



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 111920954 A

(43) 申请公布日 2020. 11. 13

(21) 申请号 202010812439.X

A·佩曼 H-1·谢弗 U·施沃恩

(22) 申请日 2014.06.06

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

代理人 封新琴

(30) 优先权数据

13305762.0 2013.06.07 EP

13306436.0 2013.10.18 EP

61/832,459 2013.06.07 US

61/892,215 2013.10.17 US

61/944,855 2014.02.26 US

62/002,508 2014.05.23 US

(51) Int.Cl.

A61K 45/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

201480032506.9 2014.06.06

(71) 申请人 再生元制药公司

地址 美国纽约州

申请人 赛诺菲生物技术公司

(72) 发明人 W·J·撒西艾拉 V·古萨罗瓦

权利要求书1页 说明书26页

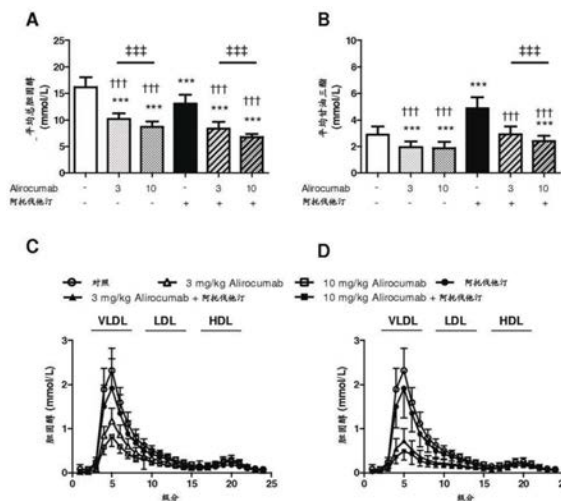
序列表64页 附图8页

(54) 发明名称

通过施用PCSK9抑制剂抑制动脉粥样硬化的方法

(57) 摘要

本发明提供了用于抑制受试者体内动脉粥样硬化斑块形成的方法和组合物。在某些实施方案中,本发明的方法包括选择患有动脉粥样硬化或者具有发生动脉粥样硬化风险的受试者,和向受试者施用包含前蛋白转化酶枯草杆菌蛋白酶/kexin 9型 (proprotein convertase subtilisin/kexin type 9) (PCSK9) 抑制剂的药物组合物。在某些实施方案中,PCSK9抑制剂是抗PCSK9抗体或抗原结合蛋白。



1. 一种抑制受试者中动脉粥样硬化斑块形成的方法,该方法包括向受试者施用包含 PCSK9 抑制剂的药物组合物。

2. 一种包含 PCSK9 抑制剂的药物组合物,其适用于抑制受试者中动脉粥样硬化斑块形成。

3. 权利要求 1 或 2 的方法或药物组合物,其中该受试者是非高脂血的。

4. 权利要求 1 或 2 的方法或药物组合物,其中该受试者表面上是健康的。

5. 一种治疗或抑制受试者中动脉粥样硬化进展的方法,该方法包括:

选择罹患中风或心肌梗死的受试者;和

向所述受试者施用包含 PCSK9 抑制剂的药物组合物,由此治疗动脉粥样硬化或抑制动脉粥样硬化的进展。

6. 一种包含 PCSK9 抑制剂的药物组合物,其适用于在罹患中风或心肌梗死的受试者中治疗动脉粥样硬化或抑制其进展。

7. 权利要求 5 或 6 的方法或药物组合物,其中该受试者是非高脂血的。

8. 一种在非高脂血症受试者中治疗动脉粥样硬化或抑制动脉粥样硬化进展的方法,该方法包括:

选择患有动脉粥样硬化或者已知处于发生动脉粥样硬化的风险的受试者,其中该受试者是非高脂血的;和

向所述受试者施用包含 PCSK9 抑制剂的药物组合物,由此治疗动脉粥样硬化或抑制动脉粥样硬化的进展。

9. 一种包含 PCSK9 抑制剂的药物组合物,其适用于在非高脂血症受试者中治疗动脉粥样硬化或抑制的动脉粥样硬化的进展,其中该受试者患有动脉粥样硬化或者已知处于发生动脉粥样硬化的风险。

10. 权利要求 8 或 9 的方法或药物组合物,其中该受试者表面上是健康的。

通过施用PCSK9抑制剂抑制动脉粥样硬化的方法

[0001] 本申请是2014年6月6日提交的申请号为201480032506.9、发明名称为“通过施用PCSK9抑制剂抑制动脉粥样硬化的方法”的发明专利申请的分案申请。

发明领域

[0002] 本发明涉及动脉粥样硬化治疗领域。更具体地，本发明涉及施用前蛋白转化酶枯草杆菌蛋白酶/kexin 9型 (PCSK9) 抑制剂来抑制受试者体内动脉粥样硬化斑块的形成。

[0003] 背景

[0004] 动脉粥样硬化是在西方世界导致死亡和心血管发病率的主要原因。动脉粥样硬化的风险因素包括低密度脂蛋白 (LDL) 胆固醇水平高、高密度脂蛋白 (HDL) 胆固醇水平低、高血压、糖尿病、家族病史、男性、吸烟和高血清胆固醇。

[0005] 前蛋白转化酶枯草杆菌蛋白酶kexin型9 (PCSK9) 是属于分泌型枯草杆菌酶家族蛋白酶K亚家族的前蛋白转化酶。它是一种参与LDL代谢的丝氨酸蛋白酶，主要在肝、肾和肠中表达。有证据表明，PCSK9通过促进LDL受体降解来增加血浆LDL胆固醇，其中LDL受体介导肝脏中LDL胞吞，这是从循环清除LDL的主要途径。

[0006] 使用PCSK9抑制剂 (抗-PCSK9抗体) 降低血清总胆固醇、LDL胆固醇和血清甘油三酯已经在美国专利No.8,062,640,8,357,371和美国专利申请公开号2013/0064834中被描述。然而，尚未有报道PCSK9抑制剂用于减少或抑制受试者体内动脉粥样硬化斑块形成的进展。本领域中对抑制动脉粥样硬化斑块形成的治疗方法仍然有需求。

发明概要

[0007] 本发明致力于通过提供用于抑制受试者体内动脉粥样硬化斑块形成的方法和组合物来满足本领域对治疗方法的需要。在某些方面中，本发明的方法和组合物一般包括选择患有动脉粥样硬化、或者具有发生动脉粥样硬化风险的患者，和向该受试者施用包含前蛋白转化酶枯草杆菌蛋白酶/kexin 9型 (PCSK9) 抑制剂 (例如，抗-PCSK9抗体或抗原结合蛋白) 的药物组合物。在其他方面中，本发明提供了包含PCSK9抑制剂的药物组合物，其适用于抑制受试者体内的动脉粥样硬化斑块形成。在其他方面中，本发明提供了通过向受试者施用包含PCSK9抑制剂的药物组合物抑制受试者体内动脉粥样硬化斑块形成的方法。

[0008] 在某些实施方案中，受试者是非高脂血的。在其他实施方案中，受试者表面上是健康的。

[0009] 在另一个方面中，本发明提供了治疗或抑制受试者体内动脉粥样硬化进展的方法，该方法包括：(1) 选择已遭受中风或心肌梗死的受试者；和 (b) 向受试者施用包含PCSK9抑制剂的药物组合物，借此治疗动脉粥样硬化或抑制动脉粥样硬化的进展。在一个实施方案中，受试者是非高脂血的。

[0010] 在另一个方面中，本发明提供了包含PCSK9抑制剂的药物组合物，适用于治疗或抑制已遭受中风或心肌梗死的受试者体内的动脉粥样硬化的进展。

[0011] 在另一个方面中，本发明提供了治疗或抑制非高脂血症受试者体内动脉粥样硬化

进展的方法,该方法包括:(a)选择患有动脉粥样硬化或者已知具有发生动脉粥样硬化的风险的受试者,其中该受试者是非高脂血的;和(b)向受试者施用包含PCSK9抑制剂的药物组合物,借此治疗动脉粥样硬化或抑制动脉粥样硬化的进展。在一个实施方案中,受试者表面上是健康的。在另一个实施方案中,受试者是非高胆固醇血的。在另一个实施方案中,受试者是非高甘油三酯血的。

[0012] 在另一个方面中,本发明提供了包含PCSK9抑制剂的药物组合物,适用于治疗或抑制非高脂血症受试者体内动脉粥样硬化的进展,其中该受试者患有或者具有发生动脉粥样硬化的风险。

[0013] 在某些实施方案中,受试者患有选自下组的疾病或病症:1型糖尿病、2型糖尿病、川崎病、慢性炎症性疾病、和高血压。在另一个实施方案中,受试者具有升高水平的炎症标志物。在进一步的实施方案中,炎症标志物是C反应蛋白。在更进一步的实施方案中,炎症标志物是炎性细胞因子。

[0014] 在某些实施方案中,PCSK9抑制剂是特异结合PCSK9的抗体或抗原结合蛋白。在其他实施方案中,抗体包含具有SEQ ID NO:12,13,14,16,17,和18的重链和轻链CDR氨基酸序列。在某些实施方案中,抗体或抗原结合蛋白包括具有SEQ ID NO:11氨基酸序列的HCVR和具有SEQ ID NO:15氨基酸序列的LCVR。在某些实施方案中,抗体或抗原结合蛋白包括具有SEQ ID NO:2,3,4,7,8,和10的重链和轻链CDR氨基酸序列。在某些实施方案中,抗体或抗原结合蛋白包括具有SEQ ID NO:1氨基酸序列的HCVR和具有SEQ ID NO:6氨基酸序列的LCVR。在一个实施方案中,抗体或抗原结合蛋白与包含分别在SEQ ID NO:1和6;或11和15中示出的重链和轻链可变域氨基酸序列的抗体结合PCSK9上相同的表位。在一些实施方案中,抗体或抗原结合蛋白与包含分别在SEQ ID NO:1和6;或11和15中示出的重链和轻链可变域氨基酸序列的抗体竞争与PCSK9的结合。

[0015] 在另一个实施方案中,PCSK9抑制剂可以将受试者体内动脉粥样硬化斑块形成减少至少10%,20%,30%,40%,50%,60%,70%,80%,或90%。

[0016] 在一些实施方案中,受试者患有杂合子家族性高胆固醇血症(heFH)。在另一个实施方案中,受试者具有高胆固醇血症的非家族性高胆固醇血症(nonFH)的形式。

[0017] 在某些实施方案中,受试者在施用抗体或抗原结合蛋白之前和/或期间使用另一种脂质调节剂。治疗性脂质调节剂包括他汀类、胆固醇摄取抑制剂、依泽替米贝、贝特类、烟酸、 ω -3脂肪酸、和胆汁酸树脂。他汀包括西立伐他汀、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。

[0018] 在一些实施方案中,抗体或抗原结合蛋白是皮下给药的。

[0019] 本发明还提供了包含PCSK9抑制剂药物组合物的单位剂型。在某些实施方案中,PCSK9抑制剂是抗体或抗原结合片段,并且该单位剂型包括75mg,150mg,200mg,或300mg抗体或抗原结合片段。单位剂型可以是预装填注射器、预装填自动注射器、小瓶、药筒(cartridge)、可重复使用的注射器,或可重复使用的自动注射器;单位剂型可以被气密封,并且可以进一步指示剂量。

[0020] 本发明还提供了制品或试剂盒,其包含PCSK9抑制剂药物组合物和容器,在一些实施方案中,还包括使用说明书。

[0021] 本发明还提供了使用包含PCSK9抑制剂的组合物在制造用于(a)、(b)或(c)的药物

中的用途：(a) 抑制受试者体内动脉粥样硬化斑块的形成；(b) 治疗或抑制已遭受中风或心肌梗死的受试者体内动脉粥样硬化的进展；(c) 治疗或抑制非高脂血症受试者体内的动脉粥样硬化的进展，其中该受试者患有动脉粥样硬化或者已知具有发生动脉粥样硬化的风险。

[0022] 附图简述

[0023] 图1A-D显示的一系列图表描述了mAb316P、阿托伐他汀、及其组合在18周治疗期之后对多种参数的影响。图1A显示了对平均血浆总胆固醇的影响；图1B显示了对甘油三酯水平的影响。图1C和1D显示了12周治疗后通过FPLC脂蛋白分离评估的脂蛋白胆固醇概况，以研究单独的mAb316P (图1C) 和mAb316P与阿托伐他汀的组合 (图1D) 的影响。与对照相比*** $P < 0.0045$ ；与阿托伐他汀相比††† $P < 0.0045$ ；3mg/kg mAb316P与10mg/kg mAb316P相比，‡‡‡ $P < 0.0045$ (每组n=15)。

[0024] 图2A显示了mAb316P、阿托伐他汀、及其组合对肝脏低密度脂蛋白受体蛋白水平的影响。与对照相比，*** $P < 0.0045$ ；与阿托伐他汀相比† $P < 0.05$ ；†† $P < 0.01$ ；††† $P < 0.0045$ ；3mg/kg mAb316P与10mg/kg mAb316P相比，‡‡‡ $P < 0.0045$ (每组n=15)。图2B显示了mAb316P、阿托伐他汀、及其组合对非HDL-胆固醇水平的影响。与对照相比，*** $P < 0.001$ ；与阿托伐他汀相比，# $P < 0.05$ ；## $P < 0.01$ ；### $P < 0.001$ 。

[0025] 图3A-F的一系列照片描述了mAb316P、阿托伐他汀、及其组合对斑块形貌的影响。分别是对照 (图3A)、3mg/kg mAb316P (图3B)、10mg/kg mAb316P (图3C)、阿托伐他汀 (图3D)、3mg/kg mAb316P+阿托伐他汀 (图3E) 和10mg/kg mAb316P+阿托伐他汀 (图3F) 治疗18周后主动脉根部区域截面的苏木精-焰红染料-藏红花染色的动脉粥样硬化病变的代表性图像。

[0026] 图4A-D所示的一系列图片描述了mAb316P、阿托伐他汀、及其组合对主动脉根部和主动脉弓中的粥样硬化发生的影响。在治疗18周后，对每个截面的总病变面积 (图4A) 和病变数目 (图4B) 进行评估。对病变严重程度进行评估，并分类为无病变、轻度 (I-III型) 和重度 (IV-V型) 病变 (图4C)。在油红O染色后评估主动脉弓的总斑块负荷 (图4D)。数据表示为被染色的面积的百分比。与对照相比，* $P < 0.05$ ；*** $P < 0.0045$ ；与阿托伐他汀相比，† $P < 0.05$ ；†† $P < 0.01$ ；††† $P < 0.0045$ ；3mg/kg mAb316P与10mg/kg mAb316P相比，‡ $P < 0.05$ ；‡‡ $P < 0.01$ ；‡‡‡ $P < 0.0045$ (根部区中每组n=15，弓中n=6-7)。

[0027] 图5显示了平均血浆总胆固醇与动脉粥样硬化病变面积之间的相关性。病变面积的平方根对平均总胆固醇作图。实施了线性回归分析。

[0028] 图6的一系列照片描述了mAb316P、阿托伐他汀、及其组合对病变组成的影响。代表性图片显示了对照、单独用mAb316P、和mAb316P与阿托伐他汀组合处理18周后，用Mac-3对巨噬细胞进行免疫染色，随后用天狼星红对胶原染色、用 α 肌动蛋白对平滑肌细胞 (SMC) 染色的结果。

[0029] 图7A-C的一系列图片描绘了mAb316P、阿托伐他汀、及其组合对病变组成的影响。在对病变大小进行校正后，确定重度 (IV-V型) 病变中作为去稳定化因子的巨噬细胞含量 (图7A左图) 和坏死含量 (图7A右图)，包括胆固醇裂隙，和作为稳定因子的SMC含量 (图7B左图) 和胶原含量 (图7B右图)。与对照相比，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$ ；与阿托伐他汀相比，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$ ，### $P < 0.001$ 。计算稳定因子与去稳定因子的比值作为斑块稳定性指

数(图7C)。与对照相比, * $P < 0.05$; *** $P < 0.0045$; 与阿托伐他汀相比, † $P < 0.05$, ††† $P < 0.0045$; 3mg/kg mAb316P与10mg/kg mAb316P相比, ‡ $P < 0.05$ (每组n=15)。

[0030] 图8A-C的一系列图片描述了mAb316P、阿托伐他汀、及其组合对血管炎症标志物的影响。确定每个截面中附着到内皮上的单核细胞数目(图8A)和主动脉根部区域的T细胞数目(图8B)。此外,确定被染色面积的百分比(图8C)作为细胞内粘附分子1(ICAM-1)。纳入了代表性的图片。与对照相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.0045$; 与阿托伐他汀相比, † $P < 0.05$, ††† $P < 0.0045$ (每组n=15)。

[0031] 详细说明

[0032] 在描述本发明之前应当理解,本发明不仅限于这里描述的特定方法和实验条件,因为这些方法和条件是可以变化的。还应当理解,本文所用术语仅是出于描述特定实施方案的目的,并不意图具有限制,因为本发明的范围仅由附加权利要求限定。

[0033] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域普通技术人员所公知的相同的含义。如本文所使用的,术语“约”在用于指示某个特定列举的数值时,意味着该数值可以从所引数值偏差不超过1%。例如,如本文所使用的,表述“约100”包括99和101以及之间的所有数值(例如,99.1,99.2,99.3,99.4等)。

[0034] 下面描述了示例方法和材料,但在实施本发明时可以使用任何与本文所述相似或等价的方法和材料。本文引入在这里提到的所有出版物和与本文同时提交的序列列表的全部内容。

[0035] 用于抑制动脉粥样硬化的方法

[0036] 本发明的方法包括选择患有动脉粥样硬化或者具有发生动脉粥样硬化风险的受试者,和向这些受试者施用包含PCSK9抑制剂的药物组合物。

[0037] 动脉粥样硬化的风险因素是本领域众所周知的,并且包括,但不仅限于,低密度脂蛋白(LDL)胆固醇高、高密度脂蛋白(HDL)胆固醇水平低、高血压、糖尿病、家族史、男性、吸烟、和高血清胆固醇。为给定的受试者评估这些风险因素的方法也是本领域众所周知的。

[0038] 在某些实施方案中,所选择受试者是非高脂血的。“非高脂血的”受试者是非高胆固醇血和/或非高甘油三酯血的受试者。“非高胆固醇血”的受试者是不符合当前对于高胆固醇血症受试者的确立标准的人(见例如Harrison's Principles of Experimental Medicine,第13版,McGraw-Hill, Inc., N.Y)。高胆固醇血症受试者的LDL水平 $>160\text{mg/dL}$,或者 $>130\text{mg/dL}$ 并且具有至少2个选自下组的风险因素:男性、早发冠心病家族史、吸烟(每天超过10支)、高血压、低HDL($<35\text{mg/dL}$)、糖尿病、高胰岛素血症、腹部肥胖、高脂蛋白(a)、和脑血管疾病或闭塞性外周血管疾病的个人史。高甘油三酯血症受试者的甘油三酯(TG)水平 $>250\text{mg/dL}$ 。因此,非高脂血受试者的定义为胆固醇和甘油三酯水平低于上面为高胆固醇血症和高甘油三酯血症受试者设定的极限。在某些实施方案中,所选受试者既不是非高脂血的也没有接受过高脂血症治疗。

[0039] 在某些实施方案中,所选受试者表面上是健康的。如本文所使用的,“表面上是健康的”意思是个体先前没有发生急性不良心血管事件,例如心肌梗死(即个体不具有由于原发性不良心血管事件所致的升高的继发性不良心血管事件的风险)。表面上健康的个体也

没有显示疾病症状。

[0040] 在某些实施方案中,选定的受试者先前曾罹患急性心血管不良事件,例如心肌梗死、中风、心绞痛和/或外围动脉血管疾病。在一个实施方案中,所选受试者先前曾罹患急性心血管不良事件,例如心肌梗死、中风、心绞痛和/或外围动脉血管疾病,但是是非高脂血的。在一个实施方案中,选定的受试者先前曾遭受急性心血管不良事件,例如心肌梗死、中风、心绞痛和/或外围动脉血管疾病,但既不是非高脂血的,也不在接受高脂血症治疗。

[0041] 在某些实施方案中,选定的受试者患有选自下组的疾病或病症:1型糖尿病、2型糖尿病、川崎病、慢性炎症性疾病、和高血压。在一个实施方案中,所选受试者患有选自下组的疾病或病症:1型糖尿病、2型糖尿病、川崎病、慢性炎症性疾病、和高血压,但是是非高脂血的。在一个实施方案中,选定的受试者患有选自下组的疾病或病症:1型糖尿病、2型糖尿病、川崎病、慢性炎症性疾病、和高血压,但既不是非高脂血的,也不在接受高脂血症治疗。

[0042] 在某些实施方案中,选定的受试者具有升高水平的炎症标志物。在一个实施方案中,选定的受试者具有升高水平的炎症标志物,但是是非高脂血的。为了本发明的目的可以使用系统性炎症的任何标志物。合适的炎症标志物包括,但不限于,C反应蛋白(参见例如美国专利号7,964,614,本文引入其全部内容),细胞因子(例如IL-6,IL-8,和/或IL-17),和细胞粘附分子(例如,ICAM-1,ICAM-3,BL-CAM,LFA-2,VCAM-1,NCAM,和PECAM)。

