D值比Mi166提高约7.7倍。

[0212] 3.8D8F全抗体与PCSK9竞争抑制实验

[0213] 用pH9.6的碳酸盐缓冲液包被EGFA-Fc,包被浓度为2μg/ml,4℃包被过夜。PBST洗涤三次,1%BSA-PBST 37℃封闭1h。用1%BSA-PBST稀释抗体至10μg/ml然后进行3倍梯度稀释,共设置10个稀释梯度,然后向稀释好的样品里加入等体积的8μg/ml的huPCSK9-his,37℃孵育1h。然后将孵育好的混合物加入ELISA板中,37℃孵育1h。用200μl/孔PBST洗三次,将HRP标记的小鼠抗His二抗按1:3000稀释于1%BSA-PBST中,37℃孵育1h。TMB显色试剂盒显色,100μl/孔,室温显色8min。用10%H₂SO₄终止显色,50μl/孔。450nm读数。结果如图7和下面的表3。

[0214] 表3Mi166,8D8F与PCSK9竞争抑制IC₅₀值

[0215]

	Mil66	8D8F
IC ₅₀ (ng/ml)	15.43	30.9

[0216] 结果显示,Mil66和8D8F均能抑制huPCSK9与LDLR的结合。

[0217] 4.Mil66,8D8F对LDL吸收的细胞生物学活性

[0218] 用完全培养基(DMEM)将HepG2细胞以40000个/孔的量接种到96孔板上,培养板放至37℃细胞培养箱(5%CO₂)中培养24h后,吸出上清,加入含1%FBS的DMEM培养基继续培养16h。将anti-PCSK9抗体(Mil66,8D8F)稀释到400μg/ml后,2倍梯度稀释,共稀释8个浓度,同时将huPCSK9-his稀释到800μg/ml,稀释好的抗体和抗原以1:1的比例混匀,37℃细胞培养箱孵育30分钟,随后吸出96孔板中上清,加入孵育后的抗原抗体混合物,同时加入LDL,LDL终浓度为10μg/ml,将细胞培养板放至37℃细胞培养箱中培养6小时后将上清吸出,PBS清洗两遍后,培养板放入微孔板检测系统中检测荧光强度,激发光波长为485nm,发射光波长为535nm。以抗体浓度为横坐标,Reversal of PCSK9effect on LDL uptake(%)为纵坐标,拟合四参数方程曲线计算EC₅₀值。样品检测时每个板都加入Mi166作为对照。

[0219] 结果如图8所示。

[0220] 结果显示,Mil66,8D8F均能有效的阻止huPCSK9-his与LDLR的结合,从而逆转了huPCSK9-his对LDL吸收的抑制作用。

[0221] 实施例6:Mi166,8D8F对高脂血症恒河猴的血脂调节药效试验

[0222] 将8D8F重新命名为Mi168-4。评价Mi166以及Mi168-4抗体对高脂血症恒河猴的血脂调节作用。

[0223] 本次试验入选15只高脂血症恒河猴,体重7-15kg,体内LDL-c水平1.1-1.7mmol/L。将猴子分为2组:Mi168-4(1.2mg/kg)和MIL66(1.2mg/kg)组,每组3只高脂血症恒河猴,单次皮下注射给药。在给药前分别采集血样2次,然后在给药后1、3、5、7、14天各采集血样一次,供血脂指标检测分析,即:总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白(LDL-c)、高密度

脂蛋白(HDL-c)。动物在采样操作前,禁食14-16h,不麻醉,经前臂静脉采血0.5ml。使用一罗氏Cobas C501检测血脂各项指标。

[0224] 实验结果如图9至图12所示。

[0225] 结果显示,在同等剂量下(1.2mg/kg,相当于临床剂量42mg/人),MIL66和Mi168-4药物单次给药后对LDL-c的作用时间相似,在给药后第一天LDL-c显著下降,并且下降趋势一直持续至给药后5-7天。其中Mi168-4在D5-D7天降低51.95%-49.45%,而Mi166在D5-D7天降低44.05%-40.87%。D7天之后Mi166的药效作用有所减弱,D14天下降为21.73%。而Mi168-4的药效作用可以持续至14天,D14天LDL-c降低44.34%。

