



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I735499 B

(45)公告日：中華民國 110 (2021) 年 08 月 11 日

- (21)申請案號：105143912 (22)申請日：中華民國 105 (2016) 年 12 月 29 日
- (51)Int. Cl. : C07K16/28 (2006.01) A61K39/395 (2006.01)
A61P3/06 (2006.01) A61P9/10 (2006.01)
- (30)優先權：2015/12/31 中國大陸 201511024618.2
- (71)申請人：大陸商江蘇恆瑞醫藥股份有限公司(中國大陸)JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD. (CN)
中國大陸
大陸商上海恆瑞醫藥有限公司(中國大陸)SHANGHAI HENGRUI PHARMACEUTICAL CO., LTD. (CN)
中國大陸
- (72)發明人：屈向東 QU, XIANGDONG (CN)；葉鑫 YE, XIN (CN)；徐韶瑜 XU, SHAOYU (CN)；袁蓓 YUAN, BEI (CN)；崔東冰 CUI, DONGBING (CN)；胡齊悅 HU, QIYUE (CN)；張蕾 ZHANG, LEI (CN)；許志賓 XU, ZHIBIN (CN)；陶維康 TAO, WEIKANG (CN)；張連山 ZHANG, LIANSHAN (CN)；孫飄揚 SUN, PIAOYANG (CN)
- (74)代理人：洪武雄；陳昭誠
- (56)參考文獻：
US 2009/0122352A1
- 審查人員：王顛棟
- 申請專利範圍項數：34 項 圖式數：7 共 124 頁

(54)名稱

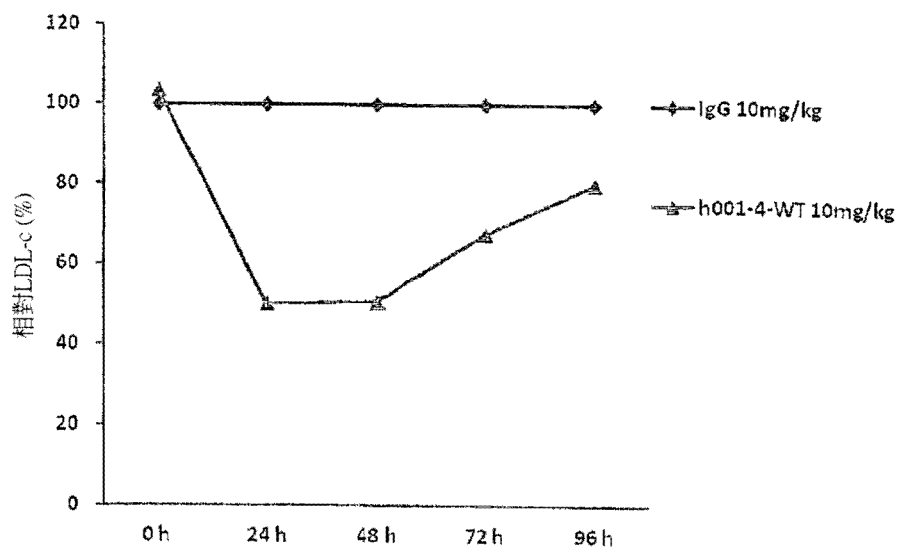
P C S K 9 抗體、其抗原結合片段及其醫藥用途

(57)摘要

本發明涉及 PCSK9 抗體、其抗原結合片段及其醫藥用途。進一步地，本發明涉及包含該 PCSK9 抗體 CDR 區的嵌合抗體、人源化抗體，以及包含 PCSK9 抗體及其抗原結合片段的醫藥組成物，以及其作為降血脂藥物的用途。特別地，本發明涉及一種人源化的 PCSK9 抗體在製備用於治療 PCSK9 介導的疾病或病症的藥物中的用途。

The present invention relates to a PCSK9 antibody, antigen-binding fragments, and pharmaceutical use thereof. Furthermore, the present invention relates to chimeric and humanized antibodies comprising the CDR regions of the present PCSK9 antibody, as well as pharmaceutical compositions comprising the present PCSK9 antibody and antigen-binding fragments thereof, and their use as hypolipidemic drugs. In particular, the present invention relates to a humanized PCSK9 antibody, and its use in preparation of a medicament for the treatment of PCSK9 mediated disease.

指定代表圖：



第6圖

I735499

發明摘要

※ 申請案號 : 105143912

※ 申請日 : 105/12/29

※ I P C 分類 : *C07K 16/28* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 3/06 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

PCSK9 抗體、其抗原結合片段及其醫藥用途

PCSK9 ANTIBODY, ANTIGEN-BINDING FRAGMENTS
AND PHARMACEUTICAL USE THEREOF

【中文】

本發明涉及 PCSK9 抗體、其抗原結合片段及其醫藥用途。進一步地，本發明涉及包含該 PCSK9 抗體 CDR 區的嵌合抗體、人源化抗體，以及包含 PCSK9 抗體及其抗原結合片段的醫藥組成物，以及其作為降血脂藥物的用途。特別地，本發明涉及一種人源化的 PCSK9 抗體在製備用於治療 PCSK9 介導的疾病或病症的藥物中的用途。

【英文】

The present invention relates to a PCSK9 antibody, antigen-binding fragments, and pharmaceutical use thereof. Furthermore, the present invention relates to chimeric and humanized antibodies comprising the CDR regions of the present PCSK9 antibody, as well as pharmaceutical compositions comprising the present PCSK9 antibody and antigen-binding fragments thereof, and their use as hypolipidemic drugs. In particular, the present invention relates to a humanized PCSK9 antibody, and its use in preparation of a medicament for the treatment of PCSK9 mediated disease.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 6 ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：無。

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無代表化學式。

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

PCSK9 抗體、其抗原結合片段及其醫藥用途

PCSK9 ANTIBODY, ANTIGEN-BINDING FRAGMENTS
AND PHARMACEUTICAL USE THEREOF

【技術領域】

本發明涉及 PCSK9 抗體、PCSK9 抗體的抗原結合片段、包含該 PCSK9 抗體 CDR 區的嵌合抗體、人源化抗體，以及包含該 PCSK9 抗體及其抗原結合片段的醫藥組成物，以及其作為降血脂藥物的用途。

【先前技術】

高膽固醇血症是一種以血清膽固醇水準升高為主要特徵的脂類代謝異常疾病，其主要表現為血清膽固醇水準升高，導致膽固醇在血管聚集，形成動脈粥樣硬化。大量的臨床及實驗研究結果都證實，脂質代謝異常和冠心病的發生、發展有著密切的關係。因此，降低血液中的膽固醇濃度成為了目前治療和預防動脈粥樣硬化的一個主要手段。

隨著我國國民生活水準的快速提高，血脂異常也成為了危害我國城鄉居民的主要因素。據 2012 年統計資料，我國每年死亡人數中約有 40% 死於心血管疾病。目前，我國成人血脂異常患病率為 18.6%，估計全國血脂異常現患人數 1.6 億。不同類型的血脂異常現患率分別為：高膽固醇

血症 2.9%，高甘油三酯血症 11.9%，低高密度脂蛋白血症 7.4%；另有 3.9% 的人血膽固醇邊緣升高。2012 年衛生部疾病預防控制專家委員會慢性病防治分委會達成的“慢性病防治中國專家共識”中提到，我國有 3300 萬高膽固醇血症患者，而從局部地區看，我國血脂異常發病率情況遠比上述資料要嚴重。

目前，臨床上調脂藥物主要以他汀類為主。立普妥 (Liptor) 作為全世界應用最廣泛的降膽固醇藥物，也是醫藥史上最暢銷藥物，通過阻斷肝臟生產膽固醇的酶作用，減少膽固醇的生產，從而增加肝臟從血液中攝取更多的膽固醇，進而減低血液中膽固醇濃度。但是立普妥也有其不足之處，首先從資料看，立普妥可以降低 30%-40% 的低密度脂蛋白，但仍然有很多病人依然無法到達有效的降低血脂 (低密度脂蛋白濃度 $<50\text{mg/dL}$)，其次病人對立普妥的回應率也有人種差異。這些原因，致使病人需要一個更為有效的降低血脂的藥物。

家族性高膽固醇血症 (Familial hypercholesterolemia, FM) 是一種常染色體單基因顯性遺傳性疾病，其臨床特徵為血總膽固醇和低密度脂蛋白膽固醇 (low density lipoprotein-cholesterol, LDL-c) 顯著升高、臉黃瘤、角膜弓以及早發的心血管疾病。低密度脂蛋白受體 (LDL receptor, LDLR) 基因突變致其缺陷或缺乏，LDL-c 不能順利轉運到肝臟清除，以致血中 LDL-c 水準升高。目前已明確 3 種基因與 FM 的發生有關，它們分別是 LDLR 基因、載脂蛋白

B100 基因和 PCSK9 (proprotein convertase subtilisin/kexin type 9) 基因。

前蛋白轉化酶枯草溶菌素 9(PCSK9) 是一種前蛋白轉化酶，屬於分泌的枯草桿菌酶家族的蛋白酶 K 亞族。該編碼蛋白是作為可溶性酶原合成的，在內質網中經過自身催化分子內加工。實驗結果顯示，PCSK9 促進 LDL 受體的降解從而增加血漿中 LDL 膽固醇含量，而 LDL 受體介導肝內的 LDL 胞吞過程，後者是從循環系統清除 LDL 的主要途徑。研究發現，12.5% 的高膽固醇血症 (ADH) 患者檢測有 PCSK9 基因突變。PCSK9 突變形式多樣，根據突變對 PCSK9 調節 LDL-C 水準的不同影響可分為兩類：功能缺失型和功能獲得型。其中功能缺失型突變與低血膽固醇水準有關，有預防冠狀動脈粥樣硬化性心臟病發生的作用，非洲人群中低膽固醇的 PCSK9 突變率高於其他種族。PCSK9 功能獲得型突變體通過增加 PCSK9 的功能、降低 LDLR 的表達而升高血漿膽固醇水準，可以導致嚴重高膽固醇血症和早發冠狀動脈粥樣硬化性心臟病，目前發現的 PCSK9 功能獲得型突變包括：D374Y、S127R、F216L、N157K、R306S 等。其中，與 PCSK9 野生型相比，D374Y 突變體細胞表面的 LDLR 減少了 36%，S127R 突變有相應減少了 10%。

目前 PCSK9 作為一個極具潛力的，新的靶標已成為高膽固醇血症研究的熱點，對於深入瞭解膽固醇代謝的機制和尋求新的治療手段有重要意義。有多家跨國製藥公司在研發針對 PCSK9 的單株抗體，它通過在血液中中和

PCSK9，從而增加了肝臟表面 LDL 受體的濃度，進而達到降低血液中 LDL 濃度的目標。相關的專利有 WO2011111007、WO2011072263、WO2013170367、WO2013169886、WO2013148284、WO2013091103、WO2013039958、WO2013039969、WO2013016648、WO2013008185、WO2012170607、WO2012168491、WO2012154999、WO2012109530、WO2012101251、WO2012088313、US8829165 B2、US8563698B2、US8859741B2、US8871913B2、US8871914B2、US8883983B2、WO2012058137 和 WO2012054438。

本發明提供有著更高親和力、更高選擇性、更高生物活性的 PCSK9 抗體。

【發明內容】

本發明提供一種 PCSK9 抗體或其抗原結合片段，其包含一個或多個選自以下的 CDR：如序列 SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13 或 SEQ ID NO: 14 所示的、或與 SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13 或 SEQ ID NO: 14 具有至少 95% 序列同一性的序列所示的 HCDR；和如序列 SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16 或 SEQ ID NO: 17 所示的、或與 SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16 或 SEQ ID NO: 17 具有至少 95% 序列同一性的序列所示的 LCDR。

在本發明另一個較佳的實施方案中，本發明所述的 PCSK9 抗體或其抗原結合片段，其包含分別如 SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13 和 SEQ ID NO:14 所示的 HCDR1、

HCDR2 和 HCDR3，或包含分別與 SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13 和 SEQ ID NO:14 具有至少 95% 序列同一性的序列所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3。

在本發明另一個較佳的實施方案中，本發明所述的 PCSK9 抗體或其抗原結合片段，其包含分別如 SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16 和 SEQ ID NO: 17 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，或包含分別與 SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16 和 SEQ ID NO: 17 具有至少 95% 序列同一性的序列所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

上述的具有至少 95% 序列同一性的胺基酸序列，可以是藉由親和力成熟的技術手段，對本發明的 CDR 區進行突變獲得的。

在本發明另一個較佳的實施方案中，本發明所述的 PCSK9 抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段為鼠源抗體或其片段。

在本發明另一個較佳的實施方案中，本發明所述的 PCSK9 抗體或其抗原結合片段，其中該 PCSK9 抗體的輕鏈可變區進一步包含鼠源 κ 鏈或鼠源 κ 鏈變體的輕鏈 FR 區、或者鼠源 λ 鏈或鼠源 λ 鏈變體的輕鏈 FR 區；其中該 PCSK9 抗體的重鏈可變區進一步包含鼠源 IgG1 或其變體的重鏈 FR 區、或 IgG2 或其變體的重鏈 FR 區、或 IgG3 或其變體的重鏈 FR 區。

在本發明另一個較佳的實施方案中，本發明所述的 PCSK9 抗體或其抗原結合片段，其中該鼠源抗體包含 SEQ

ID NO: 10 的重鏈可變區序列和 SEQ ID NO: 11 的輕鏈可變區序列。

在本發明另一個較佳的實施方案中，本發明所述的 PCSK9 抗體或其抗原結合片段，其中該 PCSK9 抗體的輕鏈進一步包含鼠源 κ 鏈或其變體的輕鏈恒定區、或者鼠源 λ 鏈或其變體的輕鏈恒定區；其中該 PCSK9 抗體重鏈進一步包含鼠源 IgG1 或其變體的重鏈恒定區、或 IgG2 或其變體的重鏈恒定區、或 IgG3 或其變體的重鏈恒定區。

在本發明另一個較佳的實施方案中，本發明所述的 PCSK9 抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段為嵌合抗體或其片段。

在本發明另一個較佳的實施方案中，本發明所述的 PCSK9 抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段為人源化抗體或其片段。

在本發明另一個較佳的實施方案中，本發明所述的 PCSK9 抗體或其抗原結合片段，其中該人源化抗體重鏈可變區上的重鏈 FR 區序列來源於人種系重鏈，IGHV1-2*02 和 hjh2 的組合序列及其突變序列；其包含人種系重鏈 IGHV1-2*02 的 FR1、FR2、FR3 區和 hjh2 的 FR4 區及其突變序列，或與其具有至少 95% 序列同一性的胺基酸序列。

在本發明另一個較佳的實施方案中，本發明所述的 PCSK9 抗體或其抗原結合片段，其中該人源化抗體含有 SEQ ID NO:18 所示的重鏈可變區；或 SEQ ID NO:18 變體所示的重鏈可變區；其中該 SEQ ID NO:18 變體是在 SEQ ID

NO:18 所示的重鏈可變區位置上具有 0-10 個胺基酸變化的序列。該胺基酸變化可以用現有技術，為提高抗體如親和性、半衰期等性能做的改進，如用親和力成熟修改 CDR 區的胺基酸，或者用回復突變修改 FR 區的胺基酸。

在本發明另一個較佳的實施方案中，本發明所述的 PCSK9 抗體或其抗原結合片段，其中該人源化抗體重鏈 FR 區序列有 0-10 個胺基酸的回復突變，較佳為一個或多個選自 T30N、R87T、R72A、T74K、M48I、V68A、M70L、R38K 和 R67K 的胺基酸回復突變。