[0043] 炎症标志物的水平可以通过任何本领域公认的测定法获得。通常,该水平通过测量体液中,例如血液、淋巴、唾液、尿液等中的标志物水平加以确定。该水平可以通过ELISA或免疫测定或其它用于确定标志物存在的常规技术加以确定。为了确定炎症标志物的水平是否升高,可以将受试者中测得的标志物水平与合适的对照(例如,预定的值,和/或从相匹配的健康受试者获得的值)进行比较。

[0044] 在一个实施方案中,本发明提供了包含PCSK9抑制剂的药物组合物,用于抑制受试者中动脉粥样硬化斑块的形成,以及治疗或抑制受试者体内动脉粥样硬化的进展。

[0045] 本发明还提供了使用包含PCSK9抑制剂的药物组合物在制造用于本文中描述的任何方法,包括抑制动脉粥样硬化斑块的形成,以及治疗或抑制受试者体内动脉粥样硬化的进展,的药物中的用途。

[0046] PCSK9抑制剂

[0047] 在某些方面中,本发明的方法包括向受试者施用包含PCSK9抑制剂的治疗组合物。

[0048] 如本文所使用的,“PCSK9抑制剂”是任何在体外或体内结合或与人PCSK9相互作用并抑制PCSK9的正常生物学功能的试剂。PCSK9抑制剂类别的非限制性实例包括小分子PCSK9拮抗剂、拮抗性核酸分子(例如,RNAi分子)、基于肽的PCSK9拮抗剂(例如“肽体(peptibody)”分子),和特异性结合人PCSK9的抗体或抗体的抗原结合片段。

[0049] 如本文所使用的,术语“前蛋白转化酶枯草杆菌蛋白酶/kexin 9型”或“PCSK9”是指具有SEQ ID NO:197所示核酸序列和SEQ ID NO:198的氨基酸序列的PCSK9,或其生物活性片段。

[0050] 在某些实施方案中,与未经治疗的受试者中的动脉粥样硬化斑块形成相比,施用PCSK9抑制剂将受试者(例如,人类受试者)体内动脉粥样硬化斑块的形成减少至少10%(例如10%,20%,30%,40%,50%,60%,70%,80%,90%,或100%)。

[0051] 在某些实施方案中,PCSK9抑制剂是特异性结合PCSK9的抗体或抗原结合蛋白。如

本文所使用的,术语“抗体”是指免疫球蛋白分子,包含四条多肽链,两条重(H)链和两条轻(L)链通过二硫键相互连接,以及其多聚体(例如,IgM抗体)。每条重链包括重链可变区(本文中缩写为HCVR或 V_H)和重链恒定区。重链恒定区包括三个结构域, C_{H1} , C_{H2} 和 C_{H3} 。每条轻链包括轻链可变区(本文中缩写为LCVR或 V_L)和轻链恒定区。轻链恒定区包含一个结构域(C_{L1})。 V_H 区和 V_L 区可以进一步细分为高变区,称为互补决定区(CDR),它们之间散在着更保守的区域,称为构架区(FR)区。每个 V_H 和 V_L 由三个CDR和四个FR组成,它们从氨基末端到羧基末端按照以下顺序排列:FR1,CDR1,FR2,CDR2,FR3,CDR3,FR4。在本发明的不同实施方案中,抗PCSK9抗体(或其抗原结合部分)的FR可以是与人种系序列相同的,或者可以是天然的或人工修饰的。氨基酸共有序列可以根据两个或多个CDR的肩并肩分析(side-by-side analysis)来定义。

[0052] 如本文所使用的,术语“抗体”也包括完整抗体分子和抗原结合蛋白的抗原结合片段。如本文所使用的,术语抗体的“抗原结合部分”、抗体的“抗原结合片段”、“抗原结合蛋白”等包括任何天然存在的、可通过酶学方法获得的、合成的、或遗传工程化的多肽或糖蛋白,其特异性结合抗原以形成复合物。抗体的抗原结合片段可以使用任何合适的标准技术从例如完全抗体分子衍生而来,例如蛋白水解消化或者涉及操纵和表达编码抗体可变区、以及任选地恒定区结构域的DNA的重组基因工程技术。这样的DNA是已知的,和/或容易从例如商业来源、DNA文库(包括,例如,噬菌体抗体文库)获得,或者可以合成。DNA可以加以测序并通过化学或使用分子生物学技术加以操作,以便,例如,将一个或多个可变和/或恒定域排列成合适的配置,或者引入密码子,创建半胱氨酸残基,修饰、添加或删除氨基酸等等。

[0053] 抗原结合片段或抗原结合蛋白的非限制性实例包括:(i) Fab片段;(ii) F(ab')₂片段;(iii) Fd片段;(iv) Fv片段;(v) 单链Fv(scFv)分子;(vi) dAb片段;和(vii) 最小识别单位,其由模拟抗体高变区(例如,分离的互补性决定区(CDR),如CDR3肽)的氨基酸残基构成,或者由受限制的(constrained)FR3-CDR3-FR4肽构成。其它工程化分子,例如域特异性抗体、单域抗体、域缺失抗体、嵌合抗体、CDR嫁接抗体、双抗体、三抗体、四抗体、微型抗体(minibodies)、纳米抗体(nanobodies)(例如,一价纳米抗体,二价纳米抗体等)、小模块免疫药物(SMIP),和鲨鱼可变IgNAR结构域,也包括在本文所使用的表述“抗原结合片段”和“抗原结合蛋白”中。

[0054] 抗体的抗原结合片段一般包括至少一个可变域。可变域可以是任何大小或者氨基酸组成,并且一般包括至少一个CDR,其与一个或多个框架序列紧邻或合框。在具有与 V_L 结构域相缔合的 V_H 结构域的抗原结合片段中, V_H 和 V_L 结构域可以任何合适的安排彼此相对排布。例如,可变区可以是二聚体的并且包含 V_H - V_H , V_H - V_L 或 V_L - V_L 二聚体。或者,抗体的抗原结合片段可包含单体的 V_H 或 V_L 结构域。

[0055] 在某些实施方案中,抗体的抗原结合片段可以包含至少一个可变域,其与至少一个恒定域共价连接。可以在本发明抗体的抗原结合片段中发现的可变和恒定域的非限制性示例配置包括:(i) V_H - C_{H1} ;(ii) V_H - C_{H2} ;(iii) V_H - C_{H3} ;(iv) V_H - C_{H1} - C_{H2} ;(v) V_H - C_{H1} - C_{H2} - C_{H3} ;(vi) V_H - C_{H2} - C_{H3} ;(vii) V_H - C_L ;(viii) V_L - C_{H1} ;(ix) V_L - C_{H2} ;(x) V_L - C_{H3} ;(xi) V_L - C_{H1} - C_{H2} ;(xii) V_L - C_{H1} - C_{H2} - C_{H3} ;(xiii) V_L - C_{H2} - C_{H3} ;和(xiv) V_L - C_L 。在可变和恒定域的任何配置,包括上面列举的任何示例配置中,可变和恒定域可以直接彼此连接,或者可以通过完全的或部分的铰链或接头区域相连。铰链区可以包括至少2个(例如,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,20,

25, 30, 35, 40, 50, 60或更多个)氨基酸,其在单个多肽分子的相邻可变和/或恒定域之间形成一个柔性或半柔性连接。而且,本发明抗体的抗原结合片段可以包括具有任何上文列举的可变和恒定区结构域配置的同质二聚体或异质二聚体,彼此之间或者与一个或多个单体 V_H 或 V_L 结构域非共价缔合(例如,通过二硫键)。

[0056] 与全抗体分子同样,抗原结合片段可以是单特异性或多特异性的(例如,双特异性)。抗体的多特异性抗原结合片段通常包括至少两个不同的可变域,其中每个可变域能够特异性结合各别的抗原或者同一抗原上的不同表位。任何多特异性抗体形式,包括本文公开的示例性双特异性抗体形式,均可使用本领域可得的常规技术加以调适而用于本发明抗体的抗原结合片段的环境。

[0057] 抗体的恒定区在抗体固定补体并介导细胞依赖的细胞毒性中是重要的。因此,抗体的同种型可以根据其是否适合于抗体介导细胞毒加以选择。

[0058] 如本文所使用的,术语“人抗体”意图包括具有来自人种系免疫球蛋白序列的可变和恒定区的抗体。本发明的人抗体可以仍然包括不是由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,通过体外随机或定点突变、或者通过体内体细胞突变所引入的突变),例如在CDR中,特别是在CDR3中包含。然而,如本文所使用的,术语“人抗体”并不意图包括这样的抗体:其中来自另一种哺乳动物种系(例如小鼠)的CDR序列被移植到人构架序列上。

[0059] 如本文所使用的,术语“重组人抗体”意在包括所有通过重组方法制备、表达、产生或分离的人抗体,例如使用转染进入宿主细胞中的重组表达载体表达的抗体(在下文将进一步描述),从重组组合人抗体文库分离的抗体(在下文将进一步描述),从人免疫球蛋白基因转基因动物(例如小鼠)分离的抗体(参见例如Taylor等(1992)Nucl.Acids Res.20:6287-6295),或者通过任何其它涉及将人免疫球蛋白基因序列剪接到其它DNA序列中的手段制备、表达、产生或分离的抗体。这样的重组人抗体具有来源于人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区。然而,在某些实施方案中,这样的重组人抗体接受体外诱变(或者,当使用人Ig序列的转基因动物时,发生体内体细胞诱变),从而使重组抗体 V_H 和 V_L 区的氨基酸序列是这样的序列:虽然它们来源于人种系 V_H 和 V_L 序列且与之近缘,但可能不是在体内人抗体种系库中天然存在的。

[0060] 人抗体可以以两种与铰链异质性相关的形式存在。在一种形式中,免疫球蛋白分子构成约150-160kDa的稳定的四链构建体,在该构建体中各二聚体通过链间重链二硫键保持在一起。在第二种形式中,二聚体不通过链间二硫键连接,由共价偶联的一条轻链和一条重链构成一个约75-80kDa的分子(半抗体)。这些形式极难分离,即使是经过亲和纯化之后。

[0061] 在各种完整的IgG同种型中经常出现第二种形式是由于,但不仅限于,与抗体的铰链区同种型相关的结构差异。在人IgG4铰链的铰链区中单个氨基酸的取代即可能将第二种形式的出现显著降低到使用人IgG1铰链时通常可见的水平(参见例如Angal等(1993)Molecular Immunology 30:105)。本发明包括在铰链、CH2或CH3中具有一个或多个突变的抗体,这样的抗体在例如生产中是理想的,可以提高期望抗体形式的产量。

[0062] 如本文所使用的,“分离的抗体”意思是已被鉴定,并与其自然环境的至少一个组分分离和/或从其自然环境的至少一个组分回收的抗体。例如,为本发明的目的,“分离的抗体”是与生物体至少一个组分分离或回收,或者从自然存在或自然产生抗体的组织或细胞中分离或回收的抗体。分离抗体还包括重组细胞内的原位抗体。分离的抗体是经历了至少

一个纯化或分离步骤的抗体。根据某些实施方案,分离的抗体可以基本上没有其它细胞材料和/或化合物。

[0063] 术语“特异性结合”,或类似的表述,意思是抗体或抗原结合蛋白与抗原形成在生理条件下相对稳定的复合物。用于确定抗体是否特异性结合抗原的方法是本领域熟知的,并且包括,例如,平衡透析、表面等离子体共振等。例如,在本发明的上下文中使用的,“特异性结合”PCSK9的抗体包括如下的抗体,通过表面等离子共振测定测量,其结合PCSK9或其部分的 K_D 小于约1000nM,小于约500nM,小于约300nM,小于约200nM,小于约100nM,小于约90nM,小于约80nM,小于约70nM,小于约60nM,小于约50nM,小于约40nM,小于约30nM,小于约20nM,小于约10nM,小于约5nM,小于约4nM,小于约3nm,小于约2nM,小于约1nM或小于约0.5nM。然而,特异性结合人类PCSK9的分离抗体可以和其它抗原,例如来自其他(非人类)物种的PCSK9分子具有交叉反应性。

[0064] 本文中给出了示例性、非限制性的PCSK9抑制剂,包括例如在下列文献中描述的抑制剂:美国专利申请公开号US20130115223,US20130071405,US20130064834,US20130064825,US20120122954,US20120015435,US20110313024,US 20110015252,US20110230542,US20110009628,和美国系列号61/682,349,本文引入其全部内容。在一些实施方案中,PCSK9抑制剂是抗体,包括具有国际公开号W02011/072263中描述的Ab“LGT209”的VH/VL序列的抗体;具有在国际公开号W02010/029513中描述的Ab“L1L3”的VH/VL序列的抗体;具有在国际公开号W02011/111007中描述的Ab“5L1721H23_6L3”的VH/VL序列的抗体;具有在国际公开号W02011/111007中描述的Ab“5L1721H23_6L3H3”的VH/VL序列的抗体;具有在国际公开号W02009/026558中描述的Ab“31H4”的VH/VL序列的抗体;具有在美国专利公开号US 2009/0232795中描述的Ab“1B20”的VH/VL序列的抗体;具有在美国专利申请公开号US 2009/0142352中描述的Ab“21B12”的VH/VL序列的抗体;具有在美国专利申请公开号US 2012/0195910中描述的Ab“508.20.28”的VH/VL序列的抗体;或者具有在美国专利申请公开号US 2012/0195910中描述的Ab“508.20.33”的VH/VL序列的抗体。

[0065] 可用于本发明方法和组合物的抗-PCSK9抗体与该抗体所来源的相应种系序列相比,可以在重链和轻链可变域的框架和/或CDR区中包含一个或多个氨基酸取代、插入和/或缺失。这样的突变可以通过比较本文公开的氨基酸序列与种系序列,例如可以从例如公开的抗体序列库得到的种系序列来容易地确定。本发明包括涉及使用这样的抗体和其抗原结合片段的方法:它们源自本文中公开的任何氨基酸序列,其中一个或多个框架和/或CDR区内的一个或多个氨基酸被突变成抗体所来源种系序列的相应残基,或者突变成另一种人种系序列的相应残基,或者突变成相应种系残基的保守氨基酸取代(这样的序列改变在本文中被统称为“种系突变”)。本领域的普通技术人员从本文公开的重链和轻链可变区序列出发可以容易地产生许多包含一个或多个单个的种系突变或它们的组合的抗体和抗原结合片段。在某些实施方案中,VH和/或VL结构域之内的所有框架和/或CDR残基被突变回在该抗体所来源的原始种系序列中发现的残基。在其他实施方案中,只有某些残基被突变回原始种系序列,例如,只有在FR1的前8个氨基酸或FR4的后8个氨基酸中发现的突变残基,或者只有在CDR1,CDR2或CDR3中发现的突变残基。在其他实施方案中,一个或多个框架和/或CDR残基被突变成不同种系序列(即,与该抗体原始来源的种系序列不同的种系序列)的相应残基。此外,本发明的抗体可以在框架和/或CDR区内包含2个或更多个种系突变的任何组合,

例如,其中某些个别残基突变成特定种系序列的相应残基,而与原始种系序列不同的某些其它残基被保持或者被突变成不同种系序列的相应残基。一旦获得包含一个或多个种系突变的抗体和抗原结合片段,可以容易地测试其一种或多种期望性质,例如,改善的结合特异性,提高的结合亲和力,改善的或增强的拮抗性或激动性生物学性质(视情况而定),降低的免疫原性,等等。以这种一般方式获得的抗体和抗原结合片段的使用涵盖在本发明之内。

[0066] 本发明还包括涉及使用抗-PCSK9抗体的方法,所述抗-PCSK9抗体包括本文所公开的HCVR,LCVR,和/或CDR氨基酸序列的任何具有一个或多个保守取代的变体。例如,本发明包括使用这样的抗-PCSK9抗体,与本文公开的任何HCVR,LCVR,和/或CDR氨基酸序列相比,其HCVR;LCVR;CDR;HCVR和LCVR;HCVR和CDR;LCVR和CDR;或HCVR,LCVR和CDR氨基酸序列具有例如10个或更少,9个或更少,8个或更少,7个或更少,6个或更少,5个或更少,4个或更少,3个或更少,2个或更少,或者1个保守氨基酸取代。在某些实施方案中,取代位于CDR氨基酸序列中,例如CDR1,CDR2和/或CDR3。在其他实施方案中,取代位于CDR氨基酸序列中。

[0067] 如本文所使用的,术语“表面等离子体共振”是指一种光学现象,借助该现象,可以通过检测生物传感器基质内蛋白质浓度的变化来分析实时相互作用,例如使用Biacore™系统(Biacore Life Sciences division of GE Healthcare,Piscataway,NJ)。

[0068] 如本文所使用的,术语“ K_D ”意图指特定抗体-抗原相互作用的平衡解离常数。

[0069] 术语“表位”是指一种抗原决定簇,其与抗体分子可变区内的特定抗原结合位点(称作互补位)相互作用。单个抗原可具有一个以上的表位。因此,不同的抗体可结合某个抗原上不同的区域,并且可以具有不同的生物学效应。表位可以是构象表位或线性表位。构象表位是来自线性多肽链不同区段的氨基酸在空间上并置而产生的。线性表位是由多肽链中相邻的氨基酸残基产生的。在某些情况下,表位可以包括抗原上的糖、磷酸基、或磺酰基等部分。

[0070] 根据某些实施方案,本发明方法中使用的抗-PCSK9抗体是具有pH依赖的结合特性的抗体。如本文所使用的,表述“pH依赖的结合”意思是抗体或抗原结合蛋白显示“与中性pH相比,在酸性pH下与PCSK9的结合降低”(为本公开的目的,两种表述可以互换使用)。例如,具有“pH依赖的结合特性”的抗体包括在中性pH下结合PCSK9的亲和力比在酸性pH下更高的抗体及其抗原结合片段。在某些实施方案中,本发明的抗体及抗原结合片段在中性pH下与PCSK9结合的亲和力是在酸性pH下的至少3,5,10,15,20,25,30,35,40,45,50,55,60,65,70,75,80,85,90,95,100倍,或更多倍。

[0071] 根据本发明的这个方面,具有pH依赖的结合特性的抗-PCSK9抗体与亲本抗-PCSK9抗体相比可以具有一个或多个氨基酸变异。例如,具有pH依赖的结合特性的抗-PCSK9抗体可以含有一个或多个组氨酸取代或插入,例如在亲本抗-PCSK9抗体的一个或多个CDR中有一个或多个组氨酸取代或插入。因此,根据本发明的某些实施方案提供这样的方法:其包括施用抗-PCSK9抗体,所述抗体包含与亲本抗-PCSK9抗体的CDR氨基酸序列相同的CDR氨基酸序列(例如,重链和轻链CDR),只是亲本抗体的一个或多个CDR的一个或多个氨基酸被组氨酸取代。具有pH依赖的结合特性的抗-PCSK9抗体可具有例如1,2,3,4,5,6,7,8,9,或更多个组氨酸取代,这些取代可以在亲本抗体的单个CDR中或者分布于亲本抗-PCSK9抗体的多个(例如2,3,4,5,或6个)CDR中。例如,本发明包括使用具有pH依赖的结合特性的抗-PCSK9抗体,其在亲本抗-PCSK9抗体的HCDR1中含有一个或多个组氨酸取代,HCDR2中含有一个或多

个组氨酸取代, HCDR3中含有一个或多个组氨酸取代, LCDR1中含有一个或多个组氨酸取代, LCDR2中含有一个或多个组氨酸取代, 和/或LCDR3中含有一个或多个组氨酸取代。

[0072] 如本文所使用的, 表述“酸性pH”意思是pH小于6.0或更低(例如, 小于约6.0, 小于约5.5, 小于约5.0, 等)。表述“酸性pH”包括如下的pH值: 约6.0, 5.95, 5.90, 5.85, 5.8, 5.75, 5.7, 5.65, 5.6, 5.55, 5.5, 5.45, 5.4, 5.35, 5.3, 5.25, 5.2, 5.15, 5.1, 5.05, 5.0, 更更低。如本文所使用的, 表述“中性pH”意思是pH为约7.0-约7.4。表述“中性pH”包括如下pH值: 约7.0, 7.05, 7.1, 7.15, 7.2, 7.25, 7.3, 7.35, 和7.4。

[0073] 人抗体的制备

[0074] 用于在转基因小鼠中产生人抗体的方法是本领域已知的。任何这样的已知方法均可在本发明的语境中用于制造特异性结合人PCSK9的人抗体。

[0075] 使用VELOCIMMUNE™技术(见例如US 6,596,541, Regeneron Pharmaceuticals)或者任何其他已知用于产生单克隆抗体的方法, 首先分离出具有人可变区和小鼠恒定区的PCSK9高亲和力嵌合抗体。VELOCIMMUNE®技术涉及产生具有如下基因组的转基因小鼠, 该基因组包括与内源小鼠恒定区基因座可操作连接的人重链和轻链可变区, 使得小鼠响应抗原刺激而产生包含人可变区和小鼠恒定区的抗体。分离编码抗体重链和轻链可变区的DNA并将其与编码人重链和轻链恒定区的DNA可操作连接。然后, 在能够表达完全人抗体的细胞中表达该DNA。