[0226] 从以上结果可以看出,Mi168-4对LDL-c的作用强度和持续时间明显优于阳性对照Mi166(图9,10)。MIL66和Mi168-4单次给药后对高脂血症恒河猴TC的调节作用相当。与基线值比较,TC从第一天到第5天持续降低。从第1、3、5天的数据看,MiL66降低TC的强度稍优于Mi168-4,但是Mi168-4药效作用可以持续至第14天,而Mi166从第7天之后药效作用减弱(参见图11,12)。Mi166和Mi168-4药物单次给药后对HDL-c和TG未见有明显作用。

[0227] 尽管本发明的具体实施方式已经得到详细的描述,本领域技术人员将会理解。根据已经公开的所有教导,可以对那些细节进行各种修改和替换,这些改变均在本发明的保护范围之内。本发明的全部范围由所附权利要求及其任何等同物给出。

序列表

<110> 北京天广实生物技术股份有限公司

<120> 抗人 PCSK9 单克隆抗体

<130> IDC150144

<150> 201510415198.4

<151> 2015-07-15

<160> 22

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 8D8F VH CDR1

<400> 1

Ser Gly Phe Ala Phe Gly Gly Tyr Ala Met Asn
1 5 10

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

[0001]

<220>

<223> 8D8F VH CDR2

<400> 2

Thr Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Asn
1 5 10

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 8D8F VH CDR3

<400> 3

Ala Lys Asp Ser Asn Trp Gly Asn Phe Asp Leu
1 5 10

<210> 4

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 8D8F VL CDR1

<400> 4

Lys Ser Ser Glu Ser Val Met Tyr Arg Arg Asn Ala Arg Asn Phe Leu
1 5 10 15

Gly

<210> 5
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> 8D8F VL CDR2

<400> 5

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg
 1 5 10

<210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> 8D8F VL CDR3

<400> 6

Gln Gln Tyr Tyr Thr His Pro Tyr Thr
 1 5

[0002]

<210> 7
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> VH FR1

<400> 7

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
 20

<210> 8
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> VH FR2

<400> 8

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Asp Trp Val Ser
 1 5 10

<210> 9
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> VH FR3

<400> 9

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Ile Ile Ser Arg Asp Ser Ser
1 5 10 15

Lys His Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
20 25 30

Ala Val Tyr Tyr Cys
35

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> VH FR4

<400> 10

Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 11

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

[0003] <223> VL FR1

<400> 11

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys
20

<210> 12

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> VL FR2

<400> 12

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Asn Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 13

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> VL FR3

<400> 13

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
1 5 10 15

Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25

<210> 14
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VL FR4

<400> 14

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 15
<211> 118
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> 抗体重链可变区的氨基酸序列

<400> 15

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

[0004]

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Gly Gly Tyr
20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Asp Trp Val
35 40 45

Ser Thr Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ile Ile Ser Arg Asp Ser Ser Lys His Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Asp Ser Asn Trp Gly Asn Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 16
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> 抗体轻链可变区的氨基酸序列

<400> 16
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Glu Ser Val Met Tyr Arg
 20 25 30
 Arg Asn Ala Arg Asn Phe Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Pro Pro Asn Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95
 Tyr Tyr Thr His Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110
 Lys

[0005]

<210> 17
 <211> 354
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> 编码抗体重链可变区的核酸序列
 <400> 17
 gaggtgcagc tggtagagag cggtaggtgga ctggtgcagc cgggcggcag cctgcgtctg 60
 agctgcgccc ccagcggcct cgctttcggc ggttacgcta tgaactgggt gcgccaggcc 120
 cctggcaagg gcctggactg ggtgagcacc attagcggta gcggtggcag caccaactac 180
 gccgacagcg tgaaggcccg tttcatcatc agccgagaca gcagcaagca caccctgtac 240
 ctgcagatga acagcctgcg tgccgaggac accgccgtgt actactgcgc caaggacagc 300
 aactggggca acttcgacct gtggggccgc ggcaccctgg tgaccgtgag cagc 354
 <210> 18
 <211> 339
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> 编码抗体轻链可变区的核酸序列
 <400> 18
 gacatcgtga tgaccagag cccggacagc ctggccgtga gcctgggcca gcgcgccacc 60
 atcaactgca agagcagcga aagcgtgatg taccgtcgca acgctcgcaa cttcctgggc 120
 tggtagcagc agaagcctgg ccagcctcct aacctgctga tctactgggc cagcaccctg 180