在本發明另一個較佳的實施方案中，本發明所述的 PCSK9 抗體或其抗原結合片段，其中該人源化抗體包含選自 SEQ ID NO:19、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22 和 SEQ ID NO: 23 的序列所示的重鏈可變區。

在本發明另一個較佳的實施方案中，本發明所述的 PCSK9 抗體或其抗原結合片段，其中該人源化抗體輕鏈可變區上的輕鏈 FR 區序列來源於人種系輕鏈範本 IGKV1-39*01 和 hjk2.1 的組合序列及其突變序列；其包含人種系輕鏈 IGKV1-39*01 的 FR1、FR2、FR3 區和 hjk2.1 的 FR4 區及其突變序列，或與其具有至少 95% 序列同一性的胺基酸序列。

在本發明另一個較佳的實施方案中，本發明所述的 PCSK9 抗體或其抗原結合片段，其中該人源化抗體進一步包含 SEQ ID NO:24 所示的、或 SEQ ID NO:24 變體所示的輕鏈可變區；該 SEQ ID NO:24 變體是在 SEQ ID NO:24 所

示的輕鏈可變區位置上具有 0-10 的胺基酸變化。該胺基酸變化可以用現有技術，為提高抗體如親和性、半衰期等性能做的改進，如用親和力成熟修改 CDR 區的胺基酸，或者用回復突變修改 FR 區的胺基酸。

在本發明另一個較佳的實施方案中，本發明所述的 PCSK9 抗體或其抗原結合片段，其中該 SEQ ID NO:24 變體是在 SEQ ID NO:24 所示的輕鏈可變區的 FR 區位置上具有 0-10 個胺基酸的回復突變；較佳的，該回復突變選自 T5S, S66D, Q3V 和 A49S 的胺基酸回復突變；較佳為 A43S 的胺基酸變化。

在本發明另一個較佳的實施方案中，本發明所述的 PCSK9 抗體或其抗原結合片段，其中該人源化抗體包含選自 SEQ ID NO:25、SEQ ID NO: 26 和 SEQ ID NO: 27 的序列所示的輕鏈可變區。

在本發明另一個較佳的實施方案中，本發明所述的 PCSK9 抗體或其抗原結合片段，其中該人源化抗體包含重鏈可變區序列和/或輕鏈可變區序列，該重鏈可變區序列選自 SEQ ID NO:19、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22 和 SEQ ID NO: 23 所示的序列，或該重鏈可變區序列選自與 SEQ ID NO:19、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22 和 SEQ ID NO: 23 具有至少 95% 序列同一性的序列；該輕鏈可變區序列選自 SEQ ID NO:25、SEQ ID NO: 26 和 SEQ ID NO: 27 所示的序列，或該輕鏈可變區序列選自與 SEQ ID NO:25、SEQ ID NO: 26 和 SEQ ID NO: 27 具有

至少 95% 序列同一性序列。

在本發明另一個較佳的實施方案中，本發明所述的 PCSK9 抗體或其抗原結合片段，其中該 PCSK9 抗體包含選自以下的重鏈可變區和輕鏈可變區：

1) SEQ ID NO: 18 的重鏈可變區和 SEQ ID NO: 25 的輕鏈可變區，

2) SEQ ID NO: 18 的重鏈可變區和 SEQ ID NO: 26 的輕鏈可變區，

3) SEQ ID NO: 18 的重鏈可變區和 SEQ ID NO: 27 的輕鏈可變區，

4) SEQ ID NO: 19 的重鏈可變區和 SEQ ID NO: 24 的輕鏈可變區，

5) SEQ ID NO: 19 的重鏈可變區和 SEQ ID NO: 25 的輕鏈可變區，

6) SEQ ID NO: 19 的重鏈可變區和 SEQ ID NO: 26 的輕鏈可變區，

7) SEQ ID NO: 19 的重鏈可變區和 SEQ ID NO: 27 的輕鏈可變區，

8) SEQ ID NO: 20 的重鏈可變區和 SEQ ID NO: 24 的輕鏈可變區，

9) SEQ ID NO: 20 的重鏈可變區和 SEQ ID NO: 25 的輕鏈可變區，

10) SEQ ID NO: 20 的重鏈可變區和 SEQ ID NO: 26 的輕鏈可變區，

11) SEQ ID NO: 20 的重鏈可變區和 SEQ ID NO: 27 的輕鏈可變區，

12) SEQ ID NO: 21 的重鏈可變區和 SEQ ID NO: 24 的輕鏈可變區，

13) SEQ ID NO: 21 的重鏈可變區和 SEQ ID NO: 25 的輕鏈可變區，

14) SEQ ID NO: 21 的重鏈可變區和 SEQ ID NO: 26 的輕鏈可變區，

15) SEQ ID NO: 21 的重鏈可變區和 SEQ ID NO: 27 的輕鏈可變區，

16) SEQ ID NO: 22 的重鏈可變區和 SEQ ID NO: 24 的輕鏈可變區，

17) SEQ ID NO: 22 的重鏈可變區和 SEQ ID NO: 25 的輕鏈可變區，

18) SEQ ID NO: 22 的重鏈可變區和 SEQ ID NO: 26 的輕鏈可變區，

19) SEQ ID NO: 22 的重鏈可變區和 SEQ ID NO: 27 的輕鏈可變區，

20) SEQ ID NO: 23 的重鏈可變區和 SEQ ID NO: 24 的輕鏈可變區，

21) SEQ ID NO: 23 的重鏈可變區和 SEQ ID NO: 25 的輕鏈可變區，

22) SEQ ID NO: 23 的重鏈可變區和 SEQ ID NO: 26 的輕鏈可變區，

23) SEQ ID NO: 23 的重鏈可變區和 SEQ ID NO: 27 的輕鏈可變區，和

24) SEQ ID NO: 18 的重鏈可變區和 SEQ ID NO: 24 的輕鏈可變區。

在本發明另一個較佳的實施方案中，本發明所述的 PCSK9 抗體或其抗原結合片段，其中該 PCSK9 抗體的重鏈進一步包含人源 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 或其變體的重鏈恒定區，或與其具有至少 95% 序列同一性的胺基酸序列；較佳包含人源 IgG1、IgG2 或 IgG4 或使用胺基酸突變延長抗體在血清中的半衰期的 IgG1、IgG2 或 IgG4 變體的重鏈恒定區，更佳包含引入 YTE 突變的 IgG1、IgG2 或 IgG4 重鏈恒定區；

其中所述 PCSK9 抗體的輕鏈進一步包含人源 κ 、 λ 鏈或其變體的恒定區，或與其具有至少 95% 序列同一性的胺基酸序列。

在本發明另一個較佳的實施方案中，本發明所述的 PCSK9 抗體或其抗原結合片段，其中該人源化抗體包含選自以下的重鏈和輕鏈：

- 1) SEQ ID NO: 28 的重鏈和 SEQ ID NO: 30 的輕鏈，和
- 2) SEQ ID NO: 32 的重鏈和 SEQ ID NO: 30 的輕鏈。

本發明進一步提供一種醫藥組成物，其含有治療有效量的如上所述的 PCSK9 抗體或其抗原結合片段，以及一種或多種藥學上可接受的載體、稀釋劑或賦形劑。

本發明進一步提供一種編碼如上所述的 PCSK9 抗體或

其抗原結合片段的 DNA 分子。

本發明進一步提供一種如上所述的 DNA 分子的表達載體。

本發明進一步提供一種如上所述的表達載體轉化的宿主細胞，該宿主細胞選自原核細胞和真核細胞，較佳為真核細胞，更佳為哺乳動物細胞。

本發明進一步提供一種如上所述的 PCSK9 抗體或其抗原結合片段或如上所述的醫藥組成物，在製備用於治療 PCSK9 介導的疾病或病症的藥物中的用途，其中該疾病或病症較佳為膽固醇相關疾病(其包括“血清膽固醇相關疾病”)；更佳為高膽固醇血症、心臟病、代謝綜合症、糖尿病、冠狀動脈心臟病、中風、心血管疾病、阿爾茨海默病和一般性的異常脂血症；最佳為高膽固醇血症、異常脂血症、動脈粥樣硬化、CVD 或冠狀動脈心臟病。

可以使用本發明的抗體診斷的示例性疾病包括膽固醇相關疾病(其包括“血清膽固醇相關疾病”)，其包括以下的任何一種或多種：高膽固醇血症、心臟病、代謝綜合症、糖尿病、冠狀動脈心臟病、中風、心血管疾病、阿爾茨海默病和一般性的異常脂血症(其顯示為例如提高的總血清膽固醇、提高的 LDL、提高的甘油三酯、提高的極低密度脂蛋白(VLDL)和/或低的 HDL)。

在一方面中，本發明提供治療或預防個體中的高膽固醇血症和/或至少一種以下症狀的方法：異常脂血症、動脈粥樣硬化、心血管疾病(CVD) 或冠狀動脈心臟病，該方法

包括向所述個體施用有效量的抗 PCSK9 抗體。本發明還提供有效量的拮抗胞外或循環 PCSK9 的抗 PCSK9 抗體在製備藥物中的用途，該藥物用於治療或預防個體的高膽固醇血症和/或至少一種以下症狀：異常脂血症、動脈粥樣硬化、CVD 或冠狀動脈心臟病。

【圖式簡單說明】

第 1 圖為本發明抗體載體構建中的引子設計示意圖。

第 2 圖為本發明抗體載體構建示意圖。

第 3 圖為不同 h001-4-YTE 抗 PCSK9 抗體濃度中 HepG2 細胞的 LDL 攝取變化。資料結果顯示 PCSK9 抗體能夠促進 HepG2 細胞攝取 LDL。

第 4 圖為不同 h001-4-WT 抗 PCSK9 抗體濃度中 HepG2 細胞的 LDL 攝取變化。資料結果顯示 PCSK9 抗體能夠促進 HepG2 細胞攝取 LDL。

第 5 圖為注射 h001-4-WT 抗 PCSK9 抗體的小鼠血清中 LDL-c 濃度隨時間變化 (*：p<0.05,vs IgG ， **：p<0.01,vs IgG)。資料結果顯示 PCSK9 抗體能夠降低過表達人 PCSK9 的小鼠血清中 LDL-c 濃度。

第 6 圖為注射 h001-4-WT 抗 PCSK9 抗體的小鼠血清中相對 IgG 組的 LDL-c 濃度變化。資料結果顯示相對 IgG 組，PCSK9 抗體能夠降低過表達人 PCSK9 的小鼠血清中 LDL-c 濃度。

第 7 圖為本發明抗體在食蟹猴體內藥效及藥代檢測。該圖顯示 h001-4-WT 和 h001-4-YTE 均能夠明顯降低食蟹猴

體內 LDL 的含量，且 h001-4-YTE 的降低持續時間要優於 h001-4-WT。

【實施方式】

術語定義

為了更容易理解本發明，以下具體定義了某些技術和科學術語。除非在本文中另有明確定義，本文使用的所有其它技術和科學術語都具有本發明所屬領域的一般技術人員通常理解的含義。

本發明所用胺基酸三字母代碼和單字母代碼如 J.biol.chem,243,p3558(1968)中所述。

本發明所述的“抗體”指免疫球蛋白，是由兩條相同的重鏈和兩條相同的輕鏈藉由鏈間二硫鍵連接而成的四肽鏈結構。免疫球蛋白重鏈恒定區的胺基酸組成和排列順序不同，故其抗原性也不同。據此，可將免疫球蛋白分為五類，或稱為免疫球蛋白的同種型，即 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE，其相應的重鏈分別為 μ 鏈、 δ 鏈、 γ 鏈、 α 鏈、和 ϵ 鏈。同一類 Ig 根據其鉸鏈區胺基酸組成和重鏈二硫鍵的數目和位置的差別，又可分為不同的亞類，如 IgG 可分為 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4。輕鏈藉由恒定區的不同分為 κ 鏈或 λ 鏈。五類 Ig 中每類 Ig 都可以有 κ 鏈或 λ 鏈。

在本發明中，本發明所述的抗體輕鏈可變區可進一步包含輕鏈恒定區，該輕鏈恒定區包含人源或鼠源的 κ 、 λ 鏈或其變體。

在本發明中，本發明所述的抗體重鏈可變區可進一步

包含重鏈恒定區，該重鏈恒定區包含人源或鼠源的 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 或其變體。

抗體重鏈和輕鏈靠近 N 端的約 110 個胺基酸的序列變化很大，為可變區（Fv 區）；靠近 C 端的其餘胺基酸序列相對穩定，為恒定區（Fc 區）。可變區包括 3 個高變區（HVR）和 4 個序列相對保守的骨架區（FR）。3 個高變區決定抗體的特異性，又稱為互補性決定區（CDR）。每條輕鏈可變區（LCVR）和重鏈可變區（HCVR）由 3 個 CDR 區 4 個 FR 區組成，從胺基端到羧基端依次排列的順序為：FR1，CDR1，FR2，CDR2，FR3，CDR3，FR4。輕鏈的 3 個 CDR 區指 LCDR1、LCDR2、和 LCDR3；重鏈的 3 個 CDR 區指 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3。本發明所述的抗體或抗原結合片段的 LCVR 區和 HCVR 區的 CDR 胺基酸殘基在數量和位置符合已知的 Kabat 編號規則（LCDR1-3，HCDE2-3），或者符合 kabat 和 chothia 的編號規則（HCDR1）。

本發明的抗體包括鼠源抗體、嵌合抗體、人源化抗體，較佳為人源化抗體。

術語“鼠源抗體”在本發明中為根據本領域知識和技能製備的對人 PCSK9 的單株抗體。製備時用 PCSK9 抗原注射試驗對象，然後分離表達具有所需序列或功能特性的抗體的雜交瘤。在本發明一個較佳的實施方案中，該鼠源 PCSK9 抗體或其抗原結合片段，可進一步包含鼠源 κ 、 λ 鏈或其變體的輕鏈恒定區，或進一步包含鼠源 IgG1、IgG2、IgG3 或其變體的重鏈恒定區。

術語“嵌合抗體 (chimeric antibody)”，是將鼠源性抗體的可變區與人抗體的恒定區融合而成的抗體，可以減輕鼠源性抗體誘發的免疫應答反應。建立嵌合抗體，要選建立分泌鼠源性特異性單抗的雜交瘤，然後從小鼠雜交瘤細胞中選殖可變區基因，再根據需要選殖人抗體的恒定區基因，將小鼠可變區基因與人恒定區基因連接成嵌合基因後插入人載體中，最後在真核工業系統或原核工業系統中表達嵌合抗體分子。在本發明一個較佳的實施方案中，該 PCSK9 嵌合抗體的抗體輕鏈進一步包含人源 κ 、 λ 鏈或其變體的輕鏈 Fc 區。該 PCSK9 嵌合抗體的抗體重鏈進一步包含人源 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 或其變體的重鏈 Fc 區，較佳包含人源 IgG1、IgG2 或 IgG4 重鏈恒定區，或者使用胺基酸突變(如 YTE 突變)後延長抗體在血清中的半衰期的 IgG1、IgG2 或 IgG4 變體。