[0076] 一般地, 用感兴趣的抗原刺激 VELOCIMMUNE®小鼠, 从表达抗体的小鼠中回收淋巴细胞(例如B细胞)。可以将淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合以制备永生的杂交瘤细胞系, 并对这些杂交瘤细胞系进行筛选和选择, 以鉴定产生特异针对感兴趣抗原的抗体的杂交瘤细胞系。可以分离编码重链和轻链可变区的DNA, 并将其与期望的重链和轻链同种型恒定区连接。这样的抗体蛋白可以在细胞内, 在例如CHO细胞内产生。或者, 可以直接从抗原特异性淋巴细胞分离编码抗原特异性嵌合抗体或轻链和重链可变域的DNA。

[0077] 首先, 分离具有人可变区和小鼠恒定区的高亲和力嵌合抗体。使用本领域技术人员已知的标准程序对抗体进行表征, 并根据期望的特性, 包括亲和性、选择性、表位等, 加以选择。将小鼠恒定区用期望的人恒定区代替, 从而产生本发明的完全人抗体, 例如野生型或修饰的IgG1或IgG4。所选用的恒定区可以根据特定的用途而改变, 而高亲和力的抗原结合和靶特异性等特征存在于可变区中。

[0078] 一般地, 可以在本发明的方法中使用的抗体, 当通过与固定在固相上的或者位于溶液相中的抗原的结合进行测量时, 具备高亲和力。将小鼠的恒定区替换为期望的人恒定区, 从而产生本发明的完全人抗体。选用的恒定区可以根据特定的用途而改变, 但是高亲和力抗原结合和靶特异性等特征存在于可变区中。

[0079] 可以在本发明方法的环境中使用的、特异性结合PCSK9的人抗体或抗体的抗原结合片段的具体实例包括任何这样的抗体或抗原结合片段: 其包括具有选自SEQ ID NO:1和11的氨基酸序列的重链可变区(HCVR)内所包含的三个重链CDR(HCDR1, HCDR2和HCDR3), 或者与其具有至少90%, 至少95%, 至少98%, 至少99%的序列同一性的基本上相似的序列。或者, 可以在本发明方法的语境中使用的、特异性结合PCSK9的人抗体或抗体的抗原结合片段的具体实例包括任何这样的抗体或抗原结合片段, 其包括在具有选自SEQ ID NO:37, 45, 53, 61, 69, 77, 85, 93, 101, 109, 117, 125, 133, 141, 149, 157, 165, 173, 181, 和189的氨基酸序

列的重链可变区 (HCVR) 内包含的三个重链CDR (HCDR1, HCDR2和HCDR3), 或者与其具有至少90%, 至少95%, 至少98%, 至少99%的序列同一性的基本上相似的序列。该抗体或抗原结合片段可以包括在具有选自SEQ ID NO:6和15的氨基酸序列的轻链可变区 (LCVR) 内所含的三个轻链CDR (LCVR1, LCVR2, LCVR3), 或者与其具有至少90%, 至少95%, 至少98%, 至少99%的序列同一性的基本上相似的序列。或者, 可以在本发明方法的语境中使用的、特异性结合PCSK9的人抗体或抗体的抗原结合片段的具体实例包括任何如下所述的抗体或抗原结合片段, 其包括在具有选自SEQ ID NO:41, 49, 57, 65, 73, 81, 89, 97, 105, 113, 121, 129, 137, 145, 153, 161, 169, 177, 185和193的氨基酸序列的轻链可变区 (LCVR) 内所含的三个轻链CDR (LCVR1, LCVR2, LCVR3), 或者与其具有至少90%, 至少95%, 至少98%, 至少99%的序列同一性的基本上相似的序列。

[0080] 使用最佳序列比对确定两条氨基酸序列之间在参考氨基酸序列 (即以SEQ ID NO标识的氨基酸序列) 全长上的序列同一性, 和/或在两条氨基酸序列的最佳序列比对区域上的序列同一性, 其中最佳序列比对可以用本领域已知的工具获得, 例如Align, 使用标准设定, 优选地下述设定: EMBL:needle, Matrix:Blosum62, Gap Open 10.0, Gap Extend 0.5。

[0081] 在本发明的某些实施方案中, 抗体或抗原结合蛋白包括选自下组的重链和轻链可变区氨基酸序列对 (HCVR/LCVR) 的6个CDR (HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2和LCDR3): SEQ ID NO:1/6和11/15。或者, 在本发明的某些实施方案中, 抗体或抗原结合蛋白包括选自下组的重链和轻链可变区氨基酸序列对 (HCVR/LCVR) 的6个CDR (HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2和LCDR3): SEQ ID NOs:37/41, 45/49, 53/57, 61/65, 69/73, 77/81, 85/89, 93/97, 101/105, 109/113, 117/121, 125/129, 133/137, 141/145, 149/153, 157/161, 165/169, 173/177, 181/185, 和189/193。

[0082] 在本发明的某些实施方案中, 可以在本发明的方法中使用的抗-PCSK9抗体或抗原结合蛋白具有选自下组的HCDR1/HCDR2/HCDR3/LCDR1/LCDR2/LCDR3氨基酸序列: SEQ ID NOs:2/3/4/7/8/10 (mAb316P) 和12/13/14/16/17/18 (mAb300N) (参见美国专利申请公开号2010/0166768) 和12/13/14/16/17/18, 其中SEQ ID NO:16在氨基酸残基30包含组氨酸取代亮氨酸 (L30H)。

[0083] 在本发明的某些实施方案中, 抗体或抗原结合蛋白包括选自下组的HCVR/LCVR氨基酸序列对: SEQ ID NO:1/6和11/15。在某些示例性实施方案中, 抗体或抗原结合蛋白包括SEQ ID NO:1的HCVR氨基酸序列和SEQ ID NO:6的LCVR氨基酸序列。在某些示例性实施方案中, 抗体或抗原结合蛋白包括SEQ ID NO:11的HCVR氨基酸序列和SEQ ID NO:15的LCVR氨基酸序列。在某些示例性实施方案中, 抗体或抗原结合蛋白包括SEQ ID NO:11的HCVR氨基酸序列和SEQ ID NO:15的LCVR氨基酸序列, 其中在氨基酸残基30包含亮氨酸到组氨酸的取代 (L30H)。

[0084] 在某些实施方案中, 抗体或抗原结合蛋白在每周皮下注射APOE*3Leiden.CETP小鼠时显示如下的一种或多种性质:

[0085] a. 与未处理对照相比, 以3mg/kg施用使总胆固醇水平减少约37%;

[0086] b. 与未处理对照相比, 以10mg/kg施用使总胆固醇水平减少约46%;

[0087] c. 与未处理对照相比, 以3mg/kg与3.6mg/kg/日的阿托伐他汀组合施用使总胆固醇

醇水平减少约48%；

[0088] d. 与未处理对照相比,以10mg/kg与3.6mg/kg/日的阿托伐他汀组合施用使总胆固醇水平减少约58%；

[0089] e. 与单独用3.6mg/kg/日阿托伐他汀处理相比,以3mg/kg与3.6mg/kg/日阿托伐他汀组合施用使总胆固醇水平减少约36%；

[0090] f. 与单独用3.6mg/kg/日阿托伐他汀处理相比,以10mg/kg与3.6mg/kg/日阿托伐他汀组合施用使总胆固醇水平减少约48%；

[0091] g. 与未处理对照相比,以3mg/kg施用使甘油三酯水平减少约33%；

[0092] h. 与未处理对照相比,以10mg/kg施用使甘油三酯水平减少约36%；

[0093] i. 与用3.6mg/kg/日阿托伐他汀处理相比,以3mg/kg与3.6mg/kg/日阿托伐他汀组合施用使甘油三酯水平减少约40%；

[0094] j. 与单独用3.6mg/kg/日阿托伐他汀处理相比,以10mg/kg与3.6mg/kg/日阿托伐他汀组合施用使甘油三酯水平减少约51%；

[0095] k. 与未处理对照相比,以3mg/kg施用使肝脏LDLR表达增加约88%；

[0096] l. 与未处理对照相比,以10mg/kg施用使肝脏LDLR表达增加约178%；

[0097] m. 与单独用3.6mg/kg/日阿托伐他汀处理相比,以3mg/kg与3.6mg/kg/日阿托伐他汀组合施用使肝脏LDLR表达增加约71%；

[0098] n. 与单独用3.6mg/kg/日阿托伐他汀处理相比,以10mg/kg与3.6mg/kg/日阿托伐他汀组合施用使肝脏LDLR表达增加约140%；

[0099] o. 与未处理对照相比,以3mg/kg施用使动脉粥样硬化病变尺寸减少约70%；

[0100] p. 与未处理对照相比,以10mg/kg施用使动脉粥样硬化病变尺寸减少约87%；

[0101] q. 与未处理对照相比,以3mg/kg与3.6mg/kg/日阿托伐他汀组合施用使动脉粥样硬化病变尺寸减少约88%；

[0102] r. 与未处理对照相比,以10mg/kg与3.6mg/kg/日阿托伐他汀组合施用使动脉粥样硬化病变尺寸减少约98%；

[0103] s. 与单独用3.6mg/kg/日阿托伐他汀处理相比,以3mg/kg与3.6mg/kg/日阿托伐他汀组合施用使动脉粥样硬化病变尺寸减少约82%；

[0104] t. 与单独用3.6mg/kg/日阿托伐他汀处理相比,以10mg/kg与3.6mg/kg/日阿托伐他汀组合施用使动脉粥样硬化病变尺寸减少约97%；

[0105] u. 与单独用3.6mg/kg/日阿托伐他汀处理相比,以3mg/kg施用使甘油三酯水平减少约72%；

[0106] v. 与单独用3.6mg/kg/日阿托伐他汀处理相比,以10mg/kg施用使甘油三酯水平减少约79%；

[0107] w. 与单独用3.6mg/kg/日阿托伐他汀处理相比,以3mg/kg施用使总胆固醇水平减少约22%；

[0108] x. 与单独用3.6mg/kg/日阿托伐他汀处理相比,以10mg/kg施用使总胆固醇水平减少约34%；

[0109] y. 与未处理对照相比,以3mg/kg施用使无病主动脉区段百分比增加约236%；

[0110] z. 与未处理对照相比,以10mg/kg施用使无病主动脉区段百分比增加约549%；

[0111] aa.与对照相比,以3mg/kg与3.6mg/kg/日阿托伐他汀组合施用使无病主动脉区段百分比增加约607%;和

[0112] bb.与对照相比,以10mg/kg与3.6mg/kg/日阿托伐他汀组合施用使无病主动脉区段百分比增加约1118%。

[0113] 药物组合物和施用方法

[0114] 本发明包括方法,其包括向受试者施用PCSK9抑制剂,其中该PCSK9抑制剂包含在药物组合物内。本发明的药物组合物用合适的载体、赋形剂和其它可提供合适转移、递送、耐受性等的试剂配制而成。在所有药物化学家公知的配方集:Remington's Pharmaceutical Sciences,Mack Publishing Company,Easton,PA中可以找到许多合适的配制剂。这些配制剂包括,例如,粉剂,糊剂,软膏,凝胶剂,蜡,油,脂质,包含囊泡的脂质(阳离子或阴离子)(例如LIPOFECTIN™),DNA缀合物,无水吸收糊剂,油包水和水包油乳剂,乳剂碳蜡(各种分子量的聚乙二醇),半固体凝胶和含有碳蜡的半固体混合物。另见Powell等"Compendium of excipients for parenteral formulations"PDA(1998)J Pharm Sci Technol 52:238-311。

[0115] 各种递送系统是已知的,并可用于施用本发明的药物组合物,例如包裹在脂质体,微粒,微胶囊,能够表达突变病毒的重组细胞,受体介导的内吞作用(参见,例如,Wu等,1987,J.Biol.Chem.262:4429-4432)。施用方法包括,但不仅限于,皮内、肌肉、腹膜内、静脉内、皮下、鼻内、硬膜外、吸入和口服途径。组合物可以通过任何方便的途径施用,例如通过灌注或推注(bolus injection),通过上皮或粘膜皮肤内层(例如,口腔粘膜,直肠和肠粘膜等)吸收施用,并且可以和其他生物活性剂一起施用。

[0116] 本发明的药物组合物可以用标准针筒皮下或静脉内递送。此外,笔式递送装置和自动注射器递送装置容易用于递送本发明的药物组合物。这样的递送装置可以是可重复使用的或者一次性的,并且可以被修改施用可变的剂量或固定剂量。可重复使用的递送装置通常利用含有药物组合物的可更换的针筒。一旦针筒内的全部药物组合物被施用,针筒变成空的,则可以容易地丢弃空针筒并用含有该药物组合物的新针筒代替。然后,该递送装置可以重复使用。在一次性递送装置中,没有可以更换的针筒。取而代之的是,该一次性递送装置自带预先填充在该装置贮存器内的药物组合物。一旦贮存器内的药物组合物排空,则丢弃整个装置。适合于可变剂量的递送装置可以包括用于将剂量设定在一定剂量体积范围内的机构(在某些情况下,该范围可以被限制在小于针筒可容纳总体积的值)。适合于固定剂量的递送装置可以包括在递送装置致动时递送针筒的总体积的机构。在这种情况下,针筒可以是预填充注射器。

[0117] 许多递送装置可用于递送本发明的药物组合物。实例包括,但不仅限于:AUTOPEN™(Owen Mumford,Inc.,Woodstock,UK),DISETRONICTM笔(Disetronic Medical Systems,Bergdorf,Switzerland),HUMALOG MIX 75/25¹m笔,HUMALOGTM笔,HUMALIN 70/30TM笔(Eli Lilly and Co.,Indianapolis,IN),NOVOPENTM I,II和III(Novo Nordisk,Copenhagen,Denmark),NOVOPEN JUNIORTM(Novo Nordisk,Copenhagen,Denmark),BDTM笔(Becton Dickinson,Franklin Lakes,NJ),OPTIPENTM,OPTIPEN PROTM,OPTIPEN STARLETTM,和OPTICLIKTM(sanofi-aventis,Frankfurt,Germany),仅举几例。可用于皮下递送本发明药物组合物的一次性笔递送装置的实例包括,但不仅限于:SOLOSTARTM笔(sanofi-aventis),

FLEXPEN™ (Novo Nordisk), 和 KWIKPEN™ (Eli Lilly), SURECLICK™ Autoinjector (Amgen, Thousand Oaks, CA), PENLET™ (Haselmeier, Stuttgart, Germany), EPIPEN (Dey, L.P.), 和 HUMIRA™ 笔 (Abbott Labs, Abbott Park IL), 仅举几例。在一些实施方案中, 可重复使用的笔或自动注射器可递送固定的剂量。在其他实施方案中, 可重复使用的笔或自动注射器可以递送可变的剂量。在不同的实施方案中, 可重复使用的笔或自动注射器可以递送单个剂量或多个剂量。

[0118] 在某些实施方案中, 药物组合物用控释系统递送。在某些实施方案中, 可以使用泵 (参见 Langer, 同上; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201), 包括微型泵。在另一个实施方案中, 可以使用聚合物材料; 参见 Medical Applications of Controlled Release, Langer 和 Wise (编), 1974, CRC Pres., Boca Raton, Florida。在另一个实施方案中, 控释系统可以放置在组合物的靶标的附近, 从而只需要全身剂量的一小部分 (见, 例如, Goodson, 1984, 收录于 Medical Applications of Controlled Release, 同上, 第2卷, 第115-138页)。其它控释系统在 Langer, 1990, Science 249:1527-1533 的综述中有讨论。

[0119] 可注射制剂可以包括如下剂型: 静脉内、皮下、皮内和肌内注射、点滴输注等。这些可注射制剂可以通过已知方法制备。例如, 可注射制剂可以如下地制备: 例如, 通过在无菌含水介质或常规用于注射的油性介质中溶解、悬浮或乳化上述抗体或其盐。用于注射剂的含水介质有例如生理盐水、含有葡萄糖和其它辅剂的等渗溶液等, 其可以和适当的增溶剂组合使用, 增溶剂例如醇 (例如, 乙醇)、多元醇 (例如, 丙二醇, 聚乙二醇)、非离子表面活性剂 [例如, 聚山梨酯 80、HCO-50 (氢化蓖麻油的聚氧乙烯 (50mol) 加合物) 等。作为油性介质, 可以采用例如芝麻油、大豆油等, 其可以和, 例如苯甲酸苄酯、苄醇等增溶剂组合使用。这样制备的注射剂被填充在合适的安瓿中。

[0120] 有利地, 用于上述口服或胃肠外使用的药物组合物被制备成单位剂量的剂量形式, 其适合于活性成分的剂量。如本文所使用的, “单位剂型” 是指物理上分散的、适合作为用于人和/或动物受试者的单一剂量的单位, 每个单位含有预定量的活性物质 (即 PCSK9 抑制剂), 该预定量经过计算可以和药物稀释剂、载体或溶媒一起产生期望的治疗效果。在一些实施方案中, PCSK9 抑制剂是抗体或抗原结合蛋白, 且单位剂型包括 75mg, 150mg, 200mg, 或 300mg 的抗体或抗原结合蛋白。液体药物组合物的合适单位剂型的实例包括施药器 (applicator), 例如小瓶, 注射器, 包括预充式注射器和可重复使用的注射器, 自动注射器, 包括预填充式自动注射器和可重复使用的自动注射器, 药筒, 和安瓿; 其它合适的单位剂型包括片剂、丸剂、胶囊剂、栓剂、硅片、任何分离的多个前述者, 以及本文所述的或本领域一般已知的其他形式。单位剂型可以被气密封。对于在施药器内包含药物组合物的单位剂型, 在施药器上可以指示 PCSK9 抑制剂的量。

[0121] 本发明包括如下的制品或试剂盒, 其包括 (a) 一个或多个含有本发明药物组合物的单位剂型, 和 (b) 容器或包装。该制品或试剂盒可以进一步包括 (c) 带有使用说明书的标签或包装插页。在一些实施方案中, 该制品可以进一步包括 (d) 调节血脂疗法的一个或多个单位剂型 (例如, 一板含有以 HMG-CoA 还原酶抑制剂为活性成分的药片)。

[0122] 剂量和施用方案

[0123] 根据本发明的方法和组合物施用给受试者的 PCSK9 抑制剂 (例如, 抗-PCSK9 抗体) 的量一般是治疗有效量。如本文所使用的, 短语 “治疗有效量” 是指可以导致动脉粥样硬化

病变发生可检测的降低的PCSK9抑制剂的剂量。例如,PCSK9抑制剂的“治疗有效量”包括,例如,在施用给人类患者时可以导致硬化病变面积或病变严重程度降低至少2%,5%,10%,15%,20%,25%,30%,40%,50%,60%,70%,80%,90%或更多的PCSK9抑制剂的量,例如本文的实施例所示。或者,可以使用动物模型来证实候选PCSK9抑制剂的特定量是否为治疗有效量。

[0124] 在抗-PCSK9抗体的情况下,治疗有效量可以是约0.05mg-约600mg,例如约0.05mg,约0.1mg,约1.0mg,约1.5mg,约2.0mg,约3mg,约5mg,约10mg,约15mg,约20mg,约30mg,约40mg,约50mg,约60mg,约70mg,约75mg,约80mg,约90mg,约100mg,约110mg,约120mg,约130mg,约140mg,约150mg,约160mg,约170mg,约180mg,约190mg,约200mg,约210mg,约220mg,约230mg,约240mg,约250mg,约260mg,约270mg,约280mg,约290mg,约300mg,约310mg,约320mg,约330mg,约340mg,约350mg,约360mg,约370mg,约380mg,约390mg,约400mg,约410mg,约420mg,约430mg,约440mg,约450mg,约460mg,约470mg,约480mg,约490mg,约500mg,约510mg,约520mg,约530mg,约540mg,约550mg,约560mg,约570mg,约580mg,约590mg,或约600mg的抗-PCSK9抗体。

[0125] 在某些实施方案中,抗-PCSK9抗体以75mg的剂量施用给受试者。在某些实施方案中,抗-PCSK9抗体以150mg的剂量施用给受试者。在某些实施方案中,抗-PCSK9抗体以300mg的剂量施用给受试者。

[0126] 单个剂量中含有的抗-PCSK9抗体的量可以表示为毫克抗体/千克患者体重(即mg/kg)。例如,抗-PCSK9抗体可以用约0.0001-约10mg/kg患者体重的剂量施用给患者。

[0127] 根据本发明的某些实施方案,可以在限定的时程内向受试者施用多剂PCSK9抑制剂。根据本发明这个方面的方法包括向受试者顺次施用多剂PCSK9抑制剂。如本文所使用的,“顺次施用”意思是每剂PCSK9抑制剂在不同的时间点施用给受试者,例如在不同日,之间相隔预定的时间间隔(例如,小时、天、周或月)。本发明包括这样的方法,其包括向受试者顺次施用单一初始剂量的PCSK9抑制剂,随后施用一个或多个次级剂量的PCSK9抑制剂,并且任选地施用一个或多个三级剂量的PCSK9抑制剂。