gagagcggcg tgcctgaccg cttctctggt agcggctctg gcaccgactt cacctgacc 240
 atcagcagcc tgcaggccga ggacgtggcc gtgtactact gccagcagta ctacaccac 300
 ccttacacct tcggccaggg caccaagctg gagatcaag 339

<210> 19
 <211> 329
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> IgG1 重链恒定区的氨基酸序列

<400> 19

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

[0006]

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 325

[0007]

<210> 20
 <211> 987
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> 编码 IgG1 重链恒定区的核酸序列

<400> 20
 gctagcacca agggcccatac ggttctcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 60
 ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggg gacggtgtcg 120
 tggaaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 180
 ggactctact ccctcagcag cgtggtgact gtgccctcta gcagcttggg caccagacc 240
 tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 300
 aaatcttgtg acaaaaactca cacatgcccc ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga 360
 ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacacce teatgatctc ccggaccct 420
 gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 480
 tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 540
 agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtctctgacc aggactggct gaatggcaag 600
 gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 660
 aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacacct tgcccccatc ccgggatgag 720
 ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 780
 gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 840
 ctggactccg acggtctctt cttctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 900
 cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 960

cagaagagcc tctccctgtc tccgggt 987

<210> 21
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> κ 型轻链恒定区的氨基酸序列

<400> 21

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60

[0008]

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

<210> 22
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> 编码 κ 型轻链恒定区的核酸序列

<400> 22

cgtacggtgg ctgcaccatc tgccttcac ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct 60

ggaactgcct ctggtgtgtg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag 120

tggaaggtgg ataacgcct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac 180

agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag 240

aaacacaaag tctacgctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcaciaag 300