術語“人源化抗體 (humanized antibody)”，也稱為 CDR 移植抗體 (CDR-grafted antibody)，是指將小鼠的 CDR 序列移植到人的抗體可變區框架，即不同類型的人種系抗體框架序列中產生的抗體。可以克服嵌合抗體由於攜帶大量小鼠蛋白成分，從而誘導的強烈的抗體可變抗體反應。此類框架序列可以從包括種系抗體基因序列的公共 DNA 數據庫或公開的參考文獻獲得。如人重鏈和輕鏈可變區基因的種系 DNA 序列可以在“VBase”人種系序列數據庫 (在因特網 www.mrccpe.com.ac.uk/vbase 可獲得)，以及在 Kabat, E.A. 等人, 1991 Sequences of Proteins of

Immunological Interest，第 5 版中找到。為避免免疫原性下降的同時，引起的活性下降，可對所述的人抗體可變區框架序列進行最少反向突變或回復突變，以保持活性。本發明的人源化抗體也包括進一步由噬菌體展示對 CDR 進行親和力成熟後的人源化抗體。在本發明一個較佳的實施方案中，該 PCSK9 人源化抗體小鼠的 CDR 序列選自 SEQ ID NO:12, 13, 14, 15, 16 或 17；人的抗體可變區框架經過設計選擇，其中該抗體輕鏈可變區上的輕鏈 FR 區序列，來源於人種系輕鏈 IGKV1-39*01 和 hjk2.1 的組合序列；其中該抗體重鏈可變區上的重鏈 FR 區序列，來源於人種系重鏈 IGHV1-2*02 和 hjh2 的組合序列。為避免免疫原性下降的同時，引起的活性下降，可對該人抗體可變區可進行最少反向突變，以保持活性。

本發明中所述的“抗原結合片段”，指具有抗原結合活性的 Fab 片段，Fab' 片段，F(ab')₂ 片段，以及與人 PCSK9 結合的 Fv 片段 ScFv 片段；其包含選自 SEQ ID NO:12 至 SEQ ID NO:17 中的一個或多個本發明抗體的 CDR 區。Fv 片段含有抗體重鏈可變區和輕鏈可變區，但沒有恒定區，並具有全部抗原結合位元元點的最小抗體片段。一般地，Fv 抗體還包含在 VH 和 VL 結構域之間的多肽接頭，且能夠形成抗原結合所需的結構。也可以用不同的連接物將兩個抗體可變區連接成一條多肽鏈，稱為單鏈抗體 (single chain antibody) 或單鏈 Fv (sFv)。本發明的術語“與 PCSK9 結合”，指能與人 PCSK9 相互作用。本發明的

術語“抗原結合位點”指抗原上不連續的，由本發明抗體或抗原結合片段識別的三維空間位點。

術語“Fc 區”在本文中用於定義免疫球蛋白重鏈的 C 端區域，該區域包含至少一部分的恒定區。該術語包括天然序列 Fc 區和變體 Fc 區。在某些實施方案中，人 IgG 重鏈 Fc 區從 Cys226 或 Pro230 延伸至重鏈的羰基端。然而，Fc 區的 C 端賴胺酸(Lys447) 可以存在或者可以不存在。除非另外說明，Fc 區或恒定區中的胺基酸殘基的編號是根據 EU 編號系統，其也被稱為 EU 索引，如在 Kabat 等，Sequences of Proteins of Immunological Interest(免疫學感興趣的蛋白質的序列)，5th Ed.Public Health Service，National Institutes of Health，Bethesda，MD，1991 中所述。Fc 區域是抗體的效應子功能所必需的。效應子功能包括啟動補體依賴的細胞毒性(CDC)、啟動吞噬作用和抗體依賴的細胞介導的細胞毒性(ADCC) 並藉由胞轉作用轉運抗體通過細胞屏障。此外，Fc 區域對維持 IgG 類抗體的血清半衰期至關重要(Ward 和 Ghetie，Ther. Immunol.2: 77-94(1995))。研究發現 IgG 抗體的血清半衰期由 Fc 和新生 Fc 受體(FcRn) 的結合來介導。FcRn 是由跨膜 α 鏈和可溶性 β 鏈(β 2- 微球蛋白) 組成的異源二聚體。美國專利第 6,165,745 號公開了一種藉由將突變引入編碼抗體的 DNA 片段生產生物半衰期減少的抗體的方法。該突變包括在 Fc- 絞鏈結構域的位置 253、310、311、433 或 434 處的胺基酸取代。美國專利第 6,277,375B1 號公開了含有突變

型 IgG 分子的組合物，該分子相對野生型 IgG 血清半衰期增加，其中該突變型 IgG 分子含有以下胺基酸取代：在 252 位蘇胺酸取代亮胺酸，在 254 位蘇胺酸取代絲胺酸，或在 256 位蘇胺酸取代苯丙胺酸 (M252Y、S254T 和 T256E)。也公開了在位置 433、435 或 436 處具有胺基酸取代的突變型 IgG。美國專利第 6,528,624 號公開了含有 IgG Fc 區域的一種抗體的變體，該變體在人 IgG Fc 區域的一個或多個胺基酸位置(位置 270、322、326、327、329、331、333 和 334) 具有胺基酸取代。PCT 公開號 WO 02/060919A2 公開了修飾的 IgG，該修飾的 IgG 包含的 IgG 恒定區相對於野生型 IgG 恒定區含有一個或多個胺基酸修飾，其中該修飾的 IgG 與含有野生型 IgG 恒定區的 IgG 相比增加了半衰期，並且其中一個或多個胺基酸修飾位於以下一個或多個位置：251、253、255、285-290、308-314、385-389、和 428-435。具體地，本文所述“YTE”或“YET 突變”指 IgG1 的 Fc 區的一個突變組合，用於促進 Fc 區與人 FcRn 的結合，延長抗體在人血清中的半衰期。YTE 突變子包含三個“YTE 突變子”的組合：M252Y、S254T 和 T256E，殘基編號是根據 EU 編號系統，其也被稱為 EU 索引，如在 Kabat 等 (參考美國專利第 7,658,921 號所述)對 IgG 重鏈進行編號。相較於野生型抗體，YTE 突變抗體大大延長了抗體在血清中的半衰期，如 e.g., Dall' Acqua et al, J. Biol. Chem. 281: 23514-24 (2006)和美國專利第 7,083,784 號。

現有技術中熟知生產和純化抗體和抗原結合片段的

方法，如冷泉港的抗體實驗技術指南，5-8章和15章。例如，老鼠可以用人 PCSK9 或其片段免疫，所得到的抗體能被覆性、純化，並且可以用一般的方法進行胺基酸測序。抗原結合片段同樣可以用一般方法製備。發明所述的抗體或抗原結合片段用基因工程方法在非人源的 CDR 區加上一個或多個人源 FR 區。人 FR 種系序列可以藉由比對 IMGT 人類抗體可變區種系基因資料庫和 MOE 軟體，從 ImMunoGeneTics(IMGT)的網站 <http://imgt.cines.fr> 得到，或者從免疫球蛋白雜誌，2001 ISBN 012441351 上獲得。

本發明工程化的抗體或抗原結合片段可用一般方法製備和純化。比如，編碼重鏈 (SEQ ID NO: 28) 和輕鏈 (SEQ ID NO: 30) 的 cDNA 序列，可以選殖並重組至 GS 表達載體。重組的免疫球蛋白表達載體可以穩定地轉染 CHO 細胞。作為一種更推薦的現有技術，哺乳動物類表達系統會導致抗體的糖基化，特別是在 Fc 區的高度保守 N 端位點。藉由表達與人 PCSK9 特異性結合的抗體得到穩定的選殖株。陽性的選殖株在生物反應器的無血清培養基中擴大培養以生產抗體。分泌了抗體的培養液可以用一般技術純化。比如，用含調整過的緩衝液的 A 或 G Sepharose FF 柱進行純化。洗去非特異性結合的組分。再用 PH 梯度法沖提結合的抗體，用 SDS-PAGE 檢測抗體片段，收集。抗體可用一般方法進行過濾濃縮。可溶的混合物和多聚體，也可以用一般方法去除，比如分子篩、離子交換。得到的產物需立即冷凍，如 -70°C ，或者凍乾。

“給予”和“處理”當應用於動物、人、實驗受試者、細胞、組織、器官或生物流體時，是指外源性藥物、治療劑、診斷劑或組合物與動物、人、受試者、細胞、組織、器官或生物流體的接觸。“給予”和“處理”可以指例如治療、藥物代謝動力學、診斷、研究和實驗方法。細胞的處理包括試劑與細胞的接觸，以及試劑與流體的接觸，其中該流體與細胞接觸。“給予”和“處理”還意指藉由試劑、診斷、結合組合物或藉由另一種細胞體外和離體處理例如細胞。“處理”當應用於人、獸醫學或研究受試者時，是指治療處理、預防或預防性措施，研究和診斷應用。

“治療”意指給予患者內用或外用治療劑，例如包含本發明的任一種結合化合物的組合物，該患者具有一種或多種疾病症狀，而已知所述治療劑對這些症狀具有治療作用。通常，在受治療患者或群體中以有效緩解一種或多種疾病症狀的量給予治療劑，以誘導這類症狀退化或抑制這類症狀發展到任何臨床可測量的程度。有效緩解任何具體疾病症狀的治療劑的量（也稱作“治療有效量”）可根據多種因素變化，例如患者的疾病狀態、年齡和體重，以及藥物在患者產生需要療效的能力。藉由醫生或其它專業衛生保健人士通常用於評價該症狀的嚴重性或進展狀況的任何臨床檢測方法，可評價疾病症狀是否已被減輕。儘管本發明的實施方案（例如治療方法或製品）在緩解每個目標疾病症狀方面可能無效，但是根據本領域已知的任何統計

學檢驗方法如 Student t 檢驗、卡方檢驗、依據 Mann 和 Whitney 的 U 檢驗、Kruskal-Wallis 檢驗 (H 檢驗)、Jonckheere-Terpstra 核對總和 Wilcoxon 檢驗確定，其在統計學顯著數目的患者中應當減輕目標疾病症狀。

“保守修飾”或“保守置換或取代”是指具有類似特徵（例如電荷、側鏈大小、疏水性/親水性、主鏈構象和剛性等）的其它胺基酸置換蛋白中的胺基酸，使得可頻繁進行改變而不改變蛋白的生物學活性。本領域技術人員知曉，一般而言，多肽的非必需區域中的單個胺基酸置換基本上不改變生物學活性（參見例如 Watson 等（1987）Molecular Biology of the Gene, The Benjamin/Cummings Pub.Co., 第 224 頁，（第 4 版））。另外，結構或功能類似的胺基酸的置換不大可能破壞生物學活性。

“有效量”包含足以改善或預防醫學疾病的症狀或病症的量。有效量還意指足以允許或促進診斷的量。用於特定患者或獸醫學受試者的有效量可依據以下因素而變化：例如，待治療的病症、患者的總體健康情況、給藥的方法途徑和劑量以及副作用嚴重性。有效量可以是避免顯著副作用或毒性作用的最大劑量或給藥方案。

“外源性”指根據情況在生物、細胞或人體外產生的物質。“內源性”指根據情況在細胞、生物或人體內產生的物質。

“同源性”是指兩個多核苷酸序列之間或兩個多肽之間的序列相似性。當兩個比較序列中的位置均被相同鹼

基或胺基酸單體亞基佔據時，例如如果兩個 DNA 分子的每一個位置都被腺嘌呤佔據時，那麼該分子在該位置是同源的。兩個序列之間的同源性百分率是兩個序列共有的匹配或同源位置數除以比較的位置數 $\times 100$ 的函數。例如，在序列最佳比對時，如果兩個序列中的 10 個位置有 6 個匹配或同源，那麼兩個序列為 60%同源。一般而言，當比對兩個序列而得到最大的同源性百分率時進行比較。

本文使用的表述“細胞”、“細胞株”和“細胞培養物”可互換使用，並且所有這類名稱都包括後代。因此，單詞“轉化體”和“轉化細胞”包括原代受試細胞和由其衍生的培養物，而不考慮轉移數目。還應當理解的是，由於故意或非有意的突變，所有後代在 DNA 含量方面不可能精確相同。包括具有與最初轉化細胞中篩選的相同的功能或生物學活性的突變後代。在意指不同名稱的情況下，其由上下文清楚可見。

本文使用的“聚合酶鏈式反應”或“PCR”是指其中微量的特定部分的核酸、RNA 和/或 DNA 如在例如美國專利第 4,683,195 號中所述擴增的程式或技術。一般來說，需要獲得來自目標地區域末端或之外的序列資訊，使得可以設計寡核苷酸引子；這些引子在序列方面與待擴增範本的對應鏈相同或相似。2 個引子的 5' 末端核苷酸可以與待擴增材料的末端一致。PCR 可用於擴增特定的 RNA 序列、來自總基因組 DNA 的特定 DNA 序列和由總細胞 RNA 轉錄的 cDNA、噬菌體或質體序列等。一般參見 Mullis 等(1987) Cold

Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:263; Erlich 編輯，(1989) PCR TECHNOLOGY (Stockton Press, N.Y.)。本文使用的 PCR 被視為用於擴增核酸測試樣品的核酸聚合酶反應法的一個實例，但不是唯一的實例，所述方法包括使用作為引子的已知核酸和核酸聚合酶，以擴增或產生核酸的特定部分。

“視需要”或“視需要地”意味著隨後所描述地事件或環境可以但不必發生，該說明包括該事件或環境發生或不發生的場合。例如，“視需要包含 1-3 個抗體重鏈可變區”意味著特定序列的抗體重鏈可變區可以但不必須存在。

“醫藥組成物”表示含有一種或多種本文所述化合物或其生理學上/可藥用的鹽或前體藥物與其他化學組分的混合物，所述其他組分例如生理學/可藥用的載體和賦形劑。醫藥組成物的目標是促進對生物體的給藥，利於活性成分的吸收進而發揮生物活性。

實施例與測試例

以下結合實施例進一步描述本發明，但這些實施例並非限制著本發明的範圍。本發明實施例中未注明具體條件的實驗方法，通常按照一般條件，如冷泉港的抗體技術實驗手冊，分子選殖手冊；或按照原料或商品製造廠商所建議的條件。未注明具體來源的試劑，為市場購買的一般試劑。

實施例 1、 PCSK9 抗原及檢測用蛋白的製備

蛋白設計及表達

以 UniProt Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (人 PCSK9, Uniprot 號 : Q8MBP7) 作為本發明 PCSK9 的範本，設計本發明涉及的抗原及檢測用蛋白的胺基酸序列，可選的在 PCSK9 蛋白基礎上融合不同的標籤如 his 標籤或促進免疫的肽段如 PADRE 肽，分別選殖到 pTT5 載體上 (Biovector, Cat#: 102762) 或 pTarget 載體上 (promega, A1410)，在 293 細胞瞬轉表達或 CHO-S 穩定表達，純化，獲得編碼本發明抗原及檢測用蛋白。