[0128] 术语“初始剂量”、“次级剂量”和“三级剂量”是指施用PCSK9抑制剂的时间次序。因此,“初始剂量”是在治疗方案开始时施用的剂量(也称作“基线剂量”);“次级剂量”是在初始剂量之后施用的剂量;“三级剂量”是在次级剂量之后施用的剂量。然而,在某些实施方案中,初始、次级和/或三级剂量中含有的PCSK9抑制剂的量在治疗周期内可以彼此并不相同(例如,合适地上调或下调)。初始、次级和三级剂量可以都含有相同量的PCSK9抑制剂。

[0129] 在某些实施方案中,每个次级和/或三级剂量在直接在先剂量之后1-30(例如1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,或更多)天施用。如本文所使用的,短语“直接在先剂量”意思是在多次施用的序列中,在施用该序列的下一个剂量之前施用给患者的PCSK9抑制剂的剂量,二者之间没有剂量。

[0130] 在某些实施方案中,该方法包括向患者施用任意数目的次级和/或三级PCSK9抑制剂剂量。例如,在某些实施方案中,只向患者施用单个次级剂量。在其他实施方案中,向患者施用2个或更多个(例如2,3,4,5,6,7,8,或更多个)次级剂量。类似地,在某些实施方案中,只向患者施用单个三级剂量。在其他实施方案中,向患者施用2个或更多个(例如2,3,4,5,6,7,8,或更多个)三级剂量。

[0131] 在涉及多个次级剂量的实施方案中,每个次级剂量可以按照与其它次级剂量相同的频率施用。例如,每个次级剂量可以在直接在先剂量之后1-29天施用给患者。类似地,在涉及多个三级剂量的实施方案中,每个三级剂量可以按照与其它三级剂量相同的频率施用。例如,每个三级剂量可以在直接在先剂量之后1-60天施用给患者。或者,施用给患者的第二和/或三级剂量的频率可以在治疗方案期间内改变。施用频率也可以在治疗期间由医生在临床检查后根据各位患者的需要进行调整。

[0132] 在某些实施方案中,抗-PCSK抗体以每2周约75mg的初始剂量施用给受试者。

[0133] 在其他实施方案中,抗-PCSK抗体以每2周约150mg的初始剂量施用给受试者。

[0134] 在一个实施方案中,在初始给药期间内施用初始剂量,之后通过测量LDL-C值以确定它是否处于或低于目标LDL-C值,由此监测受试者的LDL-C值以确定初始剂量是否应当改变成次级剂量。例如,可以开始用75mg抗体的初始剂量治疗受试者,以100毫克/分升(mg/dL)为目标LDL-C值。如果在初始剂量期间结束时受试者的LDL-C值达到该目标LDL-C值,则继续对受试者使用该初始剂量,如果没有达到目标值,则改变成次级剂量。在一个实施方案中,初始剂量是约75mg,每2周施用,目标LDL-C值是100mg/dL,如果需要的话,次级剂量是每2周150mg。例如,可以在治疗约8周后对受试者进行首次监测,如果其LDL-C值高于100mg/dL,则受试者可以上调到150mg的次级剂量,每2周施用。监测可以在整个治疗期间连续进行。在另一个实施方案中,初始剂量是每2周75mg抗体,目标LDL-C值是70mg/dL,如果没有达到目标LDL-C值,则次级剂量是每2周150mg。

[0135] 先前疗法和组合疗法

[0136] 根据某些实施方案,本发明的方法包括向这样的受试者施用包含PCSK9抗体的药物组合物,其在施用本发明药物组合物之时或者即将施用本发明药物组合物在接受治疗高胆固醇血症和/或动脉粥样硬化症的治疗方案。例如,先前已被诊断患有高胆固醇血症和/或动脉粥样硬化症的患者在施用包含抗-PCSK9抗体的药物组合物之前和/或同时可能已经被开给、并且正在采用另一种血脂调节疗法的稳定治疗方案。在其他实施方案中,受试者先前没有用血脂调节疗法治疗。

[0137] 根据某些实施方案,本发明的方法包括向受试者施用包含抗-PCSK9抗体的药物组合物作为单一疗法,而没有任何同时使用的血脂调节疗法。

[0138] 根据某些实施方案,本发明的方法还包括向受试者施用包含抗-PCSK9抑制剂的药物组合物,与另一种血脂调节疗法联合使用。

[0139] 如本文所使用的,血脂调节疗法包括,例如,(1)通过抑制3-羟基-3-甲基戊二酰(HMG)-辅酶A(CoA)还原酶而诱导细胞内胆固醇合成耗竭的作用剂,例如他汀类药物(例如,西伐他汀,阿托伐他汀,辛伐他汀,匹伐他汀,罗苏伐他汀,氟伐他汀,洛伐他汀,普伐他汀等);(2)抑制胆固醇摄取和/或胆汁酸重吸收的作用剂(例如依泽替米贝);(3)增加脂蛋白分解代谢的作用剂(例如烟酸);和/或(4)在胆固醇清除如22-羟基胆固醇中发挥作用的LXR转录因子活化剂。血脂调节疗法还包括治疗剂的固定组合,例如依泽替米贝加辛伐他汀;他汀与胆汁树脂(例如,考来烯胺,考来替泊,考来维仑);烟酸加他汀(例如洛伐他汀和烟酸);或者与其它降脂药组合,例如 ω -3-脂肪酸乙酯(例如,Omacor)。

实施例

[0140] 如下实施例的目的是为本领域的普通技术人员提供关于如何制造和使用本发明的方法和组合物的完整公开和描述,并不意图对本发明人所视为其发明的范围构成限制。

[0141] 实施例1:针对人PCSK9的人抗体的产生

[0142] 人抗-PCSK9抗体的产生如美国专利No.8,062,640所述。在下列实施例中使用的示例性PCSK9抑制剂是名为“mAb316P”、在本文中也被称作“alirocumab”的人抗-PCSK9抗体。mAb316P具有如下的氨基酸序列特征:重链可变区(HCVR)包括SEQ ID NO:1;轻链可变区(LCVR)包括SEQ ID NO:6;重链互补决定区1(HCDR1)包括SEQ ID NO:2;HCDR2包括SEQ ID NO:3;HCDR3包括SEQ ID NO:4;轻链互补决定区1(LCDR1)包括SEQ ID NO:7;LCDR2包括SEQ ID NO:8;LCDR3包括SEQ ID NO:10。

[0143] 实施例2:在具有高心血管风险的患者中实现低密度脂蛋白胆固醇目标:来自管理式医疗群体研究的结果

[0144] 背景:美国准则支持基于患者心血管(CV)风险概貌的LDL-C目标,但是,关于在特定的高CV风险条件下实现LDL-C目标的真实模式还知之甚少。

[0145] 方法:在OptumInsight IMPACT数据库(一个美国的大型多参保人出险数据库(multi-payer claims database))中鉴定了在2011年7月至2012年6月期间进行过LDL-C测量并且具有高CV风险条件的患者。将最近的LDL-C测量定义为指标日期,分等级鉴定指标前期内的高CV风险条件如下:最近发生过急性冠脉综合征(ACS,在指标日期之前的6个月内),冠脉血管事件(心肌梗塞,不稳定心绞痛住院,冠脉重建),中风,和周围血管疾病(PVD)。

[0146] 结果:总计,110,739位患者符合纳入标准。中位数(IQR)年龄为59(53-65)岁,53.7%为男性,中位数(IQR)LDL-C为116(92-143)mg/dL。在指标日期,2.7%最近有过ACS,而42.1%,9.2%,46.0%分别有过冠心病事件、中风、和PVD的证据。下表(表1)提供了在指标日期根据LDL-C水平区分的不同高CV风险条件的汇总分布。

[0147] 表1:根据LDL-C水平(mg/dL)和风险条件对患者进行分类

高 CV 风险条件 (%患者; N)	根据 LDL-C 水平(mg/dL)的%患者					
	<70	≥70 且<100	≥100 且<130	≥13 且<160	≥160	任何
最近 ACS (2.7%; 2,966)	17.2%	27.4%	26.7%	16.5%	12.1%	100.0%
[0148] 冠心病事件(42.1%; 46,616)	9.5%	25.1%	30.3%	21.4%	13.8%	100.0%
中风(9.2%; 10,240)	8.0%	23.8%	30.4%	23.5%	14.3%	100.0%
PVD (46.0%; 50,917)	6.9%	23.0%	31.8%	23.8%	14.5%	100.0%
总计(100%; 110,739)	8.3%	24.0%	30.9%	22.6%	14.1%	100.0%

[0149] 结论:在高心血管风险患者的大型同期队列中,达到了<70mg/dL(对于甚高CV风险的可选目标)或<100mg/dL的LDL-C目标者极少。虽然在具有表现更高CV风险的状态的患者中LDL-C目标的实现略有改善,其中最近有过ACS的患者达标情况最好,但是这些患者大多数仍然高于LDL-C目标。这些数据表明,有必要持续付出努力,来解决LDL-C目标实现的差距并改善高风险患者的CV结局。

[0150] 实施例3:在高心血管风险管理的医疗群体中的低密度脂蛋白胆固醇目标的实现和降脂疗法

[0151] 背景:尽管美国准则支持他汀作为一线疗法来降低LDL-C,但是关于使用他汀和其他降脂疗法(LLT)实现LDL-C目标的真实模式还知之甚少。

[0152] 方法:在OptumInsight IMPACT数据库(一个美国的大型多参保人出险数据库)中鉴定了在2011年7月至2012年6月期间进行过LDL-C测量并且具有高CV风险条件(冠状动脉事件(心肌梗死、因不稳定心绞痛住院,冠状动脉重建)、中风、和周围血管疾病)的患者。自最新近的LDL-C测量(指标日期)起评估LLT处方,并将LLT处方分类为高效力他汀(阿托伐他汀40/80mg,罗苏伐他汀20/40mg,辛伐他汀80mg),标准效力他汀(其他他汀类药物),非他汀LLT(依泽替米贝,烟酸,贝特类,胆汁酸多价螯合剂),和无LLT。

[0153] 结果:总计110,739位患者符合纳入标准。中位数(IQR)年龄为59(53-65)岁,53.7%为男性,中位数(IQR)LDL-C为116(92-143)mg/dL。在指标日期,10.8%使用高效力他汀,26.9%使用标准效力他汀,5.3%使用非他汀LLT,和57.0%没有任何LLT。下表(表2)提供了不同LLT类型在指标日期的不同LDL-C水平的总结分布。

[0154] 表2:根据LDL-C水平(mg/dL)和LLT类型对患者进行分类

LLT 类型 (%患者; N)	各 LDL-C 水平(mg/dL)的%患者					
	<70	≥70 且<100	≥100 且<130	≥130 且<160	≥160	任何
高效力他汀(10.8%; 12,014)	15.2%	33.7%	26.0%	13.7%	11.4%	100.0%
[0155] 标准效力他汀(26.9%; 29,734)	11.2%	30.1%	28.5%	18.2%	12.0%	100.0%
非他汀类 LLT (5.3%; 5,921)	12.1%	27.6%	29.8%	19.0%	11.5%	100.0%
无 LLT (57.0%; 63,070)	5.3%	19.0%	33.1%	26.7%	15.9%	100.0%
总计(100%; 110,739)	8.3%	24.0%	30.9%	22.6%	14.1%	100.0%

[0156] 结论:在高心血管风险患者的大型当代人队列(contemporary cohort)中,少数达到了<70mg/dL(对于甚高CV风险的可选目标)或<100mg/dL的LDL-C目标。而且,许多其它患者虽然接受了高效力他汀但没有达到LDL-C目标。这些数据显示,有必要不断努力改善对LLT的坚持,以及需要新的疗法以提高目标实现和CV结局。

[0157] 实施例4:针对PCSK9的单克隆抗体MAb316P剂量依赖性地降低动脉粥样硬化,诱导更加稳定的斑块表型,并增强阿托伐他汀在APOE*3Leiden.CETP转基因小鼠中的效果

[0158] 背景

[0159] 本研究的目的是研究两个剂量的mAb316P,单独或与阿托伐他汀组合,对APOE*3Leiden.CETP小鼠中血浆脂质、动脉粥样硬化发展和病变组成的影响。这是一个用于高脂血症和动脉粥样硬化的良好建立的模型,具有人家族性血B脂蛋白异常(FD)的全部特征,其特征在于残脂蛋白积累和极低密度脂蛋白(VLDL)胆固醇与LDL-C的比值增加。APOE*3Leiden小鼠与具有含apoB脂蛋白的非常快速清除的正常野生型小鼠相比,(V)LDL清除受损并且TG水平增加,并由此模拟在人体内观察到的缓慢清除。APOE*3Leiden.CETP小鼠中的脂蛋白概貌反映了FD患者对血脂调节疗法(包括他汀类、贝特类、烟酸和胆固醇酯转移蛋白(CETP)抑制剂)的类似的反应。这可以用在他汀类治疗下全部含apoB脂蛋白的亚组分中的胆固醇有相似的降低来证明。据推测,mAb316P单独可以降低动脉粥样硬化的进展,并可叠加阿托伐他汀的抗动脉粥样硬化效果。先前在APOE*3Leiden.CETP小鼠中已经观察到了阿

托伐他汀对动脉粥样硬化的抑制。

[0160] 方法

[0161] i) 动物

[0162] 使用90只雌性APOE*3Leiden.CETP转基因小鼠(9-13周龄), 在其其自然侧翼区控制下表达人CETP。在研究期间, 小鼠圈养在标准条件下, 12小时光照-黑暗循环, 自由获取食物和水。动物实验获得了The Netherlands Organization for Applied Research的机构动物护理和使用委员会(Institutional Animal Care and Use Committee)的批准。

[0163] ii) 实验设计

[0164] 小鼠接受半合成的富含胆固醇的饮食, 含有15% (w/w) 可可脂和0.15%胆固醇(西方类型饮食[WTD]; Hope Farms, Woerden, The Netherlands), 运行周期为3周, 以使血浆总胆固醇(TC)水平增加到高达~15mmol/L。在研究期间定期监视体重(BW)和食物摄入量。在基于体重、TC、血浆TG和年龄匹配之后, 小鼠(每组15只)接受单用WTD, 或者用两个剂量的mAb316P(3或10mg/kg)单独或与阿托伐他汀(3.6mg/kg/d)组合处理18周, 并添加单独用阿托伐他汀的治疗臂(arm)。MAb316P每周通过皮下注射施用一次, 阿托伐他汀添加到饮食中。计算阿托伐他汀的剂量以试图将TC减少约20%-30%。在治疗周期结束时, 所有动物通过吸入CO₂处死。分离肝脏和心脏, 以评估肝脏LDLR蛋白水平、脂质含量、动脉粥样硬化发展和斑块组成。

[0165] iii) 血浆脂质、脂蛋白分析和MAb316P水平测量

[0166] 每2-4周, 在4小时禁食之后通过尾静脉取血将血液收集在乙二胺四乙酸(EDTA)涂布的杯中, 并从血中分离血浆。使用酶学试剂盒根据制造商的实验方案确定血浆TC和TG(分别是目录号1458216和目录号1488872; Roche/Hitachi), 并计算平均血浆TC和TG水平。在治疗4、12和18周之后, 通过快速蛋白液相色谱(FPLC)分离脂蛋白后测量TC的脂蛋白分布。通过人Fc酶联免疫吸附测定法测量MAb316P水平。

[0167] iv) 肝LDLR蛋白水平

[0168] 肝组织在裂解缓冲液(50mM Tris-HCl [pH=7.4], 150mM NaCl, 0.25%脱氧胆酸, 1%NP-40 [Igepal], 1mM EDTA, 蛋白酶抑制剂混合物(cocktail) [完全的(complete), Roche], 1mM PMSF, 1mM Na₃VO₄)中匀浆, 然后4°C 6500rpm离心30分钟。细胞裂解物的蛋白浓度通过二喹啉甲酸(bicinchonic acid)蛋白测定法(Thermo Scientific)根据制造商的使用说明加以确定。通过SDS-PAGE分离50μg蛋白裂解物, 然后转移到聚偏氟乙烯膜(Millipore)上。将印迹(根据制造商的使用说明)施用于来自R&D Systems的羊抗-小鼠LDLR和来自AbD Serotec的兔抗-羊辣根过氧化物酶(HRP)或来自Sigma的小鼠抗-α-肌管蛋白和来自Cell Signaling Technologies的马抗-小鼠HRP; 印迹用West Femto Super Signal ECL(Thermo Scientific)显影, 并施用于Chemi-Doc-it成像系统。蛋白条带的强度用Image J软件量化。

[0169] v) 动脉粥样硬化的组织学评估

[0170] 分离心脏, 在福尔马林中固定, 并包埋于石蜡中。整个主动脉根部区域的横截面(每个5μm)用苏木精-根皮红-藏红花(hematoxylin-phloxin-saffron)染色。对于每只小鼠, 将间隔50μm的四个切片用于动脉粥样硬化病变的定量和定性评估。为了确定动脉粥样硬化病变的大小和严重程度, 病变根据美国心脏协会分类分成5个类别: I) 早期脂纹, II) 规

则脂纹,III)轻度斑块,IV)中度斑块,和V)重度斑块。计算每个横截面的总病变面积和病变数目以及无病节段的百分比。为了评估病变严重程度作为全部病变的百分比,将I-III型病变归类为轻度病变,IV-V型病变归类为重度病变。为了确定胸主动脉中的总斑块负荷,清洗灌注固定的主动脉(从主动脉原点到隔膜)除去血管外脂肪,纵向切开,开面固定(pinned en face),并用油红O对脂质进行染色,如Verschuren等(Arterioscler Thromb Vasc Biol.2005;25:161-167)所述。将数据对所分析的表面积进行标准化,并表示为染色面积的百分比。用Olympus BX51显微镜获取照片/图像,并用Cell D成像软件(Olympus Soft Imaging Solutions)测量病变面积。

[0171] 在主动脉根部,用小鼠抗人 α -肌动蛋白(1:800;Monosan,Uden,The Netherlands)对平滑肌细胞(SMC)进行免疫染色,用大鼠抗小鼠Mac-3(1:25;BD Pharmingen,the Netherlands)对巨噬细胞进行免疫染色,并用天狼猩红对胶原蛋白进行染色后,为重度病变(IV-V型)确定病变组成,作为病变区域的百分比。确定坏死区和胆固醇裂隙、粘附到内皮细胞上的单核细胞、主动脉根部区域的T细胞丰度和计算斑块稳定性指数(定义为,作为稳定因子的胶原和SMC面积与作为不稳定因子的巨噬细胞和坏死面积的比值),如先前Kuhnast等(J Hypertens.2012;30:107-116),Stary等(Arterioscler Thromb Vasc Biol.1995;15:1512-1531),和Kuhnast等(PLoS One.2013;8:e66467)所述。将大鼠抗小鼠CD54抗体GTX76543(GeneTex,Inc.,San Antonio,TX,USA)用于细胞间粘附分子-1(ICAM-1)的免疫染色。用具有Nuance 2多谱成像系统的Olympus BX40显微镜获取照片/图像,并用Image J软件对染色面积进行定量。

[0172] vi) 肝脂质分析和粪便排泄胆汁酸和中性固醇

[0173] 将肝组织样品在磷酸盐缓冲盐水中匀浆,并测量蛋白含量。提取脂质,并通过高效薄层色谱在硅胶板上进行分离,并用TINA2.09软件(Raytest Isotopen Messgeräte Straubenhardt,Germany)进行分析,如先前Post等(Hepatology.1999;30:491-500)所述。

[0174] 每笼圈养5只小鼠,分别在72小时和48小时的两个连续周期内收集粪便。将等份的冻干粪便于通过气相色谱确定中性和酸性固醇含量,如先前Post等(Arterioscler Thromb Vasc Biol.2003;23:892-897)所述。

[0175] vii) 流式细胞术分析

[0176] 在治疗8周之后,从新鲜血液样品中分离外周血单核细胞(PBMC),并使用流式细胞术(FACS)分析分选为GR-1+(嗜中性粒细胞/粒细胞),GR-1-(淋巴细胞/单核细胞),CD3+(T-细胞),CD19+(B-细胞)和CD11b+/Ly6C^{low}和CD11b+/Ly6C^{hi}(单核细胞)细胞。使用来自Becton Dickinson的下列缀合单克隆抗体:GR-1FITC,CD3 PerCpCy5-5,CD19 V450,CD11b APC和Ly6C PE-Cy7。

[0177] viii) 统计分析

[0178] 使用独立样本的Kruskal-Wallis检验,接着采用独立样本的Mann-Whitney U-检验非参数地计算组间差异的显著性。使用线性回归分析评估变量之间的相关性。由于动脉粥样硬化病变区域显示对血浆胆固醇暴露的平方依赖性,所以用平方根变换进行转换。使用Windows的IBM SPSS Statistics 20(SPSS,Chicago,USA)进行统计分析。所有组与对照组和阿托伐他汀组进行比较,3mg/kg mAb316P与10mg/kg mAb316P进行比较,具有或者没有阿托伐他汀。数值表示为平均值 \pm 标准差。对于单一比较,P值 <0.05 被认为是统计学显著