agcttcaaca ggggagagtg t 321

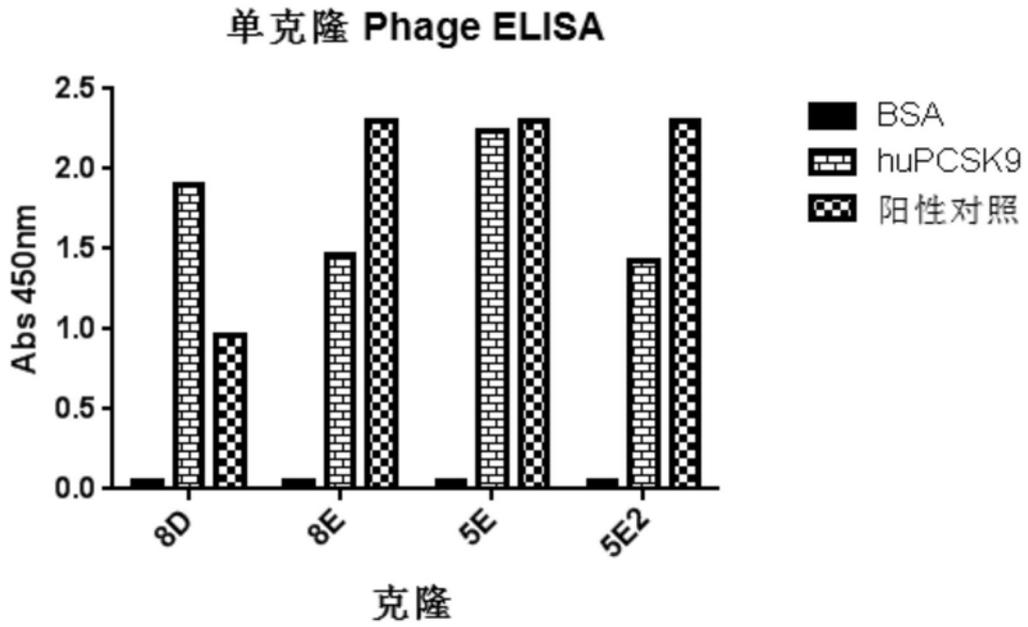


图1

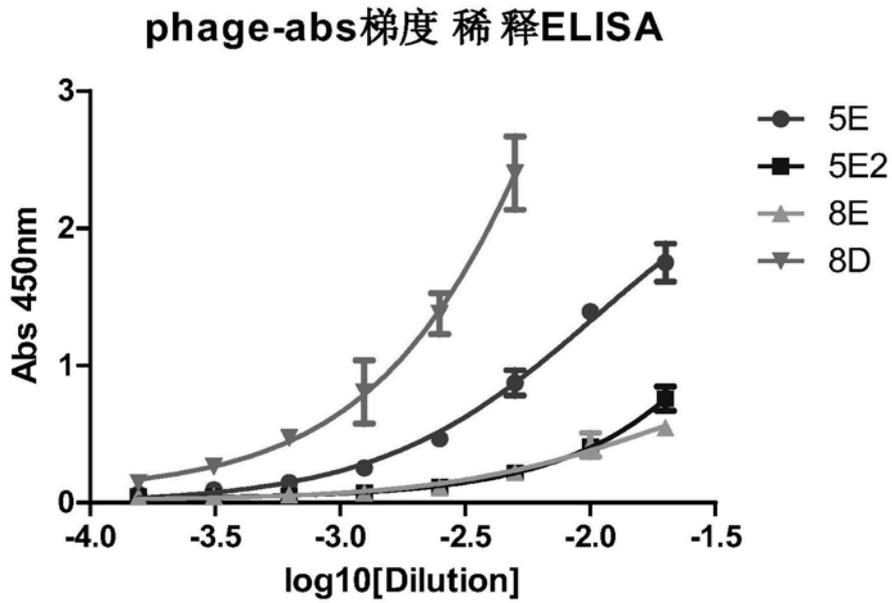


图2

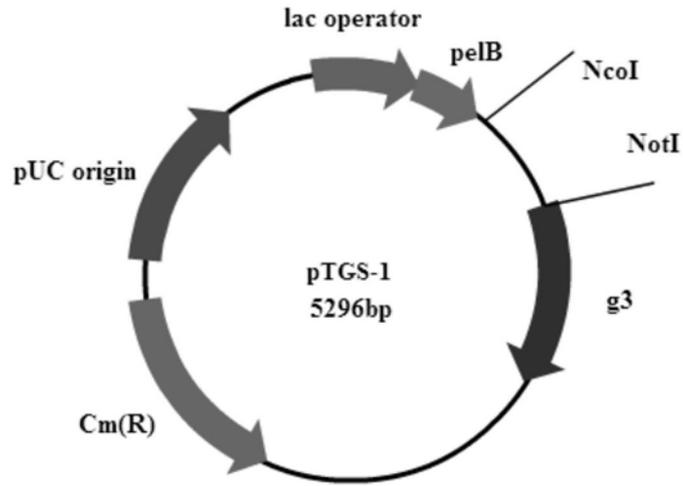