帶 His 標籤的 PCSK9 : PCSK9-His6，用於免疫原免疫小鼠或檢測試劑

MGTVSSRRSWPLPLLLLLLLLLLGPAGARAQEDEDGDYEEL
 VLALRSEEDGLAEAPEHGTTATFHRC AKDPWRLPGTYVVVL
 KEETHLSQSERTARRLQAQAARRGYLTKILHVFHGLLPGLV
 KMSGDLLELALKLPHVDYIEEDSSVFAQSIPWNLERITPPRYR
 ADEYQPPDGGSLVEVYLLDTSIQSDHREIEGRVMVTD FENVP
 EEDGTRFHRQASKCDSHGTHLAGVVSGRDAGVAKGASMRSL
 RVLNCQGKGTVSGTLIGLEFIRKSQLVQPVGPLVVLLPLAGG
 YSRVLNAACQRLARAGVVLVTAAGNFRDDACLYSPASAPEV
 ITVGATNAQDQPVT LGTLGTNFGRCVDL FAPGEDIIGASSDCS
 TCFVSQSGTSQAAAHVAGIAAMMLSAEPELTLAELRQRLIHF
 SAKDVINEAWFPEDQRVLTPNLVAALPPSTHGAGWQLFCRT
 VWSAHS GPTRMATAVARCAPDEELLSCSSFSRSGKRRGERM

EAQGGKLCRAHNAFGGEGVYAIARCCLLPQANCSVHTAPP
 AEASMGTRVHCHQQGHVLTGCSHWEVEDLGTHKPPVLRPR
 GQPNQCVGHREASIHASCCHAPGLECKVKEHGIPAPQEQVTV
 ACEEGWTLTGCSALPGTSHVLGAYAVDNTCVVRSRDVSTTG
 STSEGAVTAVAICCRSRHLAQASQELQHHHHHH

SEQ ID NO : 1

注釋： 劃橫線部分為信號肽，斜體部分為 His6-tag（6 組
 胺酸標籤）。

帶 PADRE 肽和 His 標籤的 PCSK9：PCSK9-PADRE-His6，
 作為免疫原，所含 PADRE 肽可以促進免疫；

MGTVSSRRSWPLPLLLLLLLLLLGPAGARAQEDDGDYEEL
 VLALRSEEDGLAEAPEHGTTATFHRCADPWRLPGTYVVVL
 KEETHLSQSERTARRLQAQAARRGYLTKILHVFHGLLPGLV
 KMSGDLLELALKLPHVDYIEEDSSVFAQSIPWNLERITPPRYR
 ADEYQPPDGGSLVEVYLLDTSIQSDHREIEGRVMVTDENVP
 EEDGTRFHRQASKCDSHGTHLAGVVSGRDAGVAKGASMRSL
 RVLNCQGKGTVSGTLIGLEFIRKSQLVQPVGPLVLLPLAGG
 YSRVLNAACQRLARAGVVLVTAAGNFRDDACLYSPASAPEV
 ITVGATNAQDQPVTLGTLGTNFGRCVDLFAPGEDIIGASSDCS
 TCFVSQSGTSQAAAHVAGIAAMMLSAEPELTLAELRQRLIHF
 SAKDVINEAWFPEDQRVLTPNLVAALPPSTHGAGWQLFCRT
 VWSAHS GPTRMATAVARCAPDEELLSCSSFSRSGKRRGERM
 EAQGGKLCRAHNAFGGEGVYAIARCCLLPQANCSVHTAPP

AEASMGTRVHCHQQGHVLTGCSHWEVEDLGTHKPPVLRPR
 GQPNQCVGHREASIHASCCHAPGLECKVKEHGIPAPQEQVTV
 ACEEGWTLTGCSALPGTSHVLGAYAVDNTCVVRSRDVSTTG
 STSEGAVTAVAICCRSRHLAQASQELQGSGAKFVAAWTLKA
AAHHHHH

SEQ ID NO : 2

注釋： 劃橫線部分為信號肽，雙劃線部分為 linker，點劃線部分為 PADRE 肽，斜體部分為 His6-tag。

帶 TEV 酶切位點的 PCSK9 與 his 標籤融合蛋白：

PCSK9-TEV-His6，可藉由 TEV 酶切獲得 N-PCSK9（N 端 pCSK9 結構域），作為免疫原；

MGTVSSRRSWPLPLLLLLLLLLLGPAGARAQEDEDGDYEEL
 VLALRSEEDGLAEAPEHGTTATFHRCADPWRLPGTYVVVL
 KEETHLSQSERTARRLQAQAARRGYLTKILHVFHGLLPGLV
 KMSGDLLELALKLPHVDYIEEDSSVFAQSIPWNLERITPPRYR
 ADEYQPPDGGSLVEVYLLDTSIQSDHREIEGRVMVTD FENVP
 EEDGTRFHRQASKCDSHGTHLAGVVSGRDAGVAKGASMRS
 RVLNCQGKGTVSGTLIGLEFIRKSQLVQPVGPLVLLPLAGG
 YSRVLNAACQRLARAGVVLVTAAGNFRDDACLYSPASAPEV
 ITVGATNAQDQPVTLGTLGTNFGRCVDLFAPGEDIIGASSDCS
 TCFVSQSGTSQAAAHVAGIAAMMLSAEPELTLAELRQRLIHF
 SAKDVINEAWFPEDQRVLT PNLVAALPPSTHENLYFQGAGW

QLFCRTVWSAHS GPTRMATAVARCAPDEELLSCSSFSRSGKR
 RGERMEAQGGKLV CRAHNAFGGEGVYAIARCCLLPQANCSV
 HTAPPAEASMGTRVHCHQQGHVLTGCSHWEVEDLGTHKPP
 VLRPRGQPNQCVGHREASIHASCCHAPGLECKVKEHGIPAPQ
 EQVTVACEEGWTLTGCSALPGTSHVLGAYAVDNTCVVRSRD
 VSTTGSTSEGAVTAVAICCRSRHLAQASQELQ*HHHHHH*

SEQ ID NO : 3

注釋： 劃橫線部分為信號肽，雙劃線部分為 TEV 酶切位點，斜體部分為 His6-tag。

PCSK9-D374Y 突變蛋白，帶 his 標籤：PCSK9-D374Y-His6，作為檢測試劑；

MGTVSSRRSWPLPLLLLLLLLLLGPAGARAQEDEDGDYEEL
 VLALRSEEDGLAEAPEHGTTATFHRC AKDPWRLPGTYVVVL
 KEETHLSQSERTARRLQAQAARRGYLTKILHVFHGLLPGLV
 KMSGDLLELALKLPHVDYIEEDSSVFAQSIPWNLERITPPRYR
 ADEYQPPDGGSLVEVYLLDTSIQSDHREIEGRVMVTD FENVP
 EEDGTRFHRQASKCDSHGTHLAGVVSGRDAGVAKGASMRSL
 RVLNCQGKGTVSGTLIGLEFIRKSQLVQPVGPLVLLPLAGG
 YSRVLNAACQRLARAGVVLVTAAGNFRDDACL YSPASAPEV
 ITVGATNAQDQPVT LGTLGTNFGRCVDL FAPGEDIIGASSYCS
 TCFVSQSGTSQAAAHVAGIAAMMLSAEPELTLAELRQR LIHF
 SAKDVINEAWFPEDQRVLT PNLVAALPPSTHGAGWQLFCRT
 VWSAHS GPTRMATAVARCAPDEELLSCSSFSRSGKRRGERM

EAQGGKLVCRAHNAFGGEGVYAIARCCLLPQANCSVHTAPP
 AEASMGTRVHCHQQGHVLTGCSHWEDLGTHKPPVLRPR
 GQPNQCVGHREASIHASCCHAPGLECKVKEHGIPAPQEQVTV
 ACEEGWTLTGCSALPGTSHVLGAYAVDNTCVVRSRDVSTTG
 STSEGAVTAVAICCRSRHLAQASQELQHHHHHH

SEQ ID NO : 4

注釋： 劃橫線部分為信號肽，斜體部分為 His6-tag。

PCSK9: 插入生物素接受肽 BP15 及 his 標籤的 PCSK9 蛋白：
 PCSK9-BP15-His6，作為檢測試劑，BP15 肽位置在表達過
 程中能夠進行生物素標記，免除體外生物素標記及可能導
 致的構象變化；

MGTVSSRRSWPLPLLLLLLLLLLGPAGARAQEDDGDYEEL
 VLALRSEEDGLAEAPEHGTTATFHRCADPWRLPGTYVVVL
 KEETHLSQSERTARRLQAQAARRGYLTKILHVFHGLLPGLV
 KMSGDLLELALKLPHVDYIEEDSSVFAQSIPWNLERITPPRYR
 ADEYQPPDGGSLVEVYLLDTSIQSDHREIEGRVMVTDNFENVP
 EEDGTRFHRQASKCDSHGTHLAGVVSGRDAGVAKGASMRSL
 RVLNCQGKGTVSGTLIGLEFIRKSQLVQPVGPLVVLLPLAGG
 YSRVLNAACQRLARAGVVLVTAAGNFRDDACLSPASAPEV
 ITVGATNAQDQPVTLGTLGTNFGRCVDLFPAGEDIIIGASSDCS
 TCFVSQSGTSQAAAHVAGIAAMMLSAEPELTLAELRQRLIHF
 SAKDVINEAWFPEDQRVLTPLNVAALPPSTHGAGWQLFCRT
 VWSAHS GPTRMATAVARCAPDEELLSCSSFSRSGKRRGERM

EAQGGKLCRAHNAFGGEGVYAIARCCLLPQANCSVHTAPP
 AEASMGTRVHCHQQGHVLTGCSHWEDLGTHKPPVLRPR
 GQPNQCVGHREASIHASCCHAPGLECKVKEHGIPAPQEQVTV
 ACEEGWTLTGCSALPGTSHVLGAYAVDNTCVVRSRDVSTTG
 STSEGAVTAVAICCRSRHLAQASQELQGSTSGSGLNDIFEAQ
KIEWHEHHHHHH

SEQ ID NO : 5

注釋： 劃橫線部分為信號肽，雙劃線部分為生物素接受
 肽，斜體部分為 His6-tag。

PCSK9-Y：插入生物素接受肽及 his 標籤的 PCSK9 D374Y
 突變體蛋白：PCSK9-D374Y-BP15-His6，檢測蛋白；

MGTVSSRRSWPLPLLLLLLLLLLGPAGARAQEDDEDGDYEEL
 VLALRSEEDGLAEAPEHGTTATFHRCADPWRLPGTYVVVL
 KEETHLSQSERTARRLQAQAARRGYLTKILHVFHGLLPGLV
 KMSGDLLELALKLPHVDYIEEDSSVFAQSIPWNLERITPPRYR
 ADEYQPPDGGSLVEVYLLDTSIQSDHREIEGRVMVTD FENVP
 EEDGTRFHRQASKCDSHGTHLAGVVSGRDAGVAKGASMRSL
 RVLNCQGKGTVSGTLIGLEFIRKSQLVQPVGPLVVLLPLAGG
 YSRVLNAACQRLARAGVVLVTAAGNFRDDACLYSPASAPEV
 ITVGATNAQDQPVTLGTLGTNFGRCVDL FAPGEDIIGASSYCS
 TCFVSQSGTSQAAAHVAGIAAMMLSAEPELTLAELRQRLIHF
 SAKDVINEAWFPEDQRVLT PNLVAALPPSTHGAGWQLFCRT
 VWSAHS GPTRMATAVARCAPDEELLSCSSFSRSGKRRGERM

EAQGGKLVCRAHNAFGGEGVYAIARCCLLPQANCSVHTAPP
 AEASMGTRVHCHQQGHVLTGCSHWEDLGTHKPPVLRPR
 GQPNQCVGHREASIHASCCHAPGLECKVKEHGIPAPQEQVTV
 ACEEGWTLTGCSALPGTSHVLGAYAVDNTCVVRSRDVSTTG
 STSEGAVTAVAICCRSRHLAQASQELQGSTSGSGLNDIFEAO
KIEWHEHHHHHH

SEQ ID NO : 6

注釋： 劃橫線部分為信號肽，雙劃線部分為生物素接受
 肽，斜體部分為 His6-tag。

帶 Flag 標籤和 His 標籤的 pCSK9 受體蛋白 LDLR 胞外域片
 段：LDLR-ECD-Flag-His6，檢測試劑

MGPWGWKLRWTVALLAAAGTAVGDRCERNEFQCQDGKCI
 SYKWVCDGSAECQDGSDESQETCLSVTCKSGDFSCGGRVNR
 CIPQFWRCDGQVDCDNGSDEQGCPPKTCSQDEFRCHDGKCI
 RQFVCDSDRDCLDGSDEASCPVLTCGPASFQCNSSTCIPQLW
 ACDNDPDCEDGSDEWPQRCRGLYVFQGDSSPCSAFEFHCLSG
 ECIHSSWRCDGGPDCKDKSDEENCAVATCRPDEFQCSDGNCI
 HGSRQCDREYDCKDMSDEVGCVNVTLCGPNKFKCHSGECI
 TLDKVCNMARDCRDWSDEPIKECGTNECLDNNGGCASHVCND
 LKIGYECLCPDGFQLVAQRRCEDIDECQDPDTCSQLCVNLEG
 GYKCQCEEGFQLDPHTKACKAVGSIAYLFFTNRHEVRKMTL
 DRSEYTSLIPNLRNVVALDTEVASNRIYWSDLRQRMICSTQL
 DRAHGVSSYDTVISRDIQAPDGLAVDWIHSNIYWTDSVLGTV

SVADTKGVKRKTLFRENGSKPRAIVVDPVHGFMYWTDWGTP
 AKIKKGGGLNGVDIYSLVTENIQWPNGITLDLLSGRLYWVDSK
 LHSISSIDVNGGNRKTILEDEKRLAHPFSLAVFEDKVFWDII
 NEAIFSANRLTGSDVNLLAENLLSPEDMVLFHNLTPRGVNW
 CERTTLSNGGCQYLCLPAPQINPHSPKFTCACPDGMLLARDM
 RSCLTEAEAAVATQETSTVRLKVSSTAVRTQHHTTRPVPDTS
 RLPGATPGLTTVEIVTMSHQALGDVAGRGNEKKPSSVRDYK
DDDDKHHHHH

SEQ ID NO : 7

注釋：劃橫線部分為信號肽，雙劃線部分為 Flag 標籤，
 斜體部分為 His6-tag；

LDLR-Fc：縮短形式的 LDLR 胞外域片段與 hIgG1-Fc 融合
 蛋白（具有與 PCSK9 結合活性）：LDLR-sECD - Fc(hIgG1)
 作為檢測試劑

MEFGLSWLFLVAILKGVQCGTNECLDNNGGCSHVCNDLKIG
YECLCPDGFQLVAQRRCEDIDECQDPDTCSQLCVNLEGGYKC
QCEEGFQLDPHTKACK*EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL*
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO : 8

注釋： 劃橫線部分為信號肽，雙劃線部分為縮短形式的具有與 PCSK9 結合活性的 LDLR 胞外域片段 (LDLR-sECD)，斜體部分為 hIgG1-Fc 部分；

更加縮短形式的 LDLR 胞外域片段與 hIgG1-Fc 融合蛋白 (具有與 pCSK9 結合活性)：LDLR-ssECD - Fc (hIgG1) 作為檢測試劑

MEFGLSWLFLVAILKGVQCGTNECLDNNGGCSHVCNDLKIG
YECLCPDGFQLVAQRRCEDIDEPKSSDKTHTCPPCPAPPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
GK

SEQ ID NO : 9

注釋： 劃橫線部分為信號肽，雙劃線部分為更加縮短形式的具有與 PCSK9 結合活性的 LDLR 胞外域片段 (LDLR-ssECD)，斜體部分為 hIgG1-Fc 部分。