的。在多重比较情况下,使用Bonferroni方法确定显著性水平。在图中,对多重比较进行校正之后的显著效果通过如下指示:***与对照组比较,†††与阿托伐他汀组比较,‡‡‡是3mg/kg mAb316P与10mg/kg mAb316P比较。

[0179] 结果

[0180] i) MAb316P和阿托伐他汀单处理及其组合降低APOE*3Leiden.CETP小鼠的血浆总胆固醇和甘油三酯

[0181] 检测所有给予mAb316P的组的循环mAb316P水平,在18周研究期间的范围是5-12 μ g/mL (3mg/kg 剂量) 和12-30 μ g/mL (10mg/kg 剂量)。食用含胆固醇的WTD的APOE*3Leiden.CETP小鼠(对照组),平均血浆TC和TG水平分别达到 16.2 ± 1.8 mmol/L和 2.9 ± 0.6 mmol/L(图1A和1B)。与对照相比,mAb316P降低平均血浆TC(-37%, $P < 0.001$;-46%, $P < 0.001$)和TG(-33%, $P < 0.001$;-39%, $P < 0.001$),并且与阿托伐他汀组合可进一步降低TC(-48%, $P < 0.001$;-58%, $P < 0.001$)。与阿托伐他汀比较,两种组合治疗均可降低TC(-36%, $P < 0.001$;-48%, $P < 0.001$)和TG(-40%, $P < 0.001$;-51%, $P < 0.001$)至比单用阿托伐他汀更大的程度。在单用mAb316P(-14%, $P < 0.01$;3mg mAb316P对10mg mAb316P)和与阿托伐他汀组合(-19%, $P < 0.001$;3mg mAb316P+阿托伐他汀对10mg mAb316P+阿托伐他汀)后,TC的降低是剂量依赖的,并且在研究期间持续。在mAb316P(图1C)、阿托伐他汀及其组合(图1D)之后,TC的减少被限制于含apoB的脂蛋白。与对照组相比,在任何处理组中注意到对BW(增加)和食物摄入没有影响。

[0182] ii) MAb316P(具有和没有阿托伐他汀)通过减少低密度脂蛋白受体降解而降低血浆脂质,并减少非HDL胆固醇

[0183] 测量肝LDLR蛋白水平以验证mAb316P抑制PCSK9是否通过挽救LDLR降解来降低血浆脂质(图2A)。肝LDLR蛋白水平在单用mAb316P处理(+80%, $P < 0.01$; $+133\%$, $P < 0.01$)和与阿托伐他汀一起处理(+98%, $P < 0.001$; $+178\%$, $P < 0.05$)后增加。与单用阿托伐他汀相比,两种组合处理均将LDLR蛋白水平增加到更大的程度(+71%, $P < 0.0045$; $+140\%$, $P < 0.01$)。LDLR蛋白水平和血浆TC之间的负相关性确认LDLR参与mAb316P对TC的降低($R^2 = 0.50$, $P < 0.001$)。

[0184] 还测量了非HDL-胆固醇水平以验证mAb316P抑制PCSK9是否通过上调LDLR来降低其水平(图2B)。

[0185] iii) MAb316P不影响肝脂质和粪便胆汁酸和中性固醇排泄

[0186] 为了评价mAb316P诱导的脂蛋白代谢中的改变对肝脂质代谢和排泄到粪便的后果,测定了肝脂质和粪便中的胆汁酸及中性固醇的排泄。MAb316P不影响肝脏重量也不影响肝脏胆固醇和TG的含量,而阿托伐他汀和组合处理会导致肝脏重量(分别为-15%, $P = 0.067$;-17%, $P < 0.05$,N.S.对于多重比较修正后;-20%, $P < 0.0045$)和肝胆固醇酯(分别为-48%, $P < 0.0045$;-41%, $P < 0.0045$ 和-44%, $P < 0.05$,N.S.对于多重比较在修正后)与对照相比显著降低,而肝脏甘油三酯没有变化(表3)。胆汁酸和中性固醇的粪便排出没有因处理而改变(表4)。这些数据指示,尽管有来自血浆区室的更大的胆固醇流入,但肝脏胆固醇稳态在mAb316P和他汀类治疗过程中得到保持。

[0187] 表3:mAb316P、阿托伐他汀及其组合对肝脏脂质的影响

	肝脂质($\mu\text{g}/\text{mg}$ 蛋白)		
	FC	CE	TG
对照	11.6 ± 1.6	50.6 ± 14.0	119.2 ± 33.3
[0188] 3 mg mAb316P	$11.2 \pm 1.4 \dagger$	$48.2 \pm 8.2 \dagger\dagger\dagger$	117.7 ± 21.6
10 mg mAb316P	$11.4 \pm 2.0 \dagger$	$53.9 \pm 10.4 \dagger\dagger\dagger$	$142.1 \pm 43.0 \dagger$
阿托伐他汀	$9.5 \pm 0.9 *$	$26.2 \pm 4.8 ***$	90.6 ± 28.5
3 mg mAb316P + 阿托伐他汀	10.4 ± 1.8	$29.6 \pm 5.8 ***$	103.5 ± 36.8
10 mg mAb316P + 阿托伐他汀	10.7 ± 1.2	$28.3 \pm 9.0 *$	109.8 ± 28.8

[0189] FC: 游离胆固醇; CE: 胆固醇酯; TG: 甘油三酯

[0190] * $P < 0.05$, *** $P < 0.0045$ 与对照比较; $\dagger P < 0.05$, $\dagger\dagger\dagger P < 0.0045$ 与阿托伐他汀比较

[0191] 表4: mAb316P、阿托伐他汀及其组合对中性固醇和胆汁酸排泄的影响

	中性固醇排泄 ($\mu\text{mol}/100 \text{ g}$ 小鼠/天)	胆汁酸排泄 ($\mu\text{mol}/100 \text{ g}$ 小鼠/天)
	对照	25.8 ± 5.5
[0192] 3 mg mAb316P	$20.4 \pm 6.2 \dagger$	$14.3 \pm 2.7 \dagger$
10 mg mAb316P	$21.6 \pm 5.6 \dagger$	12.4 ± 3.2
阿托伐他汀	30.3 ± 6.5	10.7 ± 2.4
[0193] 3 mg mAb316P + 阿托伐他汀	28.6 ± 6.0	11.4 ± 2.2
10 mg mAb316P + 阿托伐他汀	27.5 ± 4.4	12.7 ± 1.6

[0194] $\dagger P < 0.05$, 与阿托伐他汀比较

[0195] iv) MAb316P 剂量依赖性地降低动脉粥样硬化发展并增强阿托伐他汀的抗动脉粥样硬化作用

[0196] 在治疗18周后, 在主动脉根部和弓部 (arch) 对mAb316P在有和没有阿托伐他汀的情况下对动脉粥样硬化发展的影响进行评估。图3显示了动脉粥样硬化病变的代表性图片, 其显示mAb316P、阿托伐他汀及其组合可降低病变的进展。为了确认动脉粥样硬化发展的减少, 对每个横截面的病变面积和病变数目 (图4A和图4B) 以及病变的严重程度 (图4C) 进行评价。对于对照组, 总病变面积为 $278 \pm 89 \times 103 \mu\text{m}^2/\text{横截面}$, 其包含 4.0 ± 0.7 个病变/横截面。与对照相比, MAb316P 剂量依赖性地降低动脉粥样硬化病变的大小 (-71% , $P < 0.001$; -88% , $P < 0.001$), 并且剂量依赖性地增强阿托伐他汀的效果 (-89% , $P < 0.001$; -98% , $P < 0.001$)。此外, mAb316P (具有和没有阿托伐他汀) 也降低病变数目 (分别为 -17% , $P < 0.05$, N.S. 对于多重比较在修正后; -30% , $P < 0.0045$ 和 -41% , $P < 0.001$; -77% , $P < 0.001$)。用mAb316P (单独或与阿托伐他汀组合) 处理的小鼠, 与对照相比具有更多的无病变节段和更少的重度 (IV-V 型) 病变。阿托伐他汀单用降低病变尺寸 (-35% , $P < 0.05$, N.S. 对于多重比较在修正后), 并将严重程度降低到较小的程度, 而对病变数目或无病节段则无影响。与阿托伐他汀单处理相比, 组合进一步降低病变大小 (-82% , $P < 0.001$; -97% , $P < 0.001$) 和病变数目 (-38% , $P < 0.001$; -76% , $P < 0.001$), 并增加无病节段的量。

[0197] 为了评价mAb316P处理对沿着主动脉的另一个容易发生动脉粥样硬化的位点的病变发展的影响, 测量主动脉弓内的斑块表面 (图4D)。在这个位点, 病变发展与主动脉根部相

比延迟。与对主动脉来源的动脉粥样硬化的作用相似,10mg/kg mAb316P单用(-67%, $P<0.05$,N.S.对于多重比较在修正后)和两个剂量与阿托伐他汀一起(-73%, $P<0.0045$;-73%, $P<0.0045$)降低总斑块面积。

[0198] 对mAb316P和阿托伐他汀的抗动脉粥样硬化作用进行评价(图5),并且观察到血浆TC水平与主动脉根部动脉粥样硬化病变面积之间的强相关性($R^2=0.84$, $P<0.001$;图5),指示胆固醇在动脉粥样硬化发展中的重要作用。

[0199] v) MAb316P减少单核细胞和T细胞募集并改进病变稳定性指数

[0200] 作为血管壁炎症的功能性标志物,计数并计算每个横截面(图7A)中附着在活化内皮上的单核细胞数目(图8A)和主动脉根部区域的T细胞数目(图8B)。在对照组中,存在 5.7 ± 4.2 粘附单核细胞和 16.7 ± 7.7 T细胞。当单独施用或者与阿托伐他汀一起施用时,更高剂量的mAb316P(10mg/kg)降低粘附单核细胞(-57%, $P<0.01$,N.S.对于多重比较在修正后,和-75%, $P<0.001$)和T细胞丰度(-37%, $P<0.05$,N.S.对于多重比较在修正后,和-62%, $P<0.001$)。为了进一步研究mAb316P降低单核细胞粘附的机制,通过免疫组化评估了内皮ICAM-1表达(图8C)。对于对照,39%的内皮对ICAM-1呈阳性,相比于10mg/kg mAb316P单处理之后为19%($P<0.001$),而与阿托伐他汀组合给予时为16%($P<0.001$)。因此,mAb316P单独或与阿托伐他汀组合处理之后单核细胞粘附的减少由内皮细胞中粘附分子表达的减少证实。

[0201] 在研究了病变形态之后,在重度病变(IV-V型)中分析处理对斑块组成的影响,所述重度病变被认为是最脆弱的病变,如图6的代表性图片所示。为了证明斑块稳定性并不总是依赖于病变的大小,包含了对照组和mAb316P组的相似尺寸病变的代表性图片。对病变巨噬细胞面积(图7A左)+病变坏死核心面积(包括胆固醇裂隙)(图7A右)作为不稳定因子进行定量,而纤维化帽中的SMC(图7B左)和胶原面积(图7B右)作为稳定因子进行定量。所有均表示为总病变区域的百分比。对照组中的病变包括10.3%的巨噬细胞,4.8%坏死核心和胆固醇裂隙,3.1%的帽中SMC和48.4%的胶原蛋白。对照组的病变稳定系数(图7C)为 3.5 ± 0.8 。当与阿托伐他汀组合施用时,低剂量的mAb316P(3mg/kg)降低不稳定因子(-26%, $P<0.05$,N.S.对于多重比较在修正后),并增加稳定因子(+19%, $P<0.05$,N.S.对于多重比较在修正后),而较高剂量(10mg/kg)单独和与阿托伐他汀组合降低不稳定因子(-37%, $P<0.001$;-73%, $P<0.001$),并增加稳定因子(+19%, $P<0.05$,N.S.对于多重比较在修正后;+29%, $P<0.001$)。因此,mAb316P单独(+24%,N.S.;+113%, $P<0.0045$)和与阿托伐他汀组合(+116%, $P<0.05$,N.S.对于多重比较在修正后;556%, $P<0.001$)改善病变稳定性,如由病变稳定系数的增加所显示。

[0202] vi) MAb316P趋向于减少循环单核细胞

[0203] 通过流式细胞术对mAb316P单独和与阿托伐他汀组合对白血细胞计数的影响进行评估。有趣的是,当表示为PBMC群体的百分比时,mAb316P单独和与阿托伐他汀一起降低粒细胞/嗜中性粒细胞(-20%, $P<0.05$,N.S.对于多重比较在修正后;-34%, $P<0.001$)和单核细胞(-28%, $P<0.05$,N.S.对于多重比较在修正后;-39%, $P<0.001$)。更具体地,mAb316P单独和与阿托伐他汀组合趋向于降低促炎性Ly6C^{hi}单核细胞(-8%, $P=0.061$;-19%, $P<0.001$)并增加抗炎性Ly6C^{low}单核细胞(+12%, $P=0.089$;-35%, $P<0.001$)。因此,mAb316P对血管募集和单核细胞粘附的影响可以通过减少循环单核细胞而放大。

[0204] 表5:mAb316P、阿托伐他汀及其组合对白血细胞计数的影响,在处理8周后通过流式细胞术分析进行评估

	对照	10 mg/kg MAb316P	阿托伐他汀	10 mg/kg MAb316P + 阿托伐他汀
嗜中性粒细胞/粒细胞 (PBMC 群体的%)	8.9 ± 2.4	7.1 ± 2.0 * ††	5.1 ± 1.6 ***	5.9 ± 2.0 ***
淋巴细胞/单核细胞 (PBMC 群体的%)	91.1 ± 2.4	92.9 ± 2.0 * ††	94.9 ± 1.6 ***	94.1 ± 2.0 ***
T 细胞 (PBMC 群体的%)	22.9 ± 4.6	21.4 ± 5.0 †	17.0 ± 4.8 ***	18.5 ± 4.5 *
B 细胞 (PBMC 群体的%)	63.9 ± 8.5	66.3 ± 15.0	69.5 ± 17.4 ***	66.9 ± 2.0 ***
单核细胞 (PBMC 群体的%)	12.3 ± 5.0	8.9 ± 2.5 * †††	5.3 ± 2.4 ***	7.5 ± 2.8 *** †
CD11b+ Ly6C^{hi} (单核细胞的%)	62.2 ± 8.5	57.5 ± 8.4 P=0.061 †	51.2 ± 6.4 ***	50.2 ± 4.1 ***
CD11b+ Ly6C^{low} (单核细胞的%)	35.6 ± 7.7	40.0 ± 8.0 P=0.089 †	47.8 ± 6.3 ***	48.0 ± 3.5 ***

[0206] *P<0.05,***P<0.0125与对照相比;†P<0.05,††P<0.01,†††P<0.0125与阿托伐他汀相比(每组n=15)

[0207] 总结

[0208] 设计本发明以研究mAb316P自身以及与阿托伐他汀组合对动脉粥样硬化发展的影响。总之,这些数据证明,在APOE*3Leiden.CETP小鼠中,mAb316P剂量依赖性地降低血浆胆固醇、动脉粥样硬化的进展和斑块易损性(vulnerability),并增强阿托伐他汀的有益效果。这是首次研究显示针对PCSK9的单克隆抗体降低动脉粥样硬化的发展。

[0209] 示例实施方案

[0210] 1.一种抑制受试者中动脉粥样硬化斑块形成的方法,该方法包括向受试者施用包含PCSK9抑制剂的药物组合物。

[0211] 2.一种包含PCSK9抑制剂的药物组合物,其适用于抑制受试者中动脉粥样硬化斑块形成。

[0212] 3.实施方案1或2的方法或药物组合物,其中该受试者是非高脂血的。

[0213] 4.实施方案1或2的方法或药物组合物,其中该受试者表面上是健康的。

[0214] 5.一种治疗或抑制受试者中动脉粥样硬化进展的方法,该方法包括:

[0215] 选择罹患中风或心肌梗死的受试者;和

[0216] 向所述受试者施用包含PCSK9抑制剂的药物组合物,由此治疗动脉粥样硬化或抑制动脉粥样硬化的进展。

[0217] 6.一种包含PCSK9抑制剂的药物组合物,其适用于在罹患中风或心肌梗死的受试者中治疗动脉粥样硬化或抑制其进展。

[0218] 7.实施方案5或6的方法或药物组合物,其中该受试者是非高脂血的。

[0219] 8.一种在非高脂血症受试者中治疗动脉粥样硬化或抑制动脉粥样硬化进展的方

法,该方法包括:

[0220] 选择患有动脉粥样硬化或者已知处于发生动脉粥样硬化的风险的受试者,其中该受试者是非高脂血的;和

[0221] 向所述受试者施用包含PCSK9抑制剂的药物组合物,由此治疗动脉粥样硬化或抑制动脉粥样硬化的进展。

[0222] 9.一种包含PCSK9抑制剂的药物组合物,其适用于在非高脂血症受试者中治疗动脉粥样硬化或抑制的动脉粥样硬化的进展,其中该受试者患有动脉粥样硬化或者已知处于发生动脉粥样硬化的风险。

[0223] 10.实施方案8或9的方法或药物组合物,其中该受试者表面上是健康的。

[0224] 11.前述任一项实施方案的方法或药物组合物,其中该受试者是非高胆固醇血的。

[0225] 12.前述任一项实施方案的方法或药物组合物,其中该受试者是非高甘油三酯血的。

[0226] 13.前述任一项实施方案的方法或药物组合物,其中该受试者患有选自下组的疾病或病症:1型糖尿病、2型糖尿病、川崎病、慢性炎症性疾病、和高血压。

[0227] 14.前述任一项实施方案的方法或药物组合物,其中该受试者具有升高水平的炎症标志物。

[0228] 15.实施方案14的方法或药物组合物,其中该炎症标志物是C反应蛋白。

[0229] 16.实施方案14的方法或药物组合物,其中该炎症标志物是炎性细胞因子。

[0230] 17.前述任一项实施方案的方法或药物组合物,其中该PCSK9抑制剂是特异结合PCSK9的抗体或抗原结合蛋白。

[0231] 18.实施方案17的方法或药物组合物,其中该抗体或抗原结合蛋白包含具有SEQ ID NO:12,13,14,16,17和18的重链和轻链CDR氨基酸序列。

[0232] 19.实施方案17的方法或药物组合物,其中该抗体或抗原结合蛋白包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:11的HCVR和具有氨基酸序列SEQ ID NO:15的LCVR。

[0233] 20.实施方案17的方法或药物组合物,其中该抗体或抗原结合蛋白包含具有SEQ ID NO:2,3,4,7,8和10的重链和轻链CDR氨基酸序列。

[0234] 21.实施方案20的方法或药物组合物,其中该抗体或抗原结合蛋白包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:1的HCVR和具有氨基酸序列SEQ ID NO:6的LCVR。

[0235] 22.实施方案17-21中任一项的方法或药物组合物,其中该抗体或抗原结合蛋白与包含分别在SEQ ID NO:1和6、或SEQ ID NO:11和15中所列的重链和轻链可变域氨基酸序列的抗体结合PCSK9上的相同表位。

[0236] 23.实施方案17-22中任一项的方法或药物组合物,其中该抗体或抗原结合蛋白与包含分别在SEQ ID NO:1和6、或SEQ ID NO:11和15中所列的重链和轻链可变域氨基酸序列的抗体竞争结合PCSK9。

[0237] 24.前述任一项实施方案的方法或药物组合物,其中该PCSK9抑制剂将受试者中动脉粥样硬化斑块形成减少至少10%,20%,30%,40%,50%,60%,70%,80%,或90%。

[0238] 25.前述任一项实施方案的方法或药物组合物,其中该受试者患有杂合子家族性高胆固醇血症(heFH)。

[0239] 26.前述任一项实施方案的方法或药物组合物,其中该受试者具有非家族性高胆

固醇血症 (nonFH) 的高胆固醇血症形式。

[0240] 27. 前述任一项实施方案的方法或药物组合物, 其中该受试者在施用所述抗体或抗原结合蛋白之前和/或期间施用另一种脂质调节剂。

[0241] 28. 实施方案27的方法或药物组合物, 其中该治疗性脂质调节剂选自下组: 他汀、依泽替米贝、贝特、烟酸、 ω -3脂肪酸、和胆汁酸树脂。

[0242] 29. 实施方案28的方法或药物组合物, 其中他汀选自下组: 西立伐他汀、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。

[0243] 30. 前述任一项实施方案的方法或药物组合物, 其中该受试者在施用抗体或抗原结合蛋白之前和/或期间没有施用另一种脂质调节剂。

[0244] 31. 前述任一项实施方案的方法或药物组合物, 其中该抗体或抗原结合蛋白是皮下施用的。

[0245] 32. 一种单位剂型, 包括实施方案17-23中任一项的药物组合物。

[0246] 33. 实施方案32的单位剂型, 其中该PCSK9抑制剂是抗体或抗原结合片段, 并且该单位剂型包括75mg, 150mg, 200mg或300mg的所述抗体或抗原结合片段。