图3

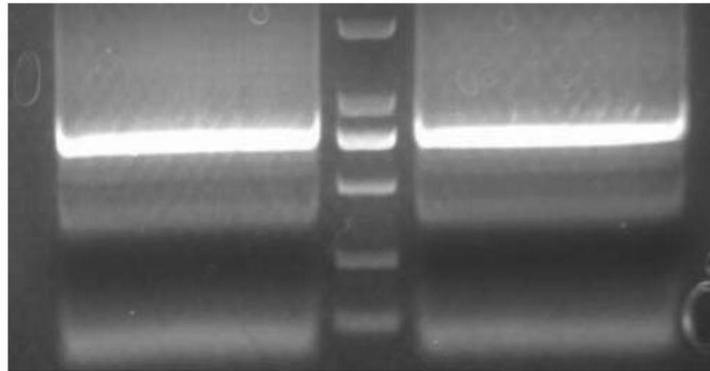


图4

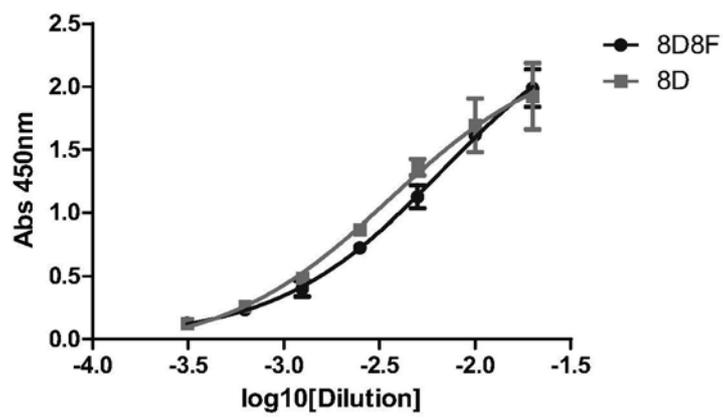


图5

mil66及8D8F与PCSK9结合实验

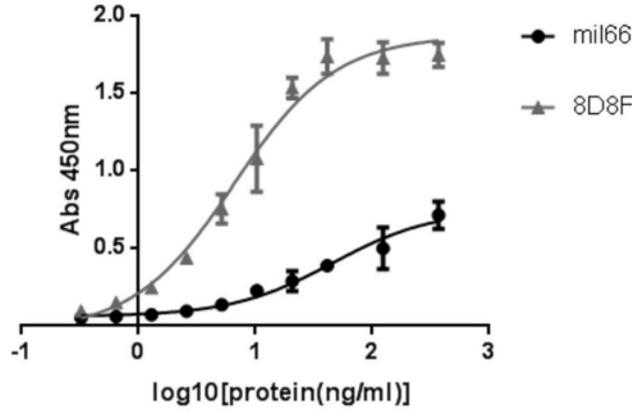