實施例 2、PCSK9、LDLR 相關重組蛋白的純化重組蛋白以及雜交瘤抗體、重組抗體的純化

1、帶 His 標籤的重組蛋白的純化步驟：

將細胞表達上清樣品高速離心去除雜質，並將緩衝液

換置換為 PBS，加入咪唑至終濃度為 5mM。用含有 5mM 咪唑的 PBS 溶液平衡鎳管柱，沖洗 2-5 倍管柱體積。將置換後的上清樣品上 IMAC 管柱。用含有 5mM 咪唑的 PBS 溶液沖洗管柱，至 A_{280} 讀數降至基線。後用 PBS+10mM 咪唑沖洗層析管柱，除去非特異結合的雜蛋白，並收集流出液。再用含有 300mM 咪唑的 PBS 溶液沖提目標蛋白，並收集沖提峰。收集的沖提液濃縮後用凝膠層析 Superdex200 (GE) 進一步純化，流動相為 PBS。去聚體峰，收集沖提峰。所得到的蛋白經電泳，肽圖，LC-MS 鑒定為正確後分裝備用。得到帶 His 標籤的 PCSK9-His6 (SEQ ID NO: 1)、PCSK9-PADRE-His6 (SEQ ID NO: 2)、PCSK9-TEV-His6 (SEQ ID NO: 3)、PCSK9-D374Y-His6 (SEQ ID NO: 4)、PCSK9-BP15-His6 (SEQ ID NO: 5)、PCSK9-D374Y-BP15-His6 (SEQ ID NO: 6) 用於本發明抗體的免疫原或檢測試劑。其中 PCSK9-TEV-His6 純化後藉由 TEV 酶進行酶切，酶切產物再利用 IMAC 柱結合去除 TEV 酶、未酶切完全的 PCSK9-TEV-His6 或切除的帶 His 標籤的 C 端結構域片段，IMAC 流出液中濃縮獲得僅留 N 端結構域的 PCSK9 片段(縮寫為 N-PCSK9)，作為免疫原用於小鼠免疫。

2、帶 His 標籤和 Flag 標籤的 LDLR-ECD-Flag-His6 (SEQ ID NO: 7) 重組蛋白的純化步驟：

將樣品高速離心去除雜質，並濃縮至適當體積。利用 0.5×PBS 平衡 flag 親和管柱，沖洗 2-5 倍管柱體積。將除

雜後的細胞表達上清樣品上管柱。用 0.5×PBS 沖洗柱子，至 A₂₈₀ 讀數降至基線。用含有 0.3M NaCl 的 PBS 沖洗柱子，沖洗雜蛋白，並收集。用 0.1M 乙酸(pH3.5-4.0)沖提目標蛋白，並收集，調節 pH 至中性。收集的沖提液濃縮後用凝膠層析 Superdex200(GE) 進一步純化，流動相為 PBS。去聚體峰，收集沖提峰收集樣品經電泳，肽圖，LC-MS 鑒定正確後分裝備用。得到帶 FLAG/His6 標籤的 LDLR-ECD-Flag-His6(SEQ ID NO: 7) ，用於本發明抗體的性能測試。

3、LDLR 的 Fc 融合蛋白的純化步驟：

將細胞表達上清樣品高速離心去除雜質，濃縮至適當體積後上 Protein A 管柱。用 PBS 沖洗管柱，至 A₂₈₀ 讀數降至基線。用 100mM sodium acetate pH3.0 沖提目標蛋白，用 1M Tris-HCl 中和。沖提樣品適當濃縮後利用 PBS 平衡好的凝膠層析 Superdex200 (GE) 進一步純化，去聚體的峰收集好後分裝備用。此方法用來純化 LDLR-sECD - Fc (hIgG1) (SEQ ID NO: 8) 和 LDLR-ssECD - Fc (hIgG1) (SEQ ID NO: 9)。兩者可用作 PCSK9 抗體功能性測試。

實施例 3、抗人 PCSK9 雜交瘤單株抗體的製備

1、免疫

抗人 PCSK9 單株抗體藉由免疫小鼠產生。實驗用 SJL 白小鼠，雌性，6 周齡 (北京維通利華實驗動物技術有限公司，動物生產許可證號：SCXK(京)2012-0001) 。飼養環

境：SPF 級。小鼠購進後，實驗室環境飼養 1 週，12/12 小時光/暗週期調節，溫度 20-25 °C；濕度 40-60 %。將已適應環境的小鼠按兩種方案免疫 (A/B)，每組 6-10 隻。免疫抗原為帶 His 標籤的人 PCSK9-His6 (SEQ ID NO: 1)、PCSK9-PADRE-His6 (SEQ ID NO: 2) 及 N-PCSK9 (SEQ ID NO: 3)。

方案 A 用弗氏佐劑 (sigma Lot Num: F5881/F5506) 乳化：首次免疫用弗氏完全佐劑 (CFA)，其餘加強免疫用弗氏不完全佐劑 (IFA)。抗原與佐劑比例為 1:1，100 μ g/隻 (首次免疫)，50 μ g/隻 (加強免疫)。第 0 天腹膜內 (IP) 注射 100 μ g/隻的乳化後抗原，首次免疫後每兩週一次，共 6-8 周。

方案 B 用 Titermax (sigma Lot Num: T2684) 與 Alum (Thremo Lot Num: 77161) 交叉免疫。抗原與佐劑 (titermax) 比例為 1:1，抗原與佐劑 (Alum) 比例為 3:1，10-20 μ g/隻 (首次免疫)，5 μ g/隻 (加強免疫)。第 0 天腹膜內 (IP) 注射 20 / 10 μ g/隻的乳化後抗原，首次免疫後每週一次，Titermax 和 Alum 交替使用，共 6-11 週。免疫四週後，根據背部結塊和腹部腫脹情況，選擇背部或腹膜內注射抗原。

2、細胞融合

選擇血清中抗體效價高 (見後面的測試例 1 和 2，結合 PCSK9 的 ELISA 方法) 並且效價趨於平臺的小鼠進行脾細胞融合，融合前 72 小時衝刺免疫所選小鼠，PCSK9-His6 10 μ g/隻，腹腔注射。採用優化的 PEG 介導的融合步驟將

脾淋巴細胞與骨髓瘤細胞 Sp2/0 細胞(ATCC® CRL-8287™) 進行融合得到雜交瘤細胞。融合好的雜交瘤細胞用 HAT 完全培養基 (含 20%FBS、1×HAT 和 1×OPI 的 RPMI-1640 培養基)重懸，分裝於 96 孔細胞培養板中 ($1 \times 10^5/150 \mu\text{l}$ /孔)， 37°C ，5% CO_2 孵育。融合後的第 5 天加入 HAT 完全培養基， $50 \mu\text{l}$ /孔， 37°C ，5% CO_2 孵育。融合後第 7 天~8 天，根據細胞生長密度，全換液，培養基為 HT 完全培養基 (含 20%FBS、1×HT 和 1×OPI 的 RPMI-1640 培養基)， $200 \mu\text{l}$ /孔， 37°C ，5% CO_2 孵育。

3、雜交瘤細胞篩選

融合後第 10-11 天，根據細胞生長密度，進行結合 PCSK9 或 PCSK9-Y 的 ELISA 方法檢測(見測試例 1 和 2)。並將結合 ELISA 檢測的陽性孔細胞進行 PCSK9 或 PCSK9-Y 與 LDLR 結合的阻斷 ELISA 檢測(見測試例 3 和 4)，陽性孔換液，並根據細胞密度及時擴大至 24 孔板中。移入 24 孔板的細胞株經過複測後進行保種和第一次次選殖。第一次次選殖篩選(見測試例 1 和 2)為陽性的進行保種，並進行第二次次選殖。第二次次選殖為陽性(見測試例 1 和 2)的進行保種和蛋白表達。多次融合獲得有阻斷 PCSK9 或 PCSK9-Y 與 LDLR 結合效果(見測試例 3 和 4)的雜交瘤細胞。

藉由阻斷實驗和結合實驗篩選得到雜交瘤選植株

mAb-001，用無血清細胞培養法進一步製備抗體，按純化實例純化抗體，供在檢測例中使用。

其中測得雜交瘤選殖株 mAb-001 的鼠抗可變區序列如下：

> mAb-001 VH

QVHLQQSGAELAKPGASVKLSCKASGYTFNDYWMH *WVKER*
PGQGLEWIGYINPSSGFTKYHQNFKD *KATLTADKSSSTAYMQ*
LSSLTYDDSAVYYCARQYDYDEDWYFDV *WGTGTTVTVSS*

SEQ ID NO : 10

> mAb-001VL

DIVMSQSPSSLA *VSA GEKVTMSCKSSQSLLNSRTRKNFLA* *WY*
QQKPGQSPKLLIYWASTRES *GVPDRFTGRGSGTDFTLTIS* *SVQ*
AEDLA *VYYCKQSFNLF* *FGSGTKLEIK*

SEQ ID NO : 11

注：順序為 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4，序列中斜體為 FR 序列，底線為 CDR 序列。

表 1 各重鏈及輕鏈 CDR 區序列

	重鏈		輕鏈	
mAb-001	HCDR1	DYWMH SEQ ID NO : 12	LCDR1	KSSQSLLSRTRKNFLA SEQ ID NO : 15
	HCDR2	YINPSSGFTKYHQNFKD SEQ ID NO : 13	LCDR2	WASTRES SEQ ID NO : 16
	HCDR3	QYDYDEDWYFDV SEQ ID NO : 14	LCDR3	KQSFNLFT SEQ ID NO : 17

實施例 4、抗人 PCSK9 雜交瘤單株抗體的人源化

1、雜交瘤選殖株 mAb-001 人源化框架選擇

藉由比對 IMGT 人類抗體重輕鏈可變區種系基因資料庫和 MOE 軟體，分別挑選與 mAb-001 同源性高的重輕鏈可變區種系基因作為範本，將這兩個鼠源抗體的 CDR 分別移植到相應的人源範本中，形成次序為 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 的可變區序列。其中胺基酸殘基由 Kabat 編號系統確定並注釋。

鼠源抗體 mAb-001 的人源化輕鏈範本為 IGKV1-39*01 和 hjk2.1，人源化重鏈範本為 IGHV1-2*02 和 hjh2，人源化後得到人源化抗體 h001-1 的可變區序列如下：

> h001-1 VH

*QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYWMHWVRQA
PGQGLEWMGYINPSSGFTKYHQNFKDRVTMTRDTSISTA YM
ELSRLRSDDTA VYYCARQYDYDEDWYFDV WGQGTTVTVSS*

SEQ ID NO : 18

> h001-1 VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLLSRTRKNFLAWY
*QKPGKAPKLLIYWASTRES**GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ*
*PEDFATYYCKQSFNLF**FGQGTKLEIK*

SEQ ID NO : 24

注：順序為 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4，序列中斜體為 FR 序列，底線為 CDR 序列。

2、雜交瘤選殖株 mAb-001 的範本選擇和回復突變設計，見下表 2；雜交瘤選殖株回復突變後的人源化序列組合見表 4。

表 2. 雜交瘤選殖株回復突變設計

VH		SEQ ID NO	VL		SEQ ID NO
h001_VH.1	Graft	18	h001_VL.1	Graft	24
h001_VH.1A	T30N	19	h001_VL.1A	S66D	25
h001_VH.1B	R87T	20	h001_VL.1B	T5S, S66D	26
h001_VH.1C	T30N, R87T	21	h001_VL.1C	T5S, S66D, Q3V, A49S	27
h001_VH.1D	T30N, R87T, R72A, T74K	22			
h001_VH.1E	T30N, R87T, R72A, T74K, M48I, V68A, M70L, R38K, R67K	23			

注：如 S66D 表示依照 Kabat 編號系統，將 66 位元 S 突變回 D。

Grafted 代表鼠抗體 CDR 植入人種系 FR 區序列，各突變可變區具體序列如下表 3：

表 3

SEQ ID NO	序列
19	<p><i>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFNDYWMH WVRQAPG</i> <i>QGLEWMGYINPSSGFTKYHQNFKDR VTMTRDTSISTA YMELSRL</i> <i>RSDDTA VYYCARQYDYDEDWYFDV WGQGTTVTVSS</i></p>
20	<p><i>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYWMH WVRQAPG</i> <i>QGLEWMGYINPSSGFTKYHQNFKDR VTMTRDTSISTA YMELSRL</i> <i>TSDDTA VYYCARQYDYDEDWYFDV WGQGTTVTVSS</i></p>
21	<p><i>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFNDYWMH WVRQAPG</i> <i>QGLEWMGYINPSSGFTKYHQNFKDR VTMTRDTSISTA YMELSRL</i> <i>TSDDTA VYYCARQYDYDEDWYFDV WGQGTTVTVSS</i></p>
22	<p><i>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFNDYWMH WVRQAPG</i> <i>QGLEWMGYINPSSGFTKYHQNFKDR VTMTADKSISTA YMELSRL</i> <i>TSDDTA VYYCARQYDYDEDWYFDV WGQGTTVTVSS</i></p>
23	<p><i>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFNDYWMH WVKQAPG</i> <i>QGLEWIGYINPSSGFTKYHQNFKDKATLTADKSISTA YMELSRLT</i> <i>SDDTA VYYCARQYDYDEDWYFDV WGQGTTVTVSS</i></p>
25	<p><i>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLLSRTRKNFLAWYQQK</i> <i>PGKAPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAT</i> <i>YYCKQSFNLFYFGQGTKLEIK</i></p>
26	<p><i>DIQMSQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLLSRTRKNFLAWYQQK</i> <i>PGKAPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAT</i></p>

	<i>YYCKQSFNLFT<u>FGQG</u>TKLEIK</i>
27	<i>DIVMSQSPSSLSA<u>SVGDRVTITCKSSQ</u>SLLSNRTRKNFLAWYQQK PGKSPKLLIY<u>WASTRESGVPDRFSGSGSGTDF</u>TLTISSLQPEDFAT YYCKQSFNLFT<u>FGQG</u>TKLEIK</i>

注：序列中橫線部分為 CDR 區。

表 4：鼠抗 mAb-001 人源化序列組合

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

注：該表表示各種序列及其突變序列組合所得的人源化抗體可變區部分的組合。如 h001-1 表示，人源化抗體 h001-1 的可變區由輕鏈 h001_VL1、重鏈 h001_VH.1A 組成。其它類推。

3、將以上的人源化序列組合進行抗體化，重鏈恒定區來自人 IgG1，輕鏈恒定區來自人 kappa 鏈。得到相應的人源化抗體，進行結合 pCSK9 的 ELISA 方法檢測（見測試例 1），和結合 pCSK9-Y 的 ELISA 方法檢測（見測試例 2）；並將結合 ELISA 檢測的陽性孔細胞進行 pCSK9/LDLR 結合的阻斷 ELISA 檢測（見測試例 4），和進行 pCSK9-Y/LDLR 結

合的阻斷 ELISA 檢測（見測試例 3）；結果見表 5-8。

結果顯示，本發明得到的 PCSK9 抗體與 PCSK9 和 PCSK9-Y 有較高的結合活性；並且能有效阻斷 PCSK9/PCSK9-Y 與 LDLR 之間的結合。

實施例 5、構建和表達抗人 PCSK9 人源化抗體 IgG1 及 IgG1-YTE 形式

本發明構建和表達抗人 PCSK9 人源化抗體的方法如下：

1、引子設計：利用線上軟體 DNABWorks (v3.2.2) (<http://helixweb.nih.gov/dnaworks/>) 設計多條引子合成 VH/VK 含重組所需基因片段：5' -30bp Signal peptide + VH/VK + 30bp CH1/CL-3'。引子設計原則：目標基因 2 與目標基因 1 有 2 個 aa 不一樣，則另設突變位點所在引子，如第 1 圖所示。