[0247] 34. 实施方案33的单位剂型, 其中该单位剂型选自下组: 预装填注射器、预装填自动注射器、小瓶、药筒、可重复使用的注射器, 和可重复使用的自动注射器。

[0248] 35. 实施方案34的单位剂型, 其中该单位剂型是气密封的。

[0249] 36. 实施方案34-35中任一项的单位剂型, 其中该抗体或抗原结合片段的量在气密封的剂量形式上有指示。

[0250] 37. 一种制品, 其包含实施方案17-23中任一项的药物组合物和容器。

[0251] 38. 实施方案37的制品, 其包含一个或多个根据实施方案32-36的单位剂型和使用说明书。

[0252] 39. 前述任一项实施方案的药物组合物在制造药物中的用途, 所述药物用于:

[0253] (a) 抑制受试者中动脉粥样硬化斑块形成;

[0254] (b) 在遭受中风或心肌梗死的受试者中治疗动脉粥样硬化或抑制动脉粥样硬化的进展; 或

[0255] (c) 在非高脂血症受试者中治疗动脉粥样硬化或抑制的动脉粥样硬化的进展, 其中该受试者患有动脉粥样硬化或者已知处于发生动脉粥样硬化的风险。

序列表

<110> 再生元制药公司

赛诺菲生物技术公司

<120> 通过施用PCSK9抑制剂抑制动脉粥样硬化的方法

<130> US2013/205 PCT

<140>

<141>

<160> 198

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成多肽

<400> 1

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 Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asn 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 Thr 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> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 2
 Gly Phe Thr Phe Asn Asn Tyr Ala
 1 5
 <210> 3
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列描述：合成肽
 <400> 3
 Ile Ser Gly Ser Gly Gly Thr Thr
 1 5
 <210> 4
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列描述：合成肽
 <400> 4
 Ala Lys Asp Ser Asn Trp Gly Asn Phe Asp Leu
 1 5 10
 <210> 5
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列描述：合成REGN727重链多肽
 <400> 5
 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 Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asn 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 Thr 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 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro			
	115	120	125
Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly			
	130	135	140
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn			
145	150	155	160
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln			
	165	170	175
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser			
	180	185	190
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser			
	195	200	205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr			
	210	215	220
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser			
225	230	235	240
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg			
	245	250	255
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro			
	260	265	270
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala			
	275	280	285
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val			
	290	295	300
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr			
305	310	315	320
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr			
	325	330	335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu			
	340	345	350
Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys			
	355	360	365
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser			
	370	375	380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp			
385	390	395	400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

<210> 6

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成多肽

<400> 6

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 Gln Ser Val Leu Tyr Arg
 20 25 30
 Ser Asn Asn 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 Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110

Lys

<210> 7

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 7

Gln Ser Val Leu Tyr Arg Ser Asn Asn Arg Asn Phe
 1 5 10

<210> 8

<211> 3

	195		200		205										
Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys				
	210						215				220				
<210>	10														
<211>	9														
<212>	PRT														
<213>	人工序列														
<220>															
<223>	人工序列描述：合成肽														
<400>	10														
Gln	Gln	Tyr	Tyr	Thr	Thr	Pro	Tyr	Thr							
1				5											
<210>	11														
<211>	127														
<212>	PRT														
<213>	人工序列														
<220>															
<223>	人工序列描述：合成多肽														
<400>	11														
Glu	Met	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	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	His
			20						25					30	
Trp	Met	Lys	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
			35						40					45	
Ala	Asn	Ile	Asn	Gln	Asp	Gly	Ser	Glu	Lys	Tyr	Tyr	Val	Asp	Ser	Val
			50						55					60	
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Phe
65					70					75				80	
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
						85				90				95	
Ala	Arg	Asp	Ile	Val	Leu	Met	Val	Tyr	Asp	Met	Asp	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr
									100					105	
Gly	Met	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	
														115	
														120	
														125	
<210>	12														
<211>	8														
<212>	PRT														
<213>	人工序列														

<220>
 <223> 人工序列描述: 合成肽
 <400> 12
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser His Trp
 1 5
 <210> 13
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列描述: 合成肽
 <400> 13
 Ile Asn Gln Asp Gly Ser Glu Lys
 1 5
 <210> 14
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列描述: 合成肽
 <400> 14
 Ala Arg Asp Ile Val Leu Met Val Tyr Asp Met Asp Tyr Tyr Tyr Tyr
 1 5 10 15
 Gly Met Asp Val
 20
 <210> 15
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列描述: 合成多肽
 <400> 15
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asn Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro

50	55	60																
Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile			
65					70					75					80			
Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Met	Gln	Thr			
				85						90					95			
Leu	Gln	Thr	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys			
			100						105						110			

<210> 16

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 16

Gln	Ser	Leu	Leu	His	Ser	Asn	Gly	Asn	Asn	Tyr
1			5						10	

<210> 17

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 17

Leu Gly Ser

1

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 18

Met Gln Thr Leu Gln Thr Pro Leu Thr

1

5

<210> 19

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 19

Gly Phe Thr Phe Ser Ser His Trp

1 5

<210> 20

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 20

Ile Asn Gln Asp Gly Ser Glu Lys

1 5

<210> 21

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 21

Ala Arg Asp Ile Val Leu Met Val Tyr Asp Met Asp Tyr Tyr Tyr Tyr

1 5 10 15

Gly Met Asp Val

20

<210> 22

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 22

Gln Ser Leu His His Ser Asn Gly Asn Asn Tyr

1 5 10

<210> 23

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 23

Leu Gly Ser

1

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 24

Met Gln Thr Leu Gln Thr Pro Leu Thr

1

5

<210> 25

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 25

Gly Phe Thr Phe Ser Ser His Trp

1

5

<210> 26

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 26

Ile Asn Gln Asp Gly Ser Glu Lys

1

5

<210> 27

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 27

Ala Arg Asp Ile Val Leu Met Val Tyr His Met Asp Tyr Tyr Tyr Tyr

1

5

10

15

Gly Met Asp Val

20

<210> 28

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 28

Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Asn Tyr

1

5

10

<210> 29

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 29

Leu Gly Ser

1

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 30

Met Gln Thr Leu Gln Thr Pro Leu Thr

1

5

<210> 31

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 31

Gly Phe Thr Phe Ser Ser His Trp

1

5

<210> 32

<211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列描述：合成肽
 <400> 32
 Ile Asn Gln Asp Gly Ser Glu Lys
 1 5
 <210> 33
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列描述：合成肽
 <400> 33
 Ala Arg Asp Ile Val Leu Met Val Tyr His Met Asp Tyr Tyr Tyr Tyr
 1 5 10 15
 Gly Met Asp Val
 20
 <210> 34
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列描述：合成肽
 <400> 34
 Gln Ser Leu His His Ser Asn Gly Asn Asn Tyr
 1 5 10
 <210> 35
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列描述：合成肽
 <400> 35
 Leu Gly Ser
 1
 <210> 36
 <211> 9

<212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列描述: 合成肽
 <400> 36
 Met Gln Thr Leu Gln Thr Pro Leu Thr
 1 5
 <210> 37
 <211> 131
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列描述: Synthetic
 VH; m2CX1D05 polypeptide
 <400> 37
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Asn Ser His
 20 25 30
 Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gly Ile Asn Pro Ile Leu Gly Ile Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg His Tyr Glu Ile Gln Ile Gly Arg Tyr Gly Met Asn Val Tyr
 100 105 110
 Tyr Leu Met Tyr Arg Phe Ala Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 115 120 125
 Val Ser Ser
 130
 <210> 38
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列描述: 合成VH CDR1; m2CX1D05肽

<400> 38

Gly Gly Thr Phe Asn Ser His Ala Ile Ser
1 5 10

<210> 39

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成VH CDR2；m2CX1D05肽

<400> 39

Trp Met Gly Gly Ile Asn Pro Ile Leu Gly Ile Ala Asn Tyr Ala Gln
1 5 10 15
Lys Phe Gln Gly
20

<210> 40

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成VH CDR3；m2CX1D05肽

<400> 40

His Tyr Glu Ile Gln Ile Gly Arg Tyr Gly Met Asn Val Tyr Tyr Leu
1 5 10 15
Met Tyr Arg Phe Ala Ser
20

<210> 41

<211> 213

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成LC；m2CX1D05多肽

<400> 41

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Ser Ala
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Asn Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
65	70	75
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asp Gly Asp Pro Thr		
	85	90
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro		
	100	105
Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr		
	115	120
Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys		
	130	135
Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu		
145	150	155
Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser		
	165	170
Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala		
	180	185
Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe		
	195	200
		205
Asn Arg Gly Glu Ala		
210		
<210> 42		
<211> 11		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人工序列描述: 合成VL CDR 1; m2CX1D05肽		
<400> 42		
Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Ser Ala Leu Asn		
1	5	10
<210> 43		
<211> 11		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人工序列描述: 合成VL CDR2; m2CX1D05肽		
<400> 43		
Leu Leu Ile Tyr Asn Gly Ser Thr Leu Gln Ser		
1	5	10

<210> 44

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成VL CDR3；m2CX1D05肽

<400> 44

Gln Gln Phe Asp Gly Asp Pro

1 5

<210> 45

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成VH；1B20多肽

<400> 45

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu

1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr

20 25 30

Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe

50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Tyr Trp Tyr Lys Pro Leu Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 46

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成VH CDR1；1B20肽

<400> 46

Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr Trp Ile Ser
 1 5 10
 <210> 47
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列描述: 合成VH CDR2; 1B20肽
 <400> 47
 Trp Met Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Ser Pro
 1 5 10 15
 Ser Phe Gln Gly
 20
 <210> 48
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列描述: 合成VH CDR3; 1B20肽
 <400> 48
 Asp Tyr Trp Tyr Lys Pro Leu Phe Asp Ile
 1 5 10
 <210> 49
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列描述: 合成LC; 1B20多肽
 <400> 49
 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 Arg Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
 20 25 30
 Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Pro Pro Lys 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 Ser Ser Phe Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110
Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
115 120 125
Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
130 135 140
Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
145 150 155 160
Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
165 170 175
Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
180 185 190
Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
195 200 205
Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Ala
210 215 220

<210> 50

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成VL CDR1; 1B20肽

<400> 50

Arg Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

<210> 51

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成VL CDR2; 1B20肽

<400> 51

Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5 10

<210> 52

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成VL CDR3; 1B20肽

<400> 52

Gln Gln Tyr Ser Ser Phe Pro Ile

1 5

<210> 53

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成variable heavy antibody region多肽

<400> 53

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Gly Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Gly Ser Gly Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn 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 Arg Glu Arg Tyr Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115 120

<210> 54

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成AX132重链CDR1抗体区肽

<400> 54

Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met Tyr Trp Val Arg

1 5 10 15

<210> 55

<211> 23

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成AX132重链CDR2抗体区肽

<400> 55

Trp Ile Gly Trp Ile Asp Pro Gly Ser Gly Gly Thr Lys Tyr Asn Glu

1 5 10 15

Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr

20

<210> 56

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成AX132重链CDR3抗体区肽

<400> 56

Cys Ala Arg Glu Arg Tyr Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln

1 5 10 15

<210> 57

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成抗体轻链可变区多肽

<400> 57

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Tyr Val Gly Ser Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Pro Pro

85 90 95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 58

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成AX213和AX132轻链CDR1抗体区肽

<400> 58

Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Tyr Val Gly Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr
 1 5 10 15

Gln

<210> 59

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成AX213和AX132轻链CDR2抗体区肽

<400> 59

Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro
 1 5 10

<210> 60

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成AX132 & AX213轻链CDR3抗体区肽

<400> 60

Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Pro Pro Val Val Phe Gly Gly
 1 5 10 15

<210> 61

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成抗体重链可变区多肽

<400> 61

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Arg Tyr
 20 25 30
 Gly Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asp Pro Gly Asn Gly Gly Thr Arg Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn 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 Arg Ala Asn Asp Gly Tyr Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 115 120

<210> 62

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成AX213重链CDR1抗体区肽

<400> 62

Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Arg Tyr Gly Ile Asn Trp Val Arg
 1 5 10 15

<210> 63

<211> 23

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成AX213重链CDR2抗体区肽

<400> 63

Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Gly Asn Gly Gly Thr Arg Tyr Asn Glu
 1 5 10 15

Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr
 20

<210> 64

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成AX213重链CDR3抗体区肽

<400> 64

Cys Ala Arg Ala Asn Asp Gly Tyr Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
1 5 10 15

<210> 65

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成抗体轻链可变区多肽

<400> 65

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

Glu Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Tyr Val Gly Ser Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Pro Pro
 85 90 95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 66

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成AX213和AX132轻链CDR1抗体区肽

<400> 66

Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Tyr Val Gly Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr
1 5 10 15

Gln

<210> 67

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成AX213和AX132轻链CDR2抗体区肽

<400> 67

Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro
1 5 10

<210> 68

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成AX132 & AX213轻链CDR3抗体区肽

<400> 68

Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Pro Pro Val Val Phe Gly Gly
1 5 10 15

<210> 69

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成AX1 VH antibody sequence多肽

<400> 69

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

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

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Arg Ile Asn Pro Asp Ser Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 70

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成AX1 VH CDR1 antibody sequence肽

<400> 70

Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Ser Tyr Tyr Met His Trp Val Arg
1 5 10 15

<210> 71

<211> 23

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成AX1 VH CDR2 antibody sequence肽

<400> 71

Trp Ile Gly Arg Ile Asn Pro Asp Ser Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu
1 5 10 15

Lys Phe Lys Gly Arg Ala Thr
 20

<210> 72

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成AX1 VH CDR3 antibody sequence肽

<400> 72

Cys Ala Arg Gly Gly Arg Leu Ser Trp Asp Phe Asp Val Trp Gly Gln
1 5 10 15

<210> 73

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成AX1 VL antibody sequence多肽

<400> 73

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Arg Tyr
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

	35		40		45										
Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50				55					60					
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65					70					75				80	
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Ala	Tyr	Asp	Tyr	Ser	Leu	Gly
				85						90				95	
Gly	Tyr	Val	Phe	Gly	Asp	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys			
			100							105					

<210> 74

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成AX1 VL CDR1 antibody sequence肽

<400> 74

Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Ser	Arg	Tyr	Leu	Ala
1			5						10	

<210> 75

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成AX1 AX9 AX189 VL CDR2 antibody sequence肽

<400> 75

Ala	Ala	Ser	Ser	Leu	Gln	Ser
1				5		

<210> 76

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成AX1 VL CDR3 antibody sequence肽

<400> 76

Ala	Ala	Tyr	Asp	Tyr	Ser	Leu	Gly	Gly	Tyr	Val
1				5					10	

<210> 77

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成AX9 AX189 VH antibody sequence多肽

<400> 77

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn 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 Arg Tyr Gly Tyr Tyr Leu Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 78

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成AX9 AX189 VH CDR1 antibody sequence肽

<400> 78

Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr Trp Met His Trp Val Arg
 1 5 10 15

<210> 79

<211> 23

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成AX9 AX189 VH CDR2 antibody sequence肽

<400> 79

Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Lys Tyr Asn Glu
 1 5 10 15
 Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr

Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Arg Tyr Leu Thr
 1 5 10
 <210> 83
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列描述：合成AX1 AX9 AX189 VL CDR2 antibody sequence肽
 <400> 83

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
 1 5
 <210> 84
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列描述：合成AX189 VL CDR3 antibody sequence肽
 <400> 84

Gln Ala Tyr Asp Tyr Ser Leu Ser Gly Tyr Val
 1 5 10
 <210> 85
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 85

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

Val Ser Ser

115

<210> 86

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 86

Ser Tyr Gly Ile Ser

1 5

<210> 87

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 87

Trp Val Ser Phe Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 88

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 88

Gly Tyr Gly Met Asp Val

1 5

<210> 89

<211> 109

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 89

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln

1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr

20 25 30

Asn Ser Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu

35 40 45

Met Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu

65 70 75 80

	35		40		45														
	Leu	Ile	Ser	Gly	Asn	Ser	Asn	Arg	Pro	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe			
	50						55				60								
	Ser	Gly	Ser	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Ala	Ser	Leu	Ala	Ile	Thr	Gly	Leu			
	65					70					75					80			
	Gln	Ala	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Ser	Tyr	Asp	Ser	Ser			
					85					90					95				
	Leu	Ser	Gly	Ser	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu				
				100					105						110				
<210>	98																		
<211>	14																		
<212>	PRT																		
<213>	Homo sapiens																		
<400>	98																		
	Thr	Gly	Ser	Ser	Ser	Asn	Ile	Gly	Ala	Gly	Tyr	Asp	Val	His					
	1				5					10									
<210>	99																		
<211>	7																		
<212>	PRT																		
<213>	Homo sapiens																		
<400>	99																		
	Gly	Asn	Ser	Asn	Arg	Pro	Ser												
	1				5														
<210>	100																		
<211>	11																		
<212>	PRT																		
<213>	Homo sapiens																		
<400>	100																		
	Gln	Ser	Tyr	Asp	Ser	Ser	Leu	Ser	Gly	Ser	Val								
	1				5					10									
<210>	101																		
<211>	114																		
<212>	PRT																		
<213>	Homo sapiens																		
<400>	101																		
	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Ala	Gln	Pro	Gly	Arg			
	1				5					10					15				
	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr			
				20						25					30				

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Tyr Tyr Asp Gly Ile Asn Lys His Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn 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 Arg Asp Arg Gly Leu Asp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110

Ser Ser

<210> 102

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 102

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His

1 5 10

<210> 103

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 103

Val Ile Tyr Tyr Asp Gly Ile Asn Lys His Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 104

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 104

Asp Arg Gly Leu Asp

1 5

<210> 105

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 105

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 Gln Ser Val Leu Tyr Ser
 20 25 30
 Ser Asn Ser Lys Asn Tyr Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Pro Pro Lys 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 Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110

Lys

<210> 106

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 106

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Ser Lys Asn Tyr Leu
 1 5 10 15

Val

<210> 107

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 107

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1 5

<210> 108

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 108

Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Trp Thr

1 5

<210> 109

<211> 118

<212> PRT

链CDR2肽

<400> 111

Arg Ile Asp Pro Ala Asn Glu His Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 112

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成合成抗-PCSK9单克隆抗体pJG04 (克隆LGT-209和LGT-210)

Vh重链互补决定区3 (CDR3) 肽

<400> 112

Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Asn Met Asp Tyr

1 5

<210> 113

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成合成抗-PCSK9单克隆抗体pJG10 (克隆LGT-209和LGT-211)

Vk轻链可变区 (FR1-FR4) 多肽

<400> 113

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Tyr Met

20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr

35 40 45

Gly Val Phe Arg Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Gly Arg Leu Glu Pro Glu

65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Trp Ser Ser Asp Pro Pro Thr

85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 114

<211> 10

Gly Glu Ile Ser Pro Phe Gly Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Ser Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 118

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 118

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 1 5

<210> 119

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 119

Ser Pro Phe Gly Gly Arg
 1 5

<210> 120

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成可变重链CDR肽

<400> 120

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Ser Asp Leu
 1 5

<210> 121

<211> 107

<212> PRT

<213> 人

<400> 121

```

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

```

<210> 122

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成可变轻链CDR肽

<400> 122

```

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Ala
1           5           10

```

<210> 123

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成可变轻链CDR肽

<400> 123

```

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr
1           5

```

<210> 124

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成可变轻链CDR肽

<400> 124

Gln Gln Arg Tyr Ser Leu Trp Arg Thr

1 5

<210> 125

<211> 118

<212> PRT

<213> 人

<400> 125

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Glu Ile His Pro Ser Gly Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 126

<211> 10

<212> PRT

<213> 人

<400> 126

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Tyr Met His

1 5 10

<210> 127

<211> 17

<212> PRT

<213> 人

<400> 127

Glu Ile His Pro Ser Gly Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

<400> 131

His Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr

1 5

<210> 132

<211> 9

<212> PRT

<213> 人

<400> 132

Gln Gln Arg Tyr Ser Leu Trp Arg Thr

1 5

<210> 133

<211> 118

<212> PRT

<213> 人

<400> 133

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Glu Ile His Pro Ser Gly Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Ser Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 134

<211> 10

<212> PRT

<213> 人

<400> 134

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Tyr Met His

1 5 10

<210> 135

<211> 17
 <212> PRT
 <213> 人
 <400> 135
 Glu Ile His Pro Ser Gly Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15
 Ser
 <210> 136
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人
 <400> 136
 Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Ser Asp Leu
 1 5
 <210> 137
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人
 <400> 137
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val His Thr Ala
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr His Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Tyr Ser Leu Trp Arg
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 138
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人
 <400> 138
 Lys Ala Ser Gln Asp Val His Thr Ala Val Ala

<212> PRT
 <213> 小鼠
 <400> 146
 Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
 1 5 10
 <210> 147
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列描述：合成可变轻链CDR肽
 <400> 147
 Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr
 1 5
 <210> 148
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 小鼠
 <400> 148
 Gln Gln Arg Tyr Ser Thr Pro Arg Thr
 1 5
 <210> 149
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> 小鼠
 <400> 149
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Tyr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Trp Leu Leu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