图6

mil66, 8D8F与PCSK9竞争抑制实验

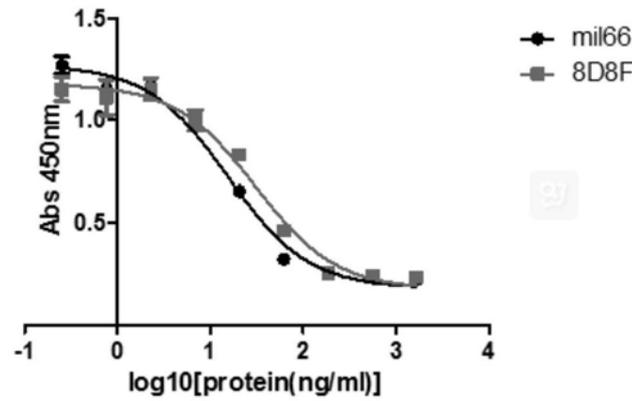


图7

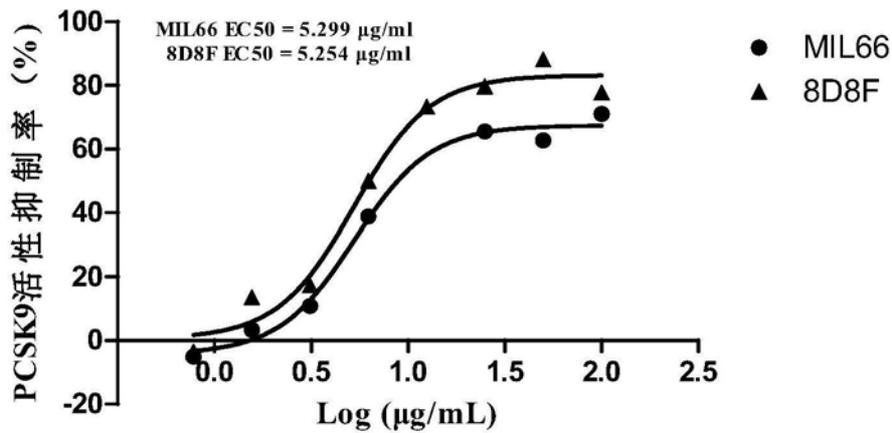


图8

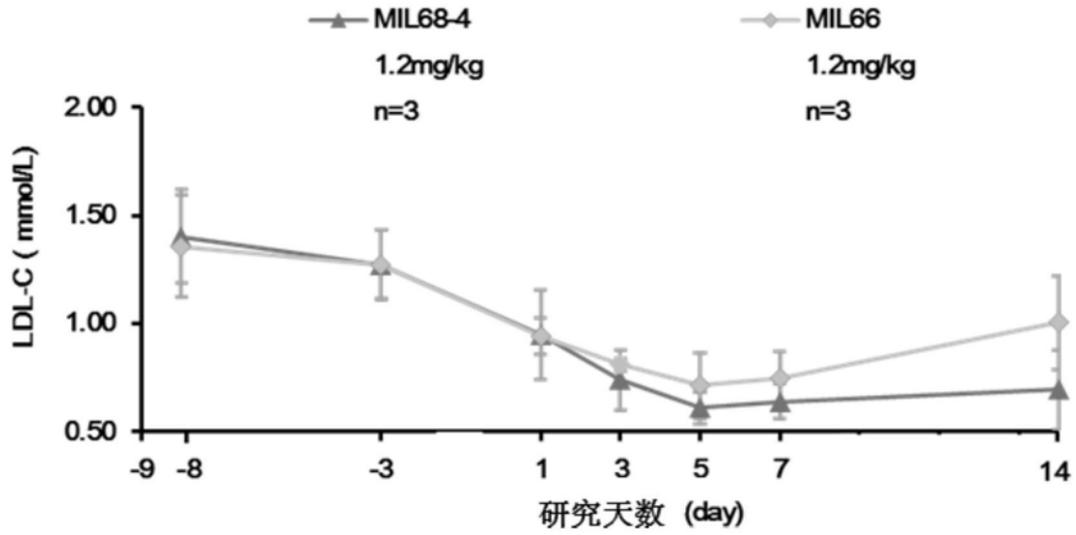