2、片段拼接：按照 TaKaRa 公司 Primer STAR GXL DNA 聚合酶操作說明書，用上面設計的多條引子，分兩步 PCR 擴增得到 VH/VK 含重組所需基因片段。

3、表達載體 pHr(帶信號肽及恒定區基因(CH1-FC/CL)片段)構建及酶切

利用一些特殊的限制性內切酶，如 BsmBI，識別序列與酶切位點不同的特性設計構建表達載體 pHr(帶信號肽及恒定區基因(CH1-FC/CL)片段)，如第 2 圖所示。BsmBI 酶切載體，切膠回收備用。

4、重組構建表達載體 VH- CH1-FC -pHr/VK-CL-pHr

VH/VK 含重組所需基因片段與 BsmBI 酶切回收表達載體 pHr(帶信號肽及恒定區基因(CH1-FC/CL)片段)按 3:1 比例分別加入 DH5 α 受容細胞中，0 °C 冰浴 30min，42 °C 熱擊 90 秒，加入 5 倍體積 LB medium，37 °C 孵育 45min，塗布 LB-Amp 平板，37 °C 培養過夜，挑取單株送測序得到各目標選殖株。

本發明的抗體可以，但不限於以上設計構建方式。以 h001-4 為例進行抗體及其突變體設計，得到 ① h001-4-WT：h001-4 的 IgG1 形式，即人源化序列組合 h001-4，結合來自人 IgG1 的重鏈恒定區，與來自人 kappa 鏈的輕鏈恒定區；② h001-4-YTE：h001-4-IgG1-YTE 形式，即人源化序列組合 h001-4，結合突變的人 IgG1 (YTE 突變) 的重鏈恒定區，與來自人 kappa 鏈的輕鏈恒定區。突變的人 IgG1 也可以是別種形式的突變。得到的抗體及突變的抗體用 BIAcore 檢測其親和力(測試例 6)，結果見表 9。

本發明構建和表達抗人 PCSK9 人源化抗體 (IgG1 及 IgG1-YTE 形式) 序列如下：

h001-4 IgG1 形式，重鏈恒定區來自人 IgG1，輕鏈恒定區來自人 kappa 輕鏈：

重鏈胺基酸序列 (人 IgG1)：

QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTDYWMHWVRQA
PGQGLEWMGYINPSSGFTKYHQNFKDRVTMTRDTSISTAYM

ELSRLRSDDTAVYYCARQYDYDEDWYFDVWGQGTTVTVSS
 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
 SGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV
 NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP
 KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
 AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
 LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK
 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
 DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO : 28

重鏈 DNA 序列 :

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTTCTTGTCGCGATTCT
TAAGGGTGTCCAGTGCCAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGC
 GCTGAGGTGAAGAAGCCCGGAGCGAGCGTAAAGGTGAGCT
 GCAAGGCCAGCGGATACACCTTCACCGACTACTGGATGCA
 CTGGGTGAGGCAGGCCCCAGGACAGGGCCTGGAGTGGATG
 GGCTACATCAACCCAGCAGCGGCTTTACCAAGTATCACCA
 GAACTTCAAAGACAGGGTGACCATGACCAGGGACACCAGC
 ATCAGCACCGCCTACATGGAGCTGAGCAGGCTGAGGAGCG
 ACGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGCAATACGACTA
 CGACGAGGACTGGTACTTCGACGTGTGGGGCCAAGGAACC
 ACCGTGACTGTGAGCAGCGCTTCGACCAAGGGCCCATCGG
 TCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGC
 ACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGA

ACCGGTGACGGTGTCGTGGA ACTCAGGCGCCCTGACCAGC
GGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACT
CTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCT
TGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCC
CAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCT
TGTGACAAA ACTCACACATGCCACCGTGCCCAGCACCTG
AACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAA
CCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAC
ATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTC
AAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATG
CCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTA
CCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGC
TGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGC
CCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAA
GGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCAT
CCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTG
CCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGT
GGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACA ACTACAAGACCAC
GCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACA
GCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAA
CGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACC
ACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

SEQ ID NO : 29

h001-4-kappa

輕鏈胺基酸序列：

DIVMSQSPSSLSASVGDRVITITCKSSQSLLNSRTRKNFLAWYQ
QKPGKSPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQP
EDFATYYCKQSFNLFTFGQGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK
SFNRGEC

SEQ ID NO : 30

輕鏈 DNA 序列：

ATGGACATGCGCGTGCCCGCCAGCTGCTGGGCCTGCTGCT
GCTGTGGTTCCCCGGCTCGCGATGCGACATCGTGATGTCTC
AGAGCCCATCTAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGGGT
AACCATCACCTGCAAGAGCAGCCAAAGCCTGCTGAACAGC
AGGACCCGCAAGA AACTTCCTGGCTTGGTATCAGCAGAAGC
CCGGCAAGTCTCCCAAGTTGCTGATCTACTGGGCCAGCACC
AGGGAGAGCGGCGTGCCCGACAGGTTTCAGCGGCTCCGGCA
GCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCTCTAGTCTGCAGCCC
GAGGACTTCGCCACCTACTACTGCAAGCAGAGCTTCAATCT
GTTACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGCGT
ACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGA
TGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGC
TGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGGCCAAAGTACAGTGGAA

GGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGT
 GTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCA
 GCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACA
 CAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGC
 TCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTGA

SEQ ID NO : 31

h001-4-IgG1-YTE (輕鏈為 h001-4-kappa: SEQ ID NO : 30)

重鏈胺基酸序列 : IgG1-YTE

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYWMHWVRQA
 PGQGLEWMGYINPSSGFTKYHQNFKDRVTMTRDTSISTAYM
 ELSRLRSDDTAVYYCARQYDYDEDWYFDVWGQGTTVTVSS
 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
 SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV
 NHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP
 KPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
 AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
 LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK
 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
 DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO : 32

重鏈 DNA 序列 :

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTTCTTGTCGCGATTCT
TAAGGGTGTCCAGTGCCAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGC
 GCTGAGGTGAAGAAGCCCGGAGCGAGCGTAAAGGTGAGCT

GCAAGGCCAGCGGATACACCTTCACCGACTACTGGATGCA
CTGGGTGAGGCAGGCCCCAGGACAGGGCCTGGAGTGGATG
GGCTACATCAACCCCAGCAGCGGCTTTACCAAGTATCACCA
GAACTTCAAAGACAGGGTGACCATGACCAGGGACACCAGC
ATCAGCACCGCCTACATGGAGCTGAGCAGGCTGAGGAGCG
ACGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGCAATACGACTA
CGACGAGGACTGGTACTTCGACGTGTGGGGCCAAGGAACC
ACCGTGACTGTGAGCAGCGCTTCGACCAAGGGCCCATCGG
TCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGC
ACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGA
ACCGGTGACGGTGTCGTGGA ACTCAGGCGCCCTGACCAGC
GGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACT
CTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCT
TGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCC
CAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCT
TGTGACAAA ACTCACACATGCCACCGTGCCCAGCACCTG
AACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTTCCCCCAA AAA
CCCAAGGACACCCTCTACATCACCCGGGAGCCTGAGGTCA
CATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGT
CAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAAT
GCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGT
ACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGG
CTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAG
CCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAA

AGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCA
 TCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCT
 GCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAG
 TGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACA ACTACAAGACCA
 CGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTAC
 AGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGA
 ACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAAC
 CACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATG
 A

SEQ ID NO : 33

備註：底線部分為信號肽 DNA 序列

以下用生化測試方法驗證本發明性能及有益效果。

測試例 1、PCSK9 抗體結合野生型 PCSK9 蛋白的 ELISA 實驗

本發明 PCSK9 抗體與 PCSK9 的結合力測試，藉由抗體與固定在 ELISA 板上野生型 PCSK9 (WT-PCSK9, SEQ ID NO: 5) 的結合的量來檢測。

用 PBS 稀釋鏈黴親和素 (sigma, CAT#S4762) 至 $2\mu\text{g/ml}$ ，包被在 96 孔 ELISA 板上， 4°C 放置過夜。洗板後，在 37°C 用 Tris 緩衝液 (含 0.9mM 氯化鈣、 0.05% Tween 20 和 5% 脫脂奶粉) 封閉 2 小時。洗板，加入內部生產的生物素標記的 PCSK9 (bio-WT-PCSK9, 用含 0.9mM 氯化鈣、

0.05% Tween 20 和 1% 脫脂奶粉的 Tris 緩衝液稀釋) $100 \mu\text{l}$ / 孔, 37°C 孵育 1 小時。洗板, 加入不同濃度稀釋的抗 PCSK9 抗體樣品, 37°C 孵育 1 小時。再洗板, 加入辣根過氧化物酶-羊抗人 (H+L) 抗體 (jackson, CAT#109-035-088), 37°C 孵育 1 小時。再洗板, 加入四甲基聯苯胺溶液顯色。最後加入終止液, 在酶標儀上測量 OD450, 並計算其 EC50 值。

本發明嵌合抗體、回復突變後抗體與 PCSK9 的結合力 ELISA 實驗, 結果見表 5。

表 5. 本發明 PCSK9 抗體與 PCSK9 的結合活性測試

選殖株編號	EC50 (μ g/ml)
h001-1	0.0084
h001-2	0.0123
h001-3	0.0113
h001-4	0.012
h001-5	0.0141
h001-6	0.01
h001-7	0.012
h001-8	0.009
h001-9	0.0136
h001-10	0.0176
h001-11	0.0129
h001-12	0.0103
h001-13	0.0071
h001-14	0.0084
h001-15	0.011
h001-16	0.0082
h001-17	0.0114
h001-18	0.0147
h001-19	0.0139
h001-20	0.0126
h001-21	0.0145

h001-22	0.0123
h001-23	0.0118
h001-24	0.0092
Ch-001	0.0084

結果顯示，本發明 PCSK9 抗體與 PCSK9 有較高的結合活性。

測試例 2、PCSK9 抗體結合 PCSK9-Y 的 ELISA 實驗

本發明 PCSK9 抗體與 PCSK9-Y 的結合力測試，藉由抗體與固定在 ELISA 板上 PCSK9-Y (突變型 PCSK9，SEQ ID NO: 6)的結合的量來檢測。

用 PBS 稀釋鏈黴親和素 (sigma, CAT#S4762) 至 $2 \mu\text{g/ml}$ ，包被在 96 孔 ELISA 板上， 4°C 放置過夜。洗板後，在 37°C 用 Tris 緩衝液 (含 0.9mM 氯化鈣、 0.05% Tween 20 和 5% 脫脂奶粉) 封閉 2 小時。洗板，加入內部生產的生物素標記的 PCSK9-Y (bio-PCSK9-Y，用含 0.9mM 氯化鈣、 0.05% Tween 20 和 1% 脫脂奶粉的 Tris 緩衝液稀釋) $100 \mu\text{l/孔}$ ， 37°C 孵育 1 小時。洗板，加入不同濃度稀釋的抗 PCSK9 抗體樣品， 37°C 孵育 1 小時。再洗板，加入辣根過氧化物酶-羊抗人(H+L)抗體 (jackson, CAT#109-035-088)， 37°C 孵育 1 小時。再洗板，加入四甲基聯苯胺溶液顯色。最後加入終止液，在酶標儀上測量 OD450，並計算其 EC50 值。

本發明嵌合抗體、回復突變後抗體與突變型 PCSK9 的結合力 ELISA 實驗，結果見表 6。

表 6. 本發明 PCSK9 抗體與 PCSK9-Y 的結合活性測試

選殖株編號	EC50 (μ g/ml)
h001-1	0.0132
h001-2	0.0157
h001-3	0.0152
h001-4	0.0179
h001-5	0.0152
h001-6	0.0144
h001-7	0.0137
h001-8	0.0165
h001-9	0.0194
h001-10	0.0209
h001-11	0.0170
h001-12	0.0124
h001-13	0.0096
h001-14	0.0112
h001-15	0.0178
h001-16	0.0111
h001-17	0.0161
h001-18	0.0191
h001-19	0.0204
h001-20	0.0170
h001-21	0.0119

h001-22	0.0111
h001-23	0.0125
h001-24	0.0170
Ch-001	0.0132

結果顯示，本發明 PCSK9 抗體與 PCSK9-Y 有較高的結合活性。

測試例 3、PCSK9 抗體對 LDLR-FC/ PCSK9-Y 結合的阻斷

抗 PCSK9 抗體對 LDLR-FC(SEQ ID NO: 8)和 PCSK9-Y (突變型 PCSK9, SEQ ID NO: 6) 結合的阻斷能力測試，藉由檢測在抗體存在的條件下，PCSK9-Y 與 LDLR 結合的量來確定。

用磷酸緩衝液稀釋 LDLR-FC，至 $2 \mu\text{g/ml}$ ，包被在 96 孔 ELISA 板 (Costar, CAT#3590) 上， 4°C 放置過夜。洗板後，在 37°C 用 Tris 緩衝液 (含 0.9mM 氯化鈣、 0.05% Tween 20 和 5% 脫脂奶粉) 封閉 2 小時。洗板，加入生物素標記的 PCSK9-Y (bio-PCSK9-Y, 用含 0.9mM 氯化鈣、 0.05% Tween 20 和 1% 脫脂奶粉的 Tris 緩衝液稀釋至終濃度 $1 \mu\text{g/ml}$)，和抗體樣品 (用含 0.9mM 氯化鈣、 0.05% Tween 20 和 1% 脫脂奶粉的 Tris 緩衝液稀釋) 的混合液 $100 \mu\text{l}$ /孔， 37°C 孵育 1 小時。洗板，加入辣根過氧化物酶-鏈黴親和素 (sigma, CAT#S2438)， 37°C 孵育 1 小時。再洗板，加入四甲基聯苯胺溶液顯色。最後加入終止液，在酶標儀上測量

OD450，並計算其 IC50 值。

本發明嵌合抗體、回復突變後抗體對 LDLR-FC/
PCSK9-Y 結合的阻斷效果測試，結果見表 7：

表 7. 本發明 PCSK9 抗體阻斷 PCSK9-Y 與 LDLR 之間
結合的效果測試

選殖株編號	IC50 (μ g/ml)
h001-1	0.5658
h001-2	0.4553
h001-3	0.4749
h001-4	0.5302
h001-5	0.4677
h001-6	0.4374
h001-7	0.5150
h001-8	0.4145
h001-9	0.5203
h001-10	0.5142
Ch-001	0.3915

結果顯示，本發明 PCSK9 抗體能有效阻斷 PCSK9-Y
與 LDLR 之間的結合。

用上面所述方法，測試本發明 PCSK9 抗體對其它形式
的 LDLR-FC (內部生產的，序列見 SEQ ID NO: 7 或 SEQ ID
NO: 9)和 PCSK9-Y (SEQ ID NO: 5) 結合的阻斷能力，實驗
證明本發明 PCSK9 抗體能有效阻斷 PCSK9 與縮短形式的

LDLR 之間的結合。

測試例 4、PCSK9 抗體對 LDLR-FC/ PCSK9 結合的阻斷

本發明 PCSK9 抗體對 LDLR-FC (內部生產的，序列為 SEQ ID NO: 8)和 PCSK9 (SEQ ID NO: 5) 結合的阻斷能力測試，藉由檢測在抗體存在的條件下，PCSK9 與 LDLR 結合的量來確定。