	100	105	110
Val Ser Ala			
115			
<210> 150			
<211> 7			
<212> PRT			
<213> 小鼠			
<400> 150			
Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr			
1		5	
<210> 151			
<211> 6			
<212> PRT			
<213> 小鼠			
<400> 151			
Asn Pro Asn Asn Gly Gly			
1		5	
<210> 152			
<211> 6			
<212> PRT			
<213> 小鼠			
<400> 152			
Trp Leu Leu Phe Ala Tyr			
1		5	
<210> 153			
<211> 108			
<212> PRT			
<213> 小鼠			
<400> 153			
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly			
1		5	10
Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn			
	20	25	30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile			
	35	40	45
Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly			
	50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Leu Ser			
65	70	75	80

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 162

<211> 11

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 162

Ser Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 163

<211> 7

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 163

Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser
1 5

<210> 164

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 164

Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Phe Thr
1 5

<210> 165

<211> 117

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 165

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

Ser Met Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr

	20		25		30														
Tyr	Met	Ala	Trp	Val	Arg	Gln	Val	Pro	Glu	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val				
	35						40					45							
Ala	Asn	Ile	Asn	Tyr	Asp	Gly	Ser	Asn	Thr	Ser	Tyr	Leu	Asp	Ser	Leu				
	50					55						60							
Lys	Ser	Arg	Phe	Ile	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ile	Leu	Tyr				
65					70				75					80					
Leu	Gln	Met	Ser	Ser	Leu	Lys	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys				
				85					90					95					
Ala	Arg	Glu	Lys	Phe	Ala	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser				
			100					105						110					
Val	Thr	Val	Ser	Ser															
				115															

<210> 166

<211> 7

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 166

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr

1 5

<210> 167

<211> 6

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 167

Asn Tyr Asp Gly Ser Asn

1 5

<210> 168

<211> 8

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 168

Glu Lys Phe Ala Ala Met Asp Tyr

1 5

<210> 169

<211> 108

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 169

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

<210> 170

<211> 11

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 170

Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Asn Ala Leu Ala
 1 5 10

<210> 171

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成可变轻链CDR肽

<400> 171

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr
 1 5

<210> 172

<211> 9

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 172

Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp Thr
 1 5

<210> 173

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成多肽

<400> 173

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	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Thr	Arg	His
			20					25						30	
Thr	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40						45		
Ala	Arg	Ile	Ser	Pro	Ala	Asn	Gly	Asn	Thr	Asn	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
		50					55						60		
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Thr	Ala	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	Arg	Trp	Ile	Gly	Ser	Arg	Glu	Leu	Tyr	Ile	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly
					100					105					110
Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser							
					115										120

<210> 174

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 174

Gly	Phe	Thr	Phe	Thr	Arg	His	Thr	Ile	His
1				5					10

<210> 175

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 175

Arg	Ile	Ser	Pro	Ala	Asn	Gly	Asn	Thr	Asn	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys
1				5						10					15

1 5 10
 <210> 179
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列描述: 合成肽
 <400> 179
 Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
 1 5
 <210> 180
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列描述: 合成肽
 <400> 180
 Gln Gln Ser Tyr Arg Ile Gln Pro Thr
 1 5
 <210> 181
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列描述: 合成多肽
 <400> 181
 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 Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Thr
 20 25 30
 Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Arg Ile Ser Pro Ala Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala 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 Arg Trp Ile Gly Ser Arg Glu Leu Tyr Ile Met Asp Tyr Trp Gly

	100		105		110
Gln Gly Thr	Leu Val Thr Val	Ser Ser			
	115		120		
<210>	182				
<211>	10				
<212>	PRT				
<213>	人工序列				
<220>					
<223>	人工序列描述：合成肽				
<400>	182				
Gly Phe Thr Phe Ser Ser Thr Ala Ile His					
1		5		10	
<210>	183				
<211>	17				
<212>	PRT				
<213>	人工序列				
<220>					
<223>	人工序列描述：合成肽				
<400>	183				
Arg Ile Ser Pro Ala Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys					
1		5		10	15
Gly					
<210>	184				
<211>	12				
<212>	PRT				
<213>	人工序列				
<220>					
<223>	人工序列描述：合成肽				
<400>	184				
Trp Ile Gly Ser Arg Glu Leu Tyr Ile Met Asp Tyr					
1		5		10	
<210>	185				
<211>	108				
<212>	PRT				
<213>	人工序列				
<220>					
<223>	人工序列描述：合成多肽				
<400>	185				
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly					

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

<210> 186

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 186

Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
 1 5 10

<210> 187

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 187

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
 1 5

<210> 188

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 188

Gln Gln Ser Tyr Pro Ala Leu His Thr

1 5
 <210> 189
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列描述：合成多肽
 <400> 189
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Pro Phe Ser Lys Leu
 20 25 30
 Gly Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Thr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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 Arg Glu Gly Ile Ser Phe Gln Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Val Met
 100 105 110
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125
 <210> 190
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列描述：合成肽
 <400> 190
 Gly Phe Pro Phe Ser Lys Leu Gly Met Val
 1 5 10
 <210> 191
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列描述：合成肽

<400> 191

Thr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 192

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 192

Glu Gly Ile Ser Phe Gln Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Val Met Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 193

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成多肽

<400> 193

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Arg
 20 25 30

Asn Gly Ile Thr Tyr Ser Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Leu Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Tyr Gln Asn
 85 90 95

Leu Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 194

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 194

Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Arg Asn Gly Ile Thr Tyr Ser Tyr

1 5 10 15

<210> 195

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 195

Gln Leu Ser Asn Leu Ala Ser

1 5

<210> 196

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 196

Tyr Gln Asn Leu Glu Leu Pro Leu Thr

1 5

<210> 197

<211> 2076

<212> DNA

<213> 人

<400> 197

atgggcaccg tcagctccag gcggtcctgg tggccgctgc cactgctgct gctgctgctg 60
 ctgctcctgg gtcccgcggg cgcccgtgcg caggaggacg aggacggcga ctacgaggag 120
 ctgggtgctag ccttgctgctc cgaggaggac ggctggccg aagcaccgga gcacggaacc 180
 acagccacct tccaccgctg cgccaaggat ccgtggaggt tgccctggcac ctacgtggtg 240
 gtgctgaagg aggagacca cctctcgcag tcagagegca ctgcccgcg cctgcaggcc 300
 caggctgccc gccggggata cctaccaag atctgcatg tcttccatgg ctttcttct 360
 ggcttctggt tgaagatgag tggcgacctg ctggagctgg ccttgaagtt gccccatgtc 420
 gactacatcg aggaggactc ctctgtcttt gccagagca tcccgtggaa cctggagcgg 480
 attaccctc cacggtaccg ggcggatgaa taccagcccc ccgacggagg cagcctggtg 540
 gaggtgtatc tcctagacac cagcatacag agtgaccacc gggaaatcga gggcagggtc 600
 atggtcaccg acttcgagaa tgtgcccag gaggacggga cccgcttcca cagacaggcc 660
 agcaagtgtg acagtcatgg caccacactg gcaggggtgg tcagcggccg ggatgccggc 720

gtggccaagg gtgccagcat ggcgagcctg cgcgtgctca actgccaagg gaagggcacg 780
 gttagcggca ccctcatagg cctggagttt attcggaaaa gccagctggt ccagcctgtg 840
 gggccactgg tgggtgctgct gcccctggcg ggtgggtaca gccgcgtcct caacgccgcc 900
 tgccagcgcc tggcgagggc tggggtcgtg ctggtcaccg ctgccggcaa cttccgggac 960
 gatgcctgcc tctactcccc agcctcagct cccgaggtca tcacagttgg ggccaccaat 1020
 gcccaagacc agccggtgac cctggggact ttggggacca actttggccg ctgtgtggac 1080
 ctctttgccc caggggagga catcattggt gcctccagcg actgcagcac ctgctttgtg 1140
 tcacagagtg ggacatcaca ggctgctgcc cacgtggctg gcattgcagc catgatgctg 1200
 tctgccgagc cggagctcac cctggccgag ttgaggcaga gactgatcca cttctctgcc 1260
 aaagatgtca tcaatgagge ctggttcctc gaggaccagc gggactgac cccaacctg 1320
 gtggccgccc tgccccccag caccatggg gcaggttggc agctgttttg caggactgta 1380
 tggtcagcac actcggggcc tacacggatg gccacagccg tcgcccgtg cggcccagat 1440
 gaggagctgc tgagctgctc cagtttctcc aggagtggga agcggcgggg cgagcgcag 1500
 gaggcccaag ggggcaagct ggtctgccgg gcccaaacg cttttggggg tgagggtgtc 1560
 tacgccattg ccaggtgctg cctgctacc caggccaact gcagcgtcca cacagctcca 1620
 ccagctgagg ccagcatggg gaccctgtc cactgccacc aacagggcca cgtcctcaca 1680
 ggctgcagct cccactggga ggtggaggac cttggcacc acaagccgcc tgtgctgagg 1740
 ccacgaggtc agcccaacca gtgcgtgggc cacagggagg ccagcatcca cgcttctgc 1800
 tgccatgcc caggtctgga atgcaaagtc aaggagcatg gaatcccggc ccctcaggag 1860
 caggtgaccg tggcctgca ggaggctgg acctgactg gctgcagtgc cctccctggg 1920
 acctcccag tcttgggggc ctacgccgta gacaacacgt gtgtagtcag gagccgggac 1980
 gtcagcacta caggcagcac cagcgaagg gccgtgacag ccgttgccat ctgctgccgg 2040
 agccggcacc tggcgcaggc ctcccaggag ctccag 2076

<210> 198

<211> 692

<212> PRT

<213> 人

<400> 198

Met Gly Thr Val Ser Ser Arg Arg Ser Trp Trp Pro Leu Pro Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Pro Ala Gly Ala Arg Ala Gln Glu
 20 25 30
 Asp Glu Asp Gly Asp Tyr Glu Glu Leu Val Leu Ala Leu Arg Ser Glu
 35 40 45
 Glu Asp Gly Leu Ala Glu Ala Pro Glu His Gly Thr Thr Ala Thr Phe
 50 55 60
 His Arg Cys Ala Lys Asp Pro Trp Arg Leu Pro Gly Thr Tyr Val Val
 65 70 75 80
 Val Leu Lys Glu Glu Thr His Leu Ser Gln Ser Glu Arg Thr Ala Arg

	85	90	95
Arg Leu Gln Ala Gln Ala Ala Arg Arg Gly Tyr Leu Thr Lys Ile Leu			
	100	105	110
His Val Phe His Gly Leu Leu Pro Gly Phe Leu Val Lys Met Ser Gly			
	115	120	125
Asp Leu Leu Glu Leu Ala Leu Lys Leu Pro His Val Asp Tyr Ile Glu			
	130	135	140
Glu Asp Ser Ser Val Phe Ala Gln Ser Ile Pro Trp Asn Leu Glu Arg			
145	150	155	160
Ile Thr Pro Pro Arg Tyr Arg Ala Asp Glu Tyr Gln Pro Pro Asp Gly			
	165	170	175
Gly Ser Leu Val Glu Val Tyr Leu Leu Asp Thr Ser Ile Gln Ser Asp			
	180	185	190
His Arg Glu Ile Glu Gly Arg Val Met Val Thr Asp Phe Glu Asn Val			
	195	200	205
Pro Glu Glu Asp Gly Thr Arg Phe His Arg Gln Ala Ser Lys Cys Asp			
	210	215	220
Ser His Gly Thr His Leu Ala Gly Val Val Ser Gly Arg Asp Ala Gly			
225	230	235	240
Val Ala Lys Gly Ala Ser Met Arg Ser Leu Arg Val Leu Asn Cys Gln			
	245	250	255
Gly Lys Gly Thr Val Ser Gly Thr Leu Ile Gly Leu Glu Phe Ile Arg			
	260	265	270
Lys Ser Gln Leu Val Gln Pro Val Gly Pro Leu Val Val Leu Leu Pro			
	275	280	285
Leu Ala Gly Gly Tyr Ser Arg Val Leu Asn Ala Ala Cys Gln Arg Leu			
	290	295	300
Ala Arg Ala Gly Val Val Leu Val Thr Ala Ala Gly Asn Phe Arg Asp			
305	310	315	320
Asp Ala Cys Leu Tyr Ser Pro Ala Ser Ala Pro Glu Val Ile Thr Val			
	325	330	335
Gly Ala Thr Asn Ala Gln Asp Gln Pro Val Thr Leu Gly Thr Leu Gly			
	340	345	350
Thr Asn Phe Gly Arg Cys Val Asp Leu Phe Ala Pro Gly Glu Asp Ile			
	355	360	365
Ile Gly Ala Ser Ser Asp Cys Ser Thr Cys Phe Val Ser Gln Ser Gly			
	370	375	380
Thr Ser Gln Ala Ala Ala His Val Ala Gly Ile Ala Ala Met Met Leu			
385	390	395	400

Ser Ala Glu Pro Glu Leu Thr Leu Ala Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ile
 405 410 415
 His Phe Ser Ala Lys Asp Val Ile Asn Glu Ala Trp Phe Pro Glu Asp
 420 425 430
 Gln Arg Val Leu Thr Pro Asn Leu Val Ala Ala Leu Pro Pro Ser Thr
 435 440 445
 His Gly Ala Gly Trp Gln Leu Phe Cys Arg Thr Val Trp Ser Ala His
 450 455 460
 Ser Gly Pro Thr Arg Met Ala Thr Ala Val Ala Arg Cys Ala Pro Asp
 465 470 475 480
 Glu Glu Leu Leu Ser Cys Ser Ser Phe Ser Arg Ser Gly Lys Arg Arg
 485 490 495
 Gly Glu Arg Met Glu Ala Gln Gly Gly Lys Leu Val Cys Arg Ala His
 500 505 510
 Asn Ala Phe Gly Gly Glu Gly Val Tyr Ala Ile Ala Arg Cys Cys Leu
 515 520 525
 Leu Pro Gln Ala Asn Cys Ser Val His Thr Ala Pro Pro Ala Glu Ala
 530 535 540
 Ser Met Gly Thr Arg Val His Cys His Gln Gln Gly His Val Leu Thr
 545 550 555 560
 Gly Cys Ser Ser His Trp Glu Val Glu Asp Leu Gly Thr His Lys Pro
 565 570 575
 Pro Val Leu Arg Pro Arg Gly Gln Pro Asn Gln Cys Val Gly His Arg
 580 585 590
 Glu Ala Ser Ile His Ala Ser Cys Cys His Ala Pro Gly Leu Glu Cys
 595 600 605
 Lys Val Lys Glu His Gly Ile Pro Ala Pro Gln Glu Gln Val Thr Val
 610 615 620
 Ala Cys Glu Glu Gly Trp Thr Leu Thr Gly Cys Ser Ala Leu Pro Gly
 625 630 635 640
 Thr Ser His Val Leu Gly Ala Tyr Ala Val Asp Asn Thr Cys Val Val
 645 650 655
 Arg Ser Arg Asp Val Ser Thr Thr Gly Ser Thr Ser Glu Gly Ala Val
 660 665 670
 Thr Ala Val Ala Ile Cys Cys Arg Ser Arg His Leu Ala Gln Ala Ser
 675 680 685
 Gln Glu Leu Gln
 690