图9

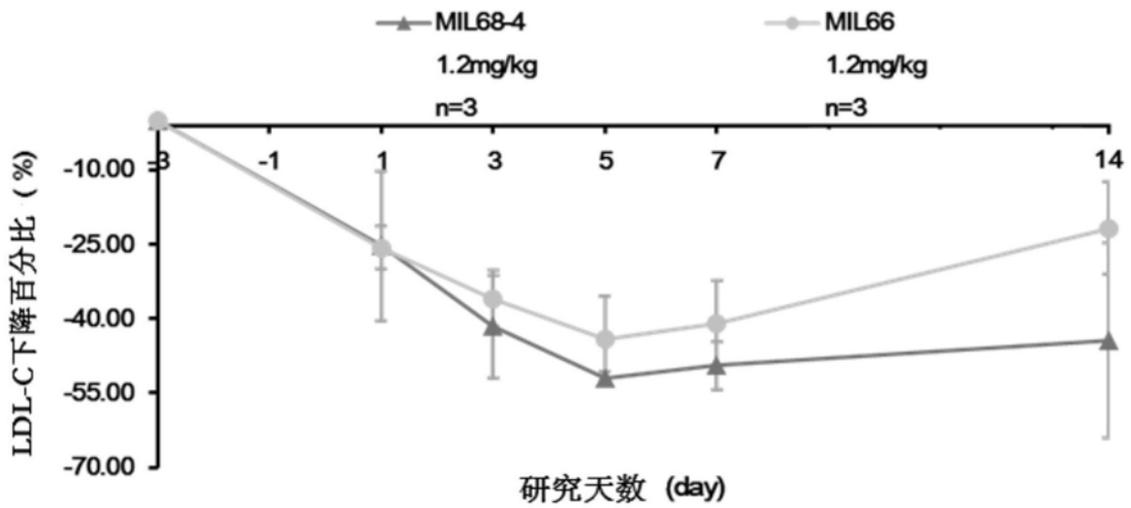


图10

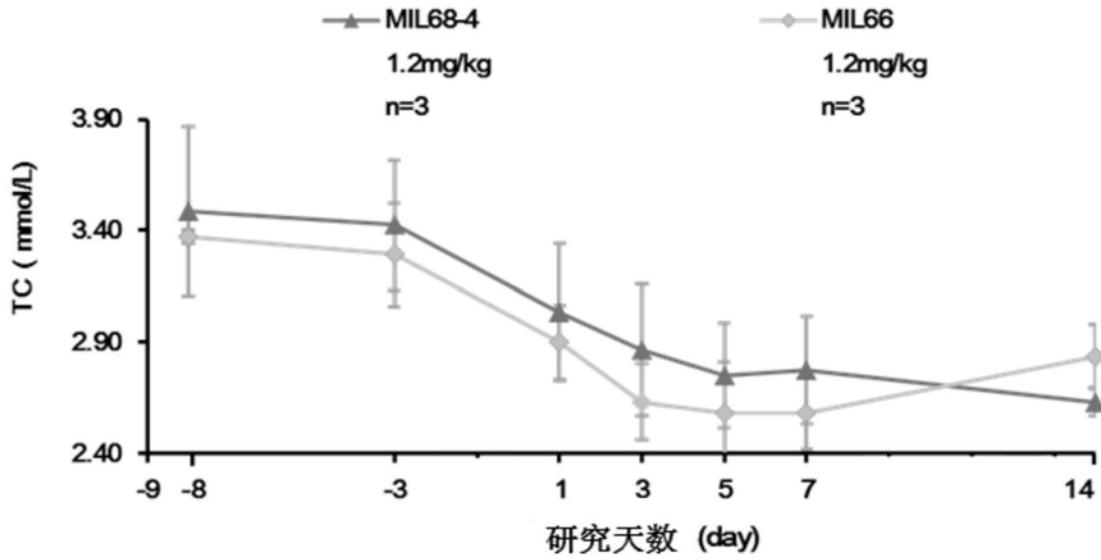


图11

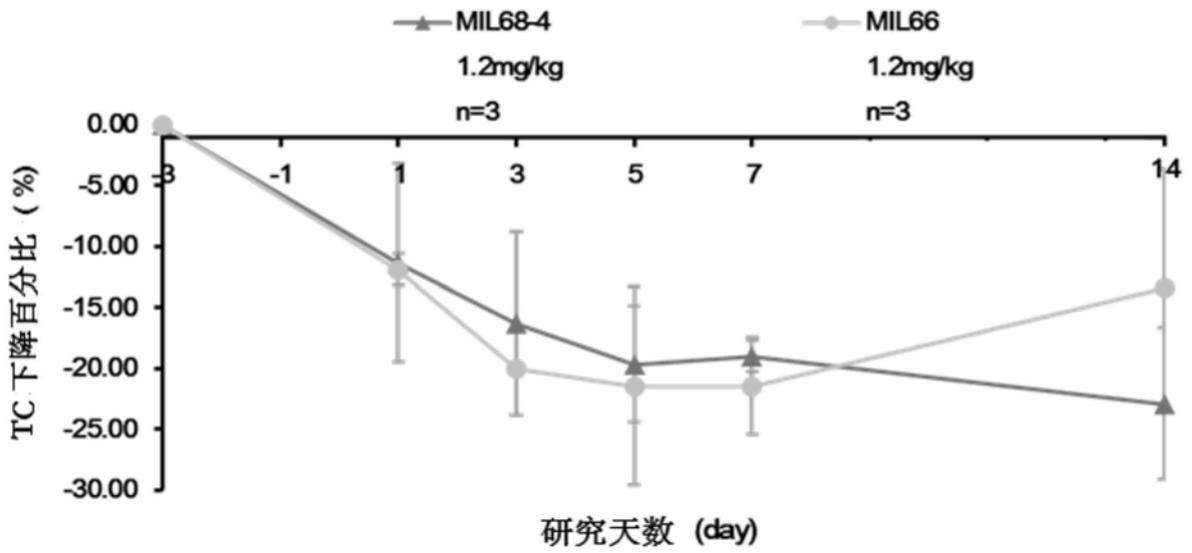


图12