用磷酸緩衝液稀釋 LDLR-FC 至 $5 \mu\text{g/ml}$ ，包被在 96 孔 ELISA 板上， 4°C 放置過夜。洗板後，在 37°C 用 Tris 緩衝液 (含 0.9mM 氯化鈣、 0.05% Tween 20 和 5% 脫脂奶粉) 封閉 2 小時。洗板，加入生物素標記的 PCSK9

(bio-WT-PCSK9，用含 0.9mM 氯化鈣、 0.05% Tween 20 和 1% 脫脂奶粉的 Tris 緩衝液稀釋至終濃度 $2 \mu\text{g/ml}$) 和抗體樣品 (用含 0.9mM 氯化鈣、 0.05% Tween 20 和 1% 脫脂奶粉的 Tris 緩衝液稀釋) 的混合液 $100 \mu\text{l/孔}$ ， 37°C 孵育 1 小時。洗板，加入辣根過氧化物酶-鏈黴親和素 (sigma，CAT#S2438)， 37°C 孵育 1 小時。再洗板，加入四甲基聯苯胺溶液顯色。最後加入終止液，在酶標儀上測量 OD450，並計算其 IC50 值。

本發明嵌合抗體、回復突變後抗體對 LDLR-FC/ PCSK9 結合的阻斷效果測試，結果見表 8。

表 8. 本發明 PCSK9 抗體阻斷 PCSK9 與 LDLR 之間結合的效果測試

選殖株編號	IC50 (μ g/ml)
h001-1	0.4997
h001-2	0.6750
h001-3	0.7021
h001-4	0.7597
h001-5	4.322
h001-6	0.6620
h001-7	0.6521
h001-8	0.7738
h001-9	0.9230
h001-10	0.8290
Ch-001	0.8363

結果顯示，本發明 PCSK9 抗體能有效阻斷 PCSK9 與 LDLR 之間的結合。

用上面所述方法，測試本發明 PCSK9 抗體對其它形式的 LDLR-FC (內部生產的，序列見 SEQ ID NO: 7 或 SEQ ID NO: 9)和 PCSK9 (SEQ ID NO: 5) 結合的阻斷能力，實驗證明本發明 PCSK9 抗體能有效阻斷 PCSK9 與縮短形式的 LDLR 之間的結合。

測試例 5、PCSK9 抗體對 LDL 的攝取實驗

HepG2 細胞（中科院細胞庫，#CAT，TCHu72）培養在 DMEM 培養基 (Hyclone，#CAT SH30243.01B) 中（含 10% 胎牛血清，Gibco，#CAT 10099-141）。當細胞覆蓋 80-90% 時，消化吹散後計數 1.5×10^4 cells/孔鋪於 96 孔板。24 小時後，更換培養基為 DMEM，10% 無脂蛋白血清（Millipore，CAT#LP4）。48 小時後，用磷酸緩衝液洗 2 次，加入在 4 °C 預孵育 1 小時的含 PCSK9（SEQ ID NO: 1，終濃度 $10 \mu\text{g/ml}$ ）和抗體樣品（用培養基稀釋至不同濃度）的混合物，以及終濃度 $10 \mu\text{g/ml}$ 的 BODIPY-®LDL（Invitrogen，CAT#L3483），37°C 孵育。6 小時後，用磷酸緩衝液洗板 2 次，用酶標儀讀取螢光值（EX485nm/ EM535nm）。然後加入 $50 \mu\text{l}$ /孔 CellTiter-Glo® 細胞活性發光檢測試劑（Promega, G7571），讀取化學發光值。LDL uptake 結果如第 3 圖，第 4 圖所示，資料結果顯示本發明 PCSK9 抗體能夠促進 HepG2 細胞攝取 LDL。

測試例 6、BIAcore 檢測 PCSK9 抗體親和力實驗

按照人 Fab 捕獲試劑盒（Cat. # 28-9583-25，GE）說明書中所述的方法，將人 Fab 捕獲分子共價偶聯於 CM5 生物傳感晶片（Cat. # BR-1000-12，GE）上，從而親和捕獲待測抗體，然後於晶片表面流經人 PCSK9 抗原（帶 His 標籤的人 PCSK9：PCSK9-His6，SEQ ID NO：1），利用 Biacore 儀器即時檢測反應信號從而獲得結合和解離曲線，藉由擬合得到親和力數值，見表 9。在實驗中每個循環解離完成後，

用人 Fab 捕獲試劑盒 (GE) 裡配置的再生溶液將生物晶片洗淨再生。

表 9：抗 PCSK9 抗體的親和力

固定相	流動相	親和力 KD (M)
h001-4-WT	人 PCSK9 抗原	2.88E-10
h001-4-YTE		4.91E-10

本發明 PCSK9 抗體與人 PCSK9 抗原有強親和力。

用上面相似的方法，檢測本發明 PCSK9 抗體與 PCSK9-Y (SEQ ID NO: 4) 的親和力，顯示本發明 PCSK9 抗體與 PCSK9-Y 抗原有較強親和力。

測試例 7、PCSK9 抗體體內藥效實驗

本實驗構建過表達人 PCSK9 的小鼠模型，進行尾靜脈注射 PCSK9 抗體，來評價本發明 PCSK9 抗體在過表達人 PCSK9 的小鼠體內降低 LDL-c 的作用。人 IgG (從混合的正常人血清中，利用傳統的親和層析方法如 ProteinA 純化獲得的人免疫球蛋白) 作為空白對照。

C57B1/6 小鼠(購自上海西普爾·必凱實驗動物有限責任公司)實驗室環境適應 5 天，藉由尾靜脈注射 AAV-PCSK9 病毒(北京本元正陽基因技術有限公司)，注射 4×10^{11} v.g.。注射病毒後於實驗前一天禁食過夜，眼眶取血，用 HDL and LDL/VLDL Cholesterol Quantification Kit(購自 BioVision 公司，貨號 #K613-100)檢測 LDL-c，根據 LDL-c 濃度隨機分組，每組 6 隻小鼠(n=6)，進行尾靜脈注射給藥，內部生產

的人 IgG、h001-4-WT 抗體給藥劑量為 10 mg/kg(人 IgG、h001-4-WT 抗體用 PBS 配製，濃度為 1 mg/ml)。取血前禁食 6 小時，給藥後第 24、48、72、96 小時眼眶取血，37°C 放置 1 小時，3500 rpm 離心 10 分鐘，取血清保存在 -80°C。

最後一次取血清後，把凍存的血清在同一天檢測。用 HDL and LDL/VLDL Cholesterol Quantification Kit 檢測血清中 LDL-c 濃度，按照試劑盒說明書操作。

實驗結果如第 5 圖所示，正常小鼠血清 LDL-c 濃度約為 12 mg/dl。注射 AAV8-PCSK9 病毒後，血清中 LDL-c 濃度達平均 40 mg/dl。分組後給藥，給藥 24 小時後，與人 IgG 組相比，h001-4-WT 組 LDL-c 濃度下降 50%；給藥 48 小時後，h001-4-WT 組 LDL-c 濃度下降 49%；給藥 72 小時後，h001-4-WT 組 LDL-c 濃度下降 32%；給藥 96 小時後，h001-4-WT 組 LDL-c 濃度下降 20%，如表 10 和第 6 圖所示。

綜上，h001-4-WT 能夠降低過表達人 PCSK9 的小鼠血清中 LDL-c 濃度，且藥效持續到 72 小時。

表 10.各組小鼠血清中 LDL-c 濃度變化

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

測試例 8、 競爭性實驗

在競爭性 ELISA 實驗中，我們將一種抗體包板過夜，之後同時加入生物素化的 pCSK9-his 和 50 倍於包板濃度的競爭抗體，包板抗體和溶液中的抗體將競爭性結合抗原，之後檢測板上抗原的信號。結果顯示，h001-4 和 21B12 (US8030457B2) 自身能夠競爭性結合抗原外，h001-4 和 21B12 之間無明顯競爭結合，提示兩者抗原決定基的不同。

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

測試例 9、食蟹猴體內藥效及藥物代謝檢測

為考察本發明的抗體在體內的作用效果及代謝情況，嘗試了在食蟹猴體內給藥實驗，分別給藥 h001-4-WT 及 h001-4-YTE。採用靜脈注射給藥，劑量選擇 3mg/kg，每組 3 隻雄性食蟹猴。約 2~4 mL/分鐘，緩慢推注。藉由不同時間點取血檢測脂蛋白尤其是低密度脂蛋白 (LDL) 及血清中抗體濃度，其中脂蛋白檢測點為給藥前和給藥後 1、4、8、12、16、20、24、28 天，PK 採血點為給藥前、給藥後 15 分鐘、30 分鐘、1 小時、3 小時、8 小時、12 小時、24 小時、48 小時、72、96、120 小時、144 小時、168 小時、336 小時、504 小時、672 小時。

試驗結果顯示 (第 7 圖) h001-4-WT 和 h001-4-YTE 均能夠明顯降低食蟹猴體內 LDL 的含量，且 h001-4-YTE 的

降低持續時間要優於 h001-4-WT。

藥物代謝取血點血清樣品藉由 ELISA 檢測其中 h001-4-WT 和 h001-4-YTE 的含量，方法參考測試例 1 所述，結果顯示 h001-4-WT 在食蟹猴體內半衰期為 4 天，而 h001-4-YTE 在食蟹猴體內半衰期為 7.3 天，YTE 相比 WT 具有明顯延長的體內半衰期。

【符號說明】

無。

【序列表】

<110> 江蘇恆瑞股份有限公司、上海恆瑞股份有限公司

<120> PCSK9 抗體、其抗原結合片段及其醫藥用途

<130> 760083CPCT

<160> 33

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 698

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 帶 His 標籤的 pCSK9: pCSK9-His6, 用於免疫原免疫小鼠或檢測試劑

<400> 1

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 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 His His His His His His
 690 695

<210> 2

<211> 714

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 帶 PADRE 和 His 標籤的 pCSK9: pCSK9-PADRE-His6, 作為免疫原, 所含 PADRE 肽可以促進免疫

<400> 2

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

<400> 3

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 Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Ala Gly Trp Gln Leu Phe Cys Arg
 450 455 460

Thr Val Trp Ser Ala His Ser Gly Pro Thr Arg Met Ala Thr Ala Val
 465 470 475 480

Ala Arg Cys Ala Pro Asp Glu Glu Leu Leu Ser Cys Ser Ser Phe Ser
 485 490 495

Arg Ser Gly Lys Arg Arg Gly Glu Arg Met Glu Ala Gln Gly Gly Lys
 500 505 510

Leu Val Cys Arg Ala His Asn Ala Phe Gly Gly Glu Gly Val Tyr Ala
 515 520 525

Ile Ala Arg Cys Cys Leu Leu Pro Gln Ala Asn Cys Ser Val His Thr
 530 535 540

Ala Pro Pro Ala Glu Ala Ser Met Gly Thr Arg Val His Cys His Gln
 545 550 555 560

Gln Gly His Val Leu Thr Gly Cys Ser Ser His Trp Glu Val Glu Asp
 565 570 575

Leu Gly Thr His Lys Pro Pro Val Leu Arg Pro Arg Gly Gln Pro Asn
 580 585 590

Gln Cys Val Gly His Arg Glu Ala Ser Ile His Ala Ser Cys Cys His
 595 600 605

Ala Pro Gly Leu Glu Cys Lys Val Lys Glu His Gly Ile Pro Ala Pro
 610 615 620

Gln Glu Gln Val Thr Val Ala Cys Glu Glu Gly Trp Thr Leu Thr Gly
 625 630 635 640

Cys Ser Ala Leu Pro Gly Thr Ser His Val Leu Gly Ala Tyr Ala Val
 645 650 655

Asp Asn Thr Cys Val Val Arg Ser Arg Asp Val Ser Thr Thr Gly Ser
 660 665 670

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

675

680

685

His Leu Ala Gln Ala Ser Gln Glu Leu Gln His His His His His His
 690 695 700

<210> 4

<211> 698

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> pCSK9-D374Y 突變蛋白, 帶 his 標籤: pCSK9-D374Y-His6, 作為檢測試劑

<400> 4

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 Tyr 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

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 His His His His His His
690 695

<210> 5
<211> 719
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 插入生物素接受肽及 his 標籤的 pCSK9 蛋白: pCSK9-BP15-His6, 作為檢測試劑, BP15 肽位置在表達過程中能夠進行生物素標記, 免除體外生物素標記及可能導致的構建變化

<400> 5

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

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 Tyr 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

Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu His His His His His
705 710 715

<210> 7

<211> 802

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 帶 Flag 標籤和 His 標籤的 pCSK9 受體蛋白 LDLR 胞外域片段: LDLR-ECD-Flag-His6, 檢測試劑

<400> 7

Met Gly Pro Trp Gly Trp Lys Leu Arg Trp Thr Val Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

Ala Ala Ala Gly Thr Ala Val Gly Asp Arg Cys Glu Arg Asn Glu Phe
20 25 30

Gln Cys Gln Asp Gly Lys Cys Ile Ser Tyr Lys Trp Val Cys Asp Gly
35 40 45

Ser Ala Glu Cys Gln Asp Gly Ser Asp Glu Ser Gln Glu Thr Cys Leu
50 55 60

Ser Val Thr Cys Lys Ser Gly Asp Phe Ser Cys Gly Gly Arg Val Asn
65 70 75 80

Arg Cys Ile Pro Gln Phe Trp Arg Cys Asp Gly Gln Val Asp Cys Asp
85 90 95

Asn Gly Ser Asp Glu Gln Gly Cys Pro Pro Lys Thr Cys Ser Gln Asp
100 105 110

Glu Phe Arg Cys His Asp Gly Lys Cys Ile Ser Arg Gln Phe Val Cys
115 120 125

Asp Ser Asp Arg Asp Cys Leu Asp Gly Ser Asp Glu Ala Ser Cys Pro
130 135 140

Val Leu Thr Cys Gly Pro Ala Ser Phe Gln Cys Asn Ser Ser Thr Cys
145 150 155 160

Ile Pro Gln Leu Trp Ala Cys Asp Asn Asp Pro Asp Cys Glu Asp Gly
 165 170 175

Ser Asp Glu Trp Pro Gln Arg Cys Arg Gly Leu Tyr Val Phe Gln Gly
 180 185 190

Asp Ser Ser Pro Cys Ser Ala Phe Glu Phe His Cys Leu Ser Gly Glu
 195 200 205

Cys Ile His Ser Ser Trp Arg Cys Asp Gly Gly Pro Asp Cys Lys Asp
 210 215 220

Lys Ser Asp Glu Glu Asn Cys Ala Val Ala Thr Cys Arg Pro Asp Glu
 225 230 235 240

Phe Gln Cys Ser Asp Gly Asn Cys Ile His Gly Ser Arg Gln Cys Asp
 245 250 255

Arg Glu Tyr Asp Cys Lys Asp Met Ser Asp Glu Val Gly Cys Val Asn
 260 265 270

Val Thr Leu Cys Glu Gly Pro Asn Lys Phe Lys Cys His Ser Gly Glu
 275 280 285

Cys Ile Thr Leu Asp Lys Val Cys Asn Met Ala Arg Asp Cys Arg Asp
 290 295 300

Trp Ser Asp Glu Pro Ile Lys Glu Cys Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp
 305 310 315 320

Asn Asn Gly Gly Cys Ser His Val Cys Asn Asp Leu Lys Ile Gly Tyr
 325 330 335

Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys
 340 345 350

Glu Asp Ile Asp Glu Cys Gln Asp Pro Asp Thr Cys Ser Gln Leu Cys
 355 360 365

Val Asn Leu Glu Gly Gly Tyr Lys Cys Gln Cys Glu Glu Gly Phe Gln
 370 375 380

Leu Asp Pro His Thr Lys Ala Cys Lys Ala Val Gly Ser Ile Ala Tyr

Asn Glu Ala Ile Phe Ser Ala Asn Arg Leu Thr Gly Ser Asp Val Asn
625 630 635 640

Leu Leu Ala Glu Asn Leu Leu Ser Pro Glu Asp Met Val Leu Phe His
645 650 655

Asn Leu Thr Gln Pro Arg Gly Val Asn Trp Cys Glu Arg Thr Thr Leu
660 665 670

Ser Asn Gly Gly Cys Gln Tyr Leu Cys Leu Pro Ala Pro Gln Ile Asn
675 680 685

Pro His Ser Pro Lys Phe Thr Cys Ala Cys Pro Asp Gly Met Leu Leu
690 695 700

Ala Arg Asp Met Arg Ser Cys Leu Thr Glu Ala Glu Ala Ala Val Ala
705 710 715 720

Thr Gln Glu Thr Ser Thr Val Arg Leu Lys Val Ser Ser Thr Ala Val
725 730 735

Arg Thr Gln His Thr Thr Thr Arg Pro Val Pro Asp Thr Ser Arg Leu
740 745 750

Pro Gly Ala Thr Pro Gly Leu Thr Thr Val Glu Ile Val Thr Met Ser
755 760 765

His Gln Ala Leu Gly Asp Val Ala Gly Arg Gly Asn Glu Lys Lys Pro
770 775 780

Ser Ser Val Arg Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys His His His His
785 790 795 800

His His

<210> 8

<211> 331

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 縮短形式的 LDLR 胞外域片段與 hIgG1-Fc 融合蛋白 (具有與 pCSK9 結合活性)

: LDLR-sECD -Fc (hIgG1) 作為檢測試劑

<400> 8

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
 1 5 10 15

Val Gln Cys Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp Asn Asn Gly Gly Cys Ser
 20 25 30

His Val Cys Asn Asp Leu Lys Ile Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp
 35 40 45

Gly Phe Gln Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Glu Asp Ile Asp Glu Cys
 50 55 60

Gln Asp Pro Asp Thr Cys Ser Gln Leu Cys Val Asn Leu Glu Gly Gly
 65 70 75 80

Tyr Lys Cys Gln Cys Glu Glu Gly Phe Gln Leu Asp Pro His Thr Lys
 85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 65 70 75 80

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 85 90 95

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 100 105 110

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 115 120 125

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 130 135 140

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 145 150 155 160

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 165 170 175

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 180 185 190

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
 195 200 205

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 210 215 220

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 225 230 235 240

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 245 250 255

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 260 265 270

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 275 280 285

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
290

<210> 10
<211> 121
<212> PRT
<213> 鼠

<400> 10

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

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

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Phe Thr Lys Tyr His Gln Asn Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Gln Tyr Asp Tyr Asp Glu Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
100 105 110

Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 11
<211> 112
<212> PRT
<213> 鼠

<400> 11

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

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

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Arg Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln
 85 90 95

Ser Phe Asn Leu Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 12

<211> 5

<212> PRT

<213> 鼠

<400> 12

Asp Tyr Trp Met His

1

5

<210> 13

<211> 17

<212> PRT

<213> 鼠

<400> 13

Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Phe Thr Lys Tyr His Gln Asn Phe Lys

1

5

10

15

Asp

<210> 14

<211> 12

<212> PRT

<213> 鼠

<400> 14

Gln Tyr Asp Tyr Asp Glu Asp Trp Tyr Phe Asp Val

1

5

10

<210> 15
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 鼠

<400> 15

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Phe Leu
 1 5 10 15

Ala

<210> 16
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 鼠

<400> 16

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
 1 5

<210> 17
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 鼠

<400> 17

Lys Gln Ser Phe Asn Leu Phe Thr
 1 5

<210> 18
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> ch-001

<400> 18

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 Asp Tyr
 20 25 30

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

35

40

45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Phe Thr Lys Tyr His Gln Asn Phe
50 55 60

Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gln Tyr Asp Tyr Asp Glu Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 19

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> h001-VH. 1A

<400> 19

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 Asn Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Phe Thr Lys Tyr His Gln Asn Phe
50 55 60

Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gln Tyr Asp Tyr Asp Glu Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 20

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> h001-VH.1B

<400> 20

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 Asp Tyr
 20 25 30

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Phe Thr Lys Tyr His Gln Asn Phe
 50 55 60

Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Gln Tyr Asp Tyr Asp Glu Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 21

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> h001-VH.1C

<400> 21

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 Asn Asp Tyr
 20 25 30

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Phe Thr Lys Tyr His Gln Asn Phe
 50 55 60

Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Gln Tyr Asp Tyr Asp Glu Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 22

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> h001-VH.1D

<400> 22

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 Asn Asp Tyr
 20 25 30

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Phe Thr Lys Tyr His Gln Asn Phe
 50 55 60

Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Gln Tyr Asp Tyr Asp Glu Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 23
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> h001-VH.1E

<400> 23

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 Asn Asp Tyr
 20 25 30

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Phe Thr Lys Tyr His Gln Asn Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Gln Tyr Asp Tyr Asp Glu Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 24

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> ch-001 hVL.1 (CDR 接枝)

<400> 24

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 Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30

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

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

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

Ser Phe Asn Leu Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 25

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> h001-VL.1A

<400> 25

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 Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30

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

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

Ser Phe Asn Leu Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 26

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> h001-VL.1B

<400> 26

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30

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

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

Ser Phe Asn Leu Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 27

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> h001-VL.1C

<400> 27

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30

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

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

Ser Phe Asn Leu Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 28

<211> 451

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> h001-4-IgG1

<400> 28

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 Asp Tyr
 20 25 30

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Phe Thr Lys Tyr His Gln Asn Phe
 50 55 60

Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Gln Tyr Asp Tyr Asp Glu Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

<212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> h001-4-IgG1

<400> 29
 atggagtttg ggctgagctg gctttttctt gtgcgatte ttaagggtgt ccagtgccag 60
 gtgcagctgg tgcagagcgg cgctgagggt aagaagcccc gagcgagcgt aaaggtgagc 120
 tgcaaggcca gcggatacac cttcaccgac tactggatgc actgggtgag gcaggcccca 180
 ggacagggcc tggagtggat gggctacatc aaccccagca gggcctttac caagtatcac 240
 cagaacttca aagacagggt gaccatgacc agggacacca gcatcagcac cgcctacatg 300
 gagctgagca ggctgaggag cgacgacacc gccgtgtact actgcgccag gcaatacgac 360
 tacgacgagg actggtactt cgacgtgtgg ggccaaggaa ccaccgtgac tgtgagcagc 420
 gcttcgacca agggcccatac ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 480
 ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgtcg 540
 tggaaactcag gcgcctgac cagcggcgtg cacacettcc eggctgtcct acagtcctca 600
 ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacccagacc 660
 tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 720
 aaatcttgtg aaaaaactca cacatgcca ccgtgccag cacctgaact cctgggggga 780
 ccgtcagtct tctcttccc cccaaaacc aaggacacc tcgatgctc ccggaccct 840
 gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 900
 tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 960
 agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtctgcacc aggactggct gaatggcaag 1020
 gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aacctctcc 1080
 aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacacc tgccccata ccgggatgag 1140
 ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1200
 gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1260
 ctggactccg acggctcctt ctctcttac agcaagetca ccgtggacaa gagcaggtgg 1320
 cagcagggga acgtcttctc atgtccgtg atgcatgagg ctctgcacaa cactacacg 1380
 cagaagagcc tctccctgtc tccggtaaa tga 1413

<210> 30

<211> 219
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> h001-4-kappa

<400> 30

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30

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

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

Ser Phe Asn Leu Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 31

<211> 726

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> h001-4-kappa

<400> 31

atggacatgc gcgtgcccgc ccagctgctg ggccctgctgc tgctgtggtt ccccgctcgc 60
 cgatgcgaca tcgtgatgtc tcagagccca tctagcctga gcgccagcgt gggcgacagg 120
 gtaaccatca cctgcaagag cagccaaagc ctgctgaaca gcaggaccgc caagaacttc 180
 ctggcttggt atcagcagaa gcccggaag tctcccaagt tgctgatcta ctgggccagc 240
 accagggaga gcggcgtgcc cgacaggttc agcggctccg gcagcggcac cgacttcacc 300
 ctgaccatct ctagtctgca gcccgaggac ttgccacct actactgcaa gcagagcttc 360
 aatctgttca ccttcggcca gggcaccaag ctggagatca agcgtacggt ggctgcacca 420
 tctgtcttca tcttcccgcc atctgatgag cagttgaaat ctggaactgc ctctgttgtg 480
 tgccctgctga ataacttcta tcccagagag gccaaagtac agtggaaagt ggataacgcc 540
 ctccaatcgg gtaactccca ggagagtgtc acagagcagg acagcaagga cagcacctac 600
 agcctcagca gcacctgac gctgagcaaa gcagactacg agaaacacaa agtctacgcc 660
 tgccaagtca cccatcaggg cctgagctcg cccgtcacia agagcttcaa caggggagag 720
 tggtga 726

<210> 32

<211> 451

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> h001-4-IgG1-YTE

<400> 32

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 Asp Tyr
 20 25 30

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Phe Thr Lys Tyr His Gln Asn Phe
 50 55 60

Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Gln Tyr Asp Tyr Asp Glu Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr
 245 250 255

Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445

Pro Gly Lys
 450

<210> 33

<211> 1413

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> h001-4-IgG1-YTE

<400> 33

```

atggagtttg ggctgagctg gctttttctt gtcgcgattc ttaagggtgt ccagtgccag      60
gtgcagctgg tgcagagcgg cgctgaggtg aagaagcccg gagcgagcgt aaaggtgagc      120
tgcaaggcca gcggatacac cttcaccgac tactggatgc actgggtgag gcaggcccca      180
ggacagggcc tggagtggat gggctacatc aaccccagca gcggctttac caagtatcac      240
cagaacttca aagacagggt gaccatgacc agggacacca gcatcagcac cgcctacatg      300
gagctgagca ggctgaggag cgacgacacc gccgtgtact actgcgccag gcaatacgac      360
tacgacgagg actggtactt cgacgtgtgg ggccaaggaa ccaccgtgac tgtgagcagc      420
gcttcgacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg      480
ggcacagcgg ccttgggctg cctggtcaag gactacttcc cogaaccggt gacgggtgtc      540
tggaactcag gcgcctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca      600
ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc      660
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc      720
aatcttgtg acaaaactca cacatgccc aagtgcccag cacctgaact cctgggggga      780
ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaacce aaggacacce tctacatcac ccgggagcct      840
gaggtcacat gcgtgggtgg ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg      900
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac      960
agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtctgcacc aggactggct gaatggcaag     1020
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc     1080
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacacce tgccccatc ccgggatgag     1140
ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc     1200
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg     1260
ctggactccg acggctcctt ctctctctac agcaagctca ccgtggacia gagcaggtgg     1320
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa cactacacg     1380
cagaagagcc tctcctgtc tccgggtaaa tga                                     1413

```

申請專利範圍

1. 一種 PCSK9 抗體或其抗原結合片段，其包含分別如 SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13 和 SEQ ID NO:14 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，和分別如 SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16 和 SEQ ID NO:17 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。
2. 如申請專利範圍第 1 項所述的 PCSK9 抗體或其抗原結合片段，其中，該 PCSK9 抗體或其抗原結合片段為鼠源抗體或其片段。
3. 如申請專利範圍第 1 項所述的 PCSK9 抗體或其抗原結合片段，其中，該 PCSK9 抗體的輕鏈可變區進一步包含鼠源 κ 鏈或鼠源 κ 鏈變體的輕鏈 FR 區、或者鼠源 λ 鏈或鼠源 λ 鏈變體的輕鏈 FR 區；其中，該 PCSK9 抗體的重鏈可變區進一步包含鼠源 IgG1 或其變體的重鏈 FR 區、或 IgG2 或其變體的重鏈 FR 區、或 IgG3 或其變體的重鏈 FR 區。
4. 如申請專利範圍第 3 項所述的 PCSK9 抗體或其抗原結合片段，其包含 SEQ ID NO:10 所示的重鏈可變區和 SEQ ID NO:11 所示的輕鏈可變區。
5. 如申請專利範圍第 1 項所述的 PCSK9 抗體或其抗原結合片段，其中，該 PCSK9 抗體的輕鏈進一步包含鼠源 κ 鏈或其變體的輕鏈恒定區、或者鼠源 λ 鏈或其變體的輕鏈恒定區；其中，該 PCSK9 抗體重鏈進一步包含鼠源 IgG1 或其變體的重鏈恒定區、或 IgG2 或其變體的重鏈

- 恒定區、或 IgG3 或其變體的重鏈恒定區。
6. 如申請專利範圍第 1 項所述的 PCSK9 抗體或其抗原結合片段，其中，該 PCSK9 抗體或其抗原結合片段為嵌合抗體或其片段。
 7. 如申請專利範圍第 1 項所述的 PCSK9 抗體或其抗原結合片段，其中，該抗體或其抗原結合片段為人源化抗體或其片段。
 8. 如申請專利範圍第 7 項所述的 PCSK9 抗體或其抗原結合片段，其中，該人源化抗體重鏈可變區上的重鏈 FR 區序列來源於人種系重鏈，IGHV1-2*02 和 hjh2 的組合序列或其突變序列；該人源化抗體包含人種系重鏈 IGHV1-2*02 的 FR1、FR2、FR3 區和 hjh2 的 FR4 區或其突變序列。
 9. 如申請專利範圍第 8 項所述的 PCSK9 抗體或其抗原結合片段，其中，該人源化抗體含有 SEQ ID NO:18 所示的重鏈可變區；或 SEQ ID NO:18 變體所示的重鏈可變區；其中，該 SEQ ID NO:18 變體是在 SEQ ID NO:18 所示的重鏈可變區位置上具有 1-10 個胺基酸變化的序列。
 10. 如申請專利範圍第 9 項所述的 PCSK9 抗體或其抗原結合片段，其中，該 SEQ ID NO:18 變體是在 SEQ ID NO:18 所示的重鏈可變區的 FR 區位置上具有 1-10 個胺基酸的回復突變。
 11. 如申請專利範圍第 10 項所述的 PCSK9 抗體或其抗原結合片段，其中，該回復突變選自 T30N、R87T、R72A、

T74K、M48I、V68A、M70L、R38K 和 R67K 的胺基酸回復突變。

12. 如申請專利範圍第 8 項所述的 PCSK9 抗體或其抗原結合片段，其中，該人源化抗體包含選自 SEQ ID NO:19、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22 和 SEQ ID NO: 23 的序列所示的重鏈可變區。
13. 如申請專利範圍第 7 項所述的 PCSK9 抗體或其抗原結合片段，其中，該人源化抗體輕鏈可變區上的輕鏈 FR 區序列來源於人種系輕鏈範本 IGKV1-39*01 和 hjk2.1 的組合序列或其突變序列；該人源化抗體包含人種系輕鏈 IGKV1-39*01 的 FR1、FR2、FR3 區和 hjk2.1 的 FR4 區或其突變序列。
14. 如