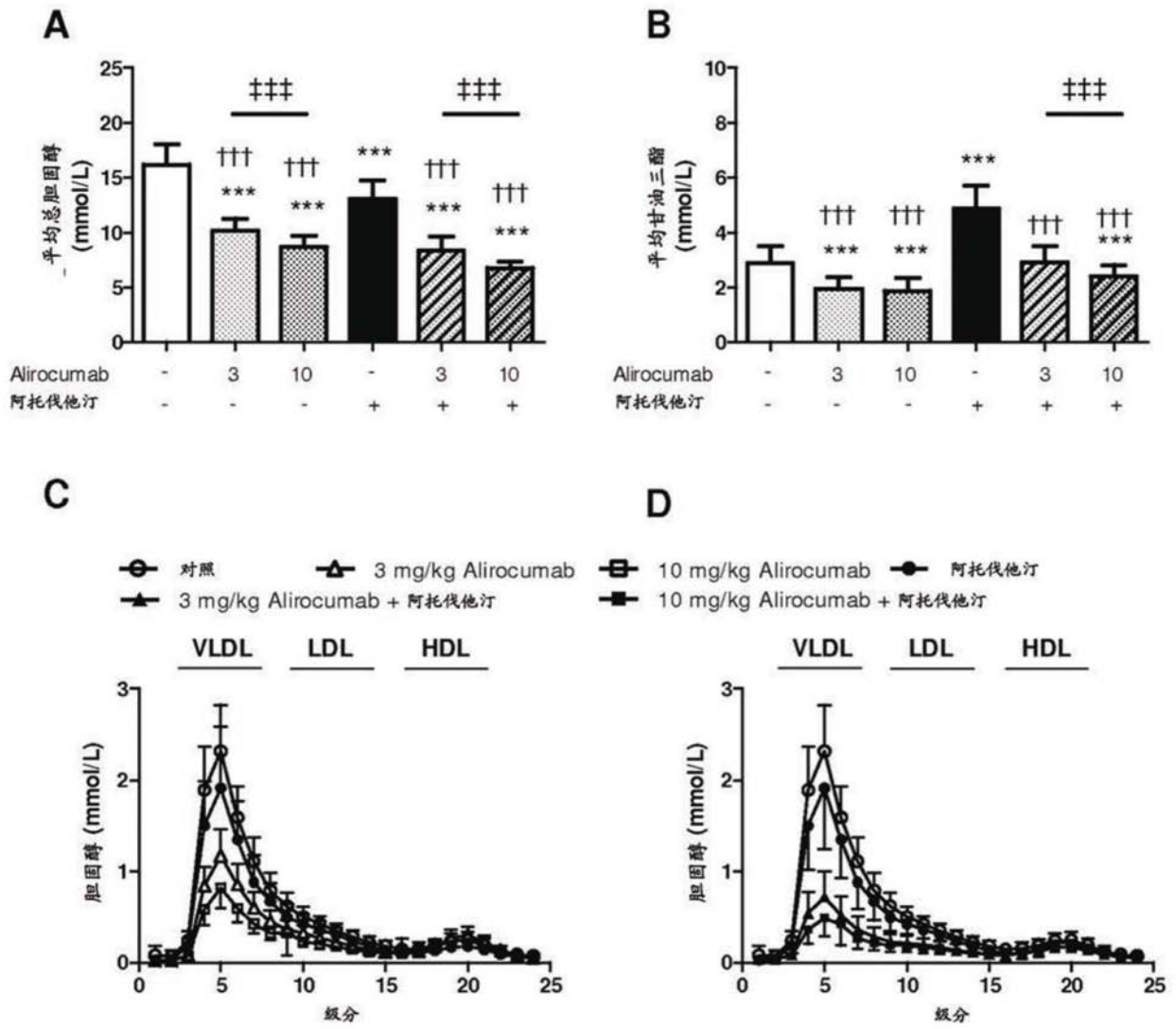


图1

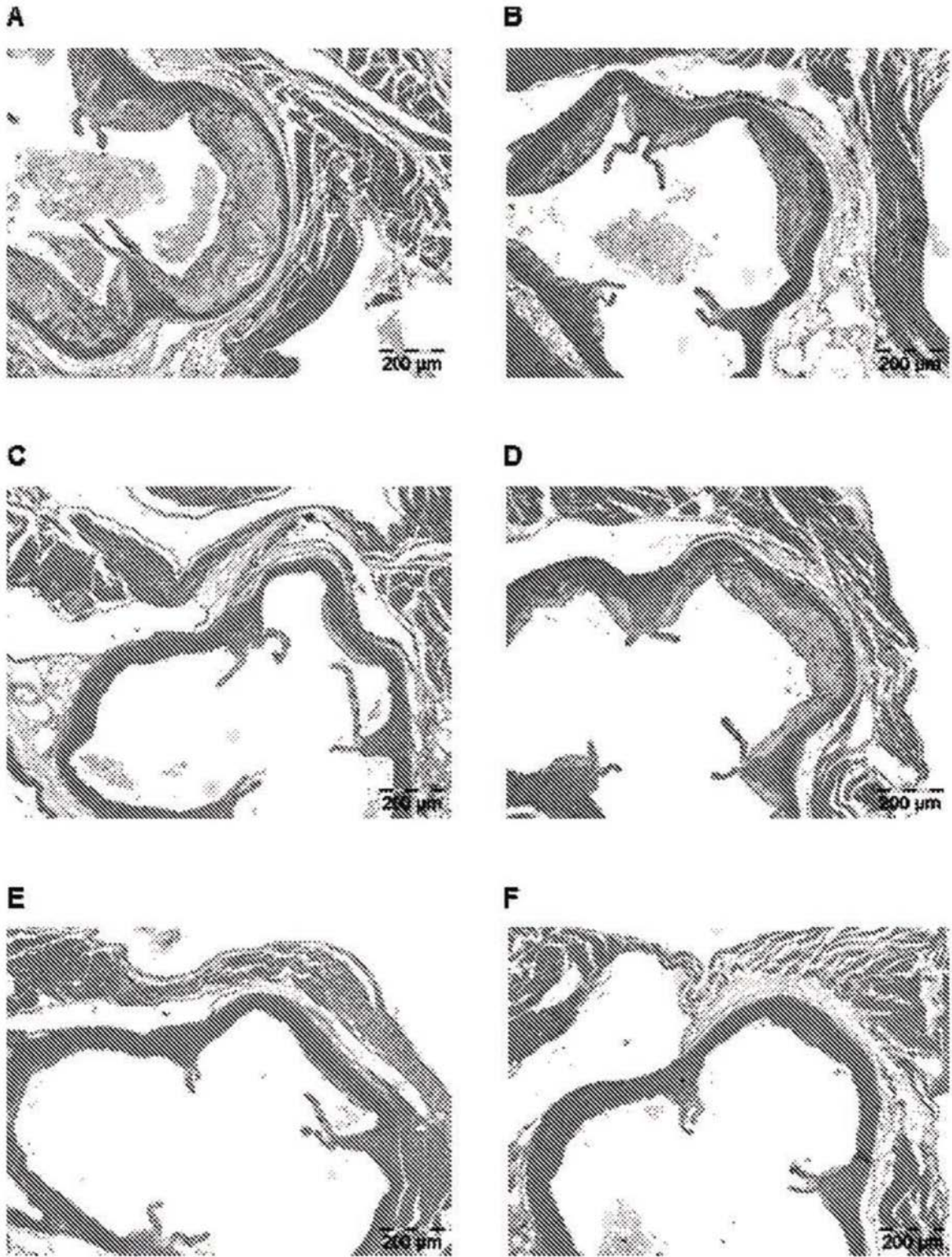


图3

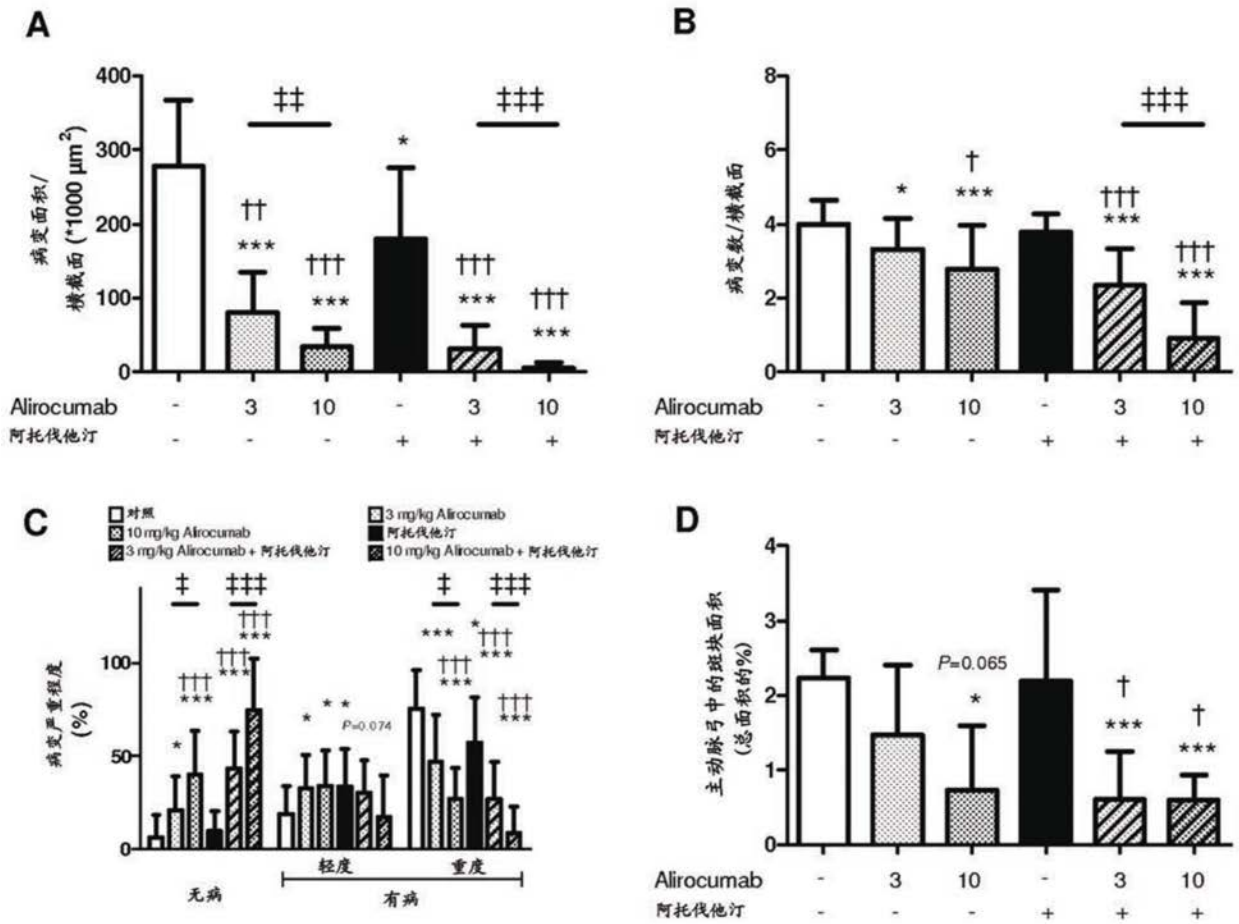


图4

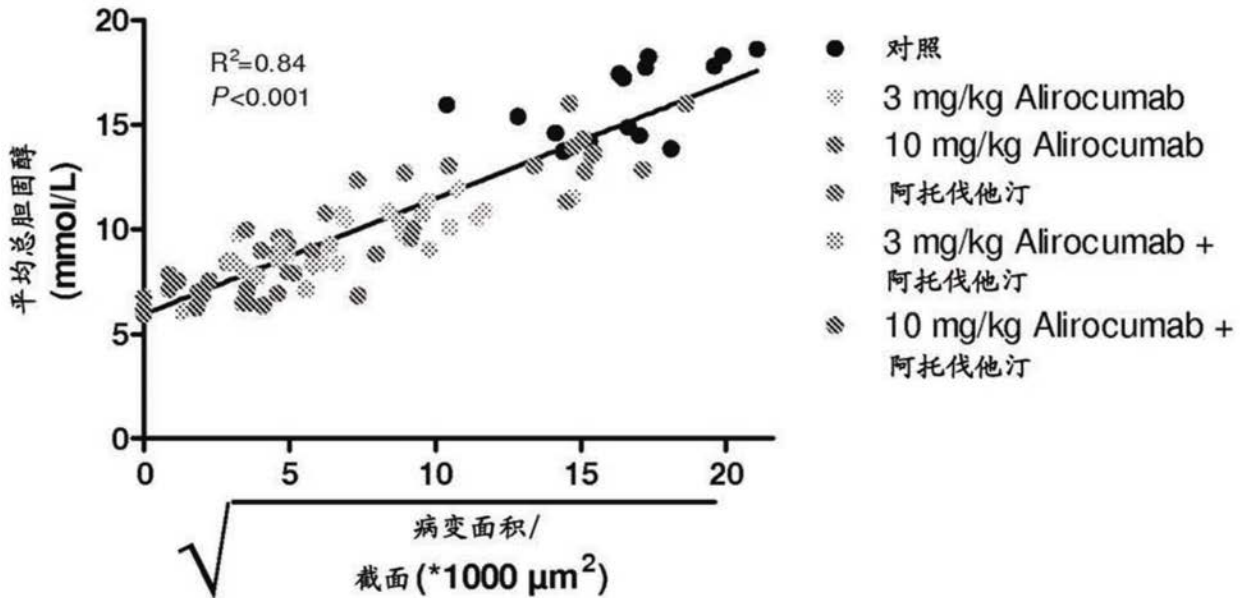


图5

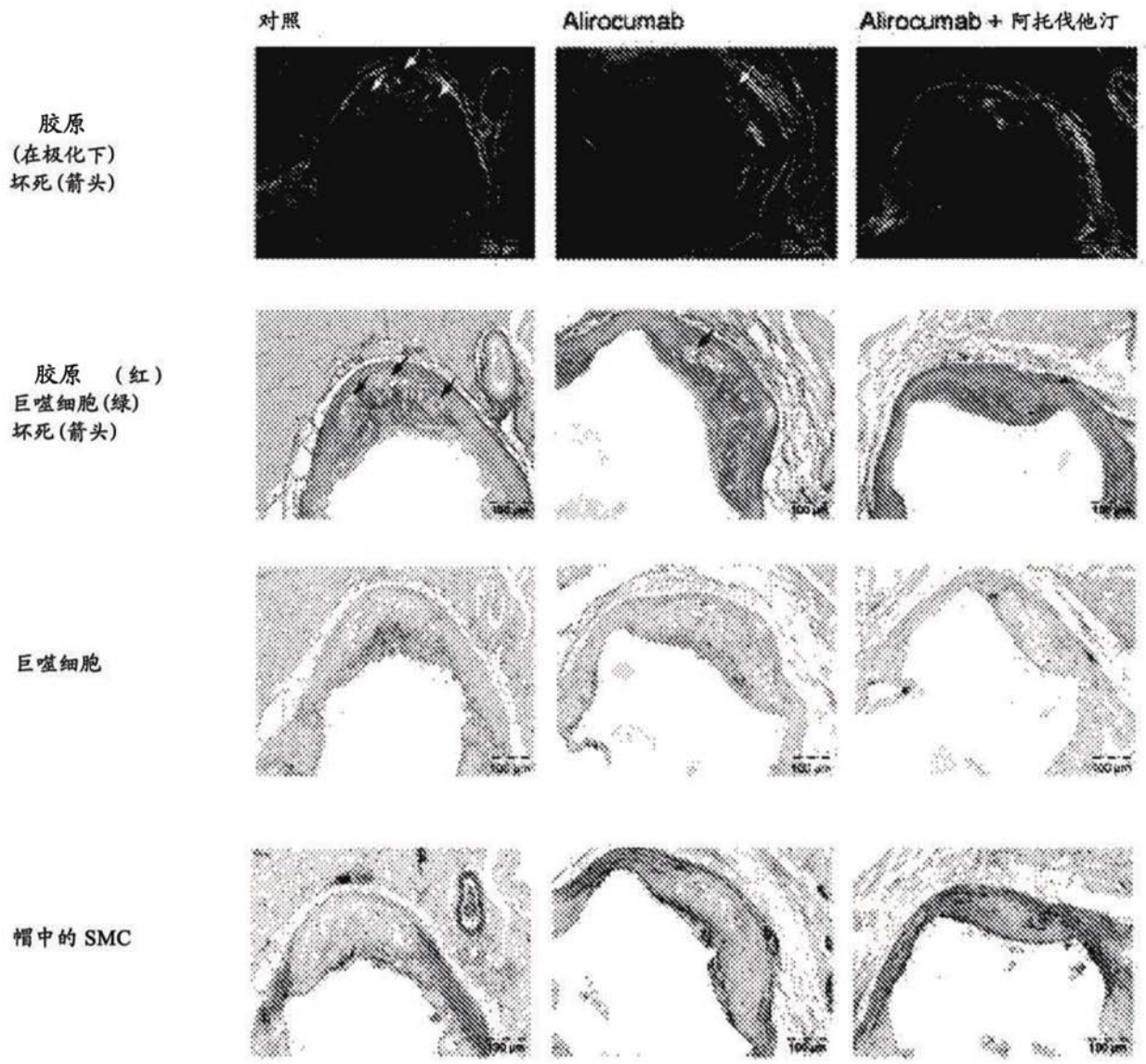
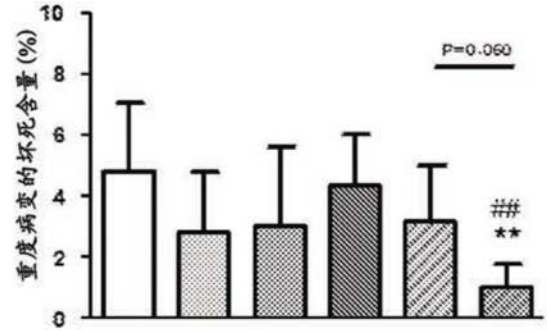
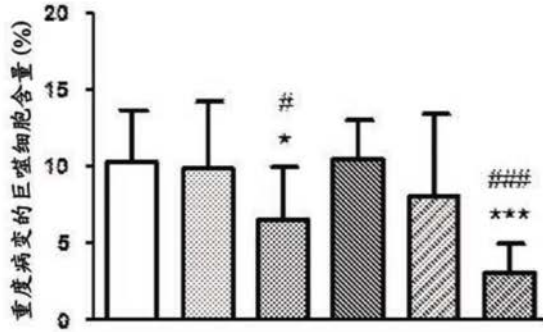


图6

A

对照 3 mg/kg Alirocumab 10 mg/kg Alirocumab
阿托伐他汀 3 mg/kg Alirocumab + 阿托伐他汀 10 mg/kg Alirocumab + 阿托伐他汀



B

对照 3 mg/kg Alirocumab 10 mg/kg Alirocumab
阿托伐他汀 3 mg/kg Alirocumab + 阿托伐他汀 10 mg/kg Alirocumab + 阿托伐他汀

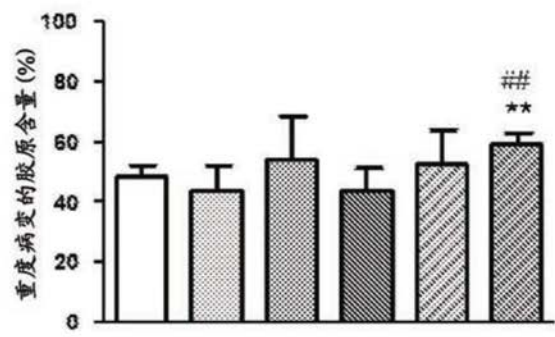
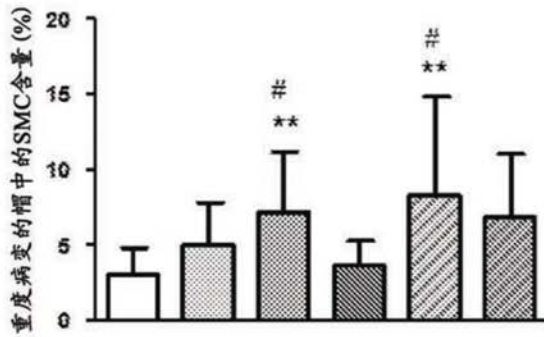


图7

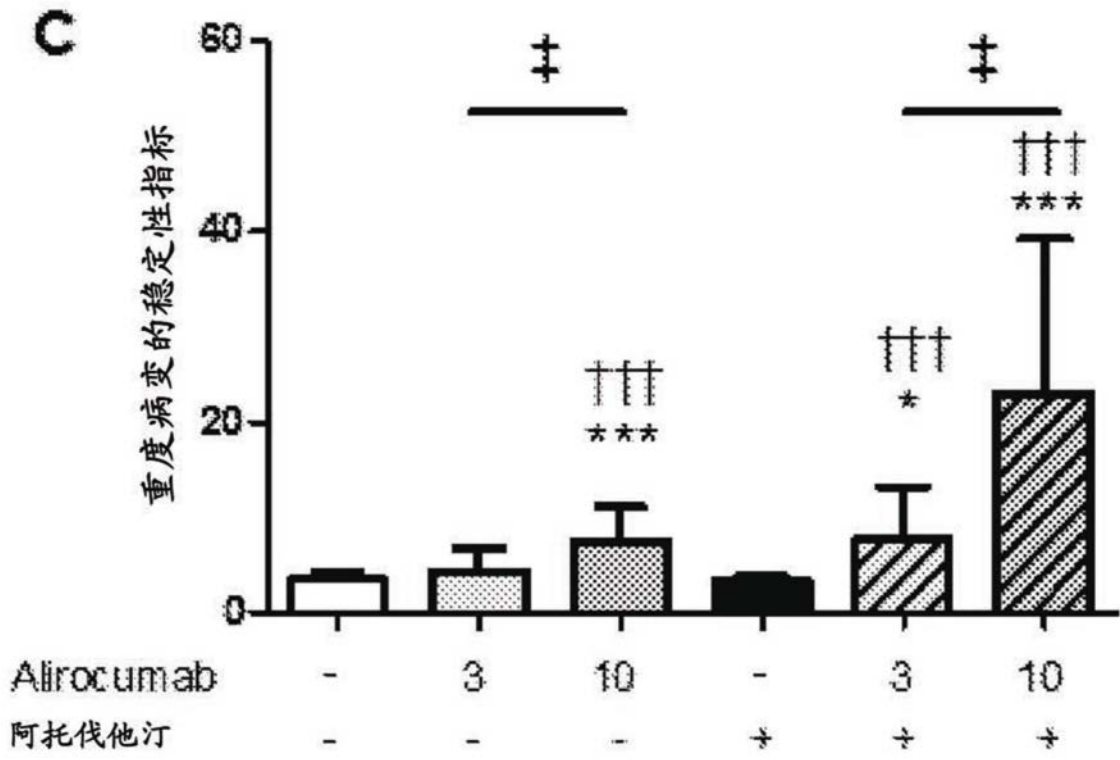


图7(续)

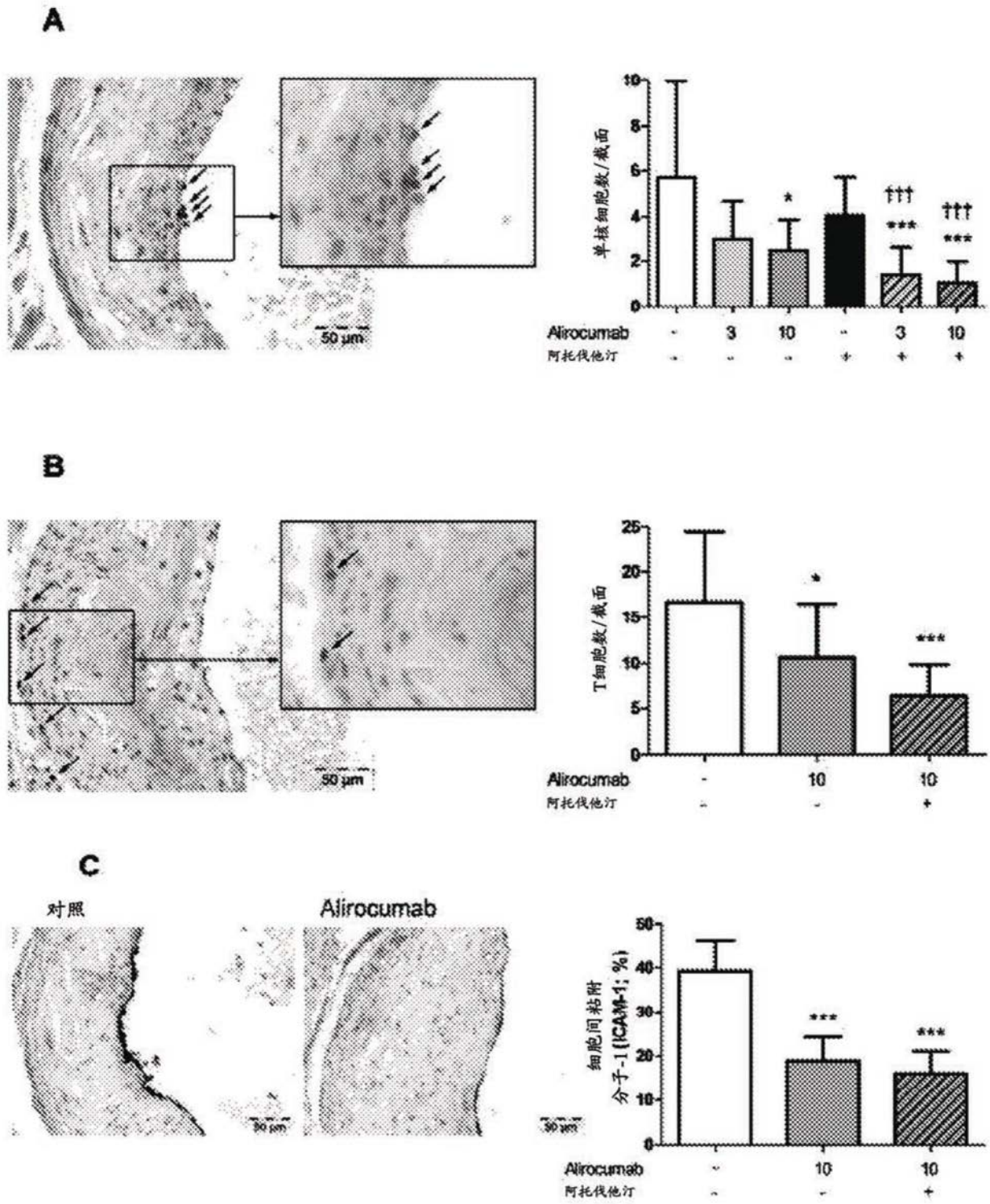


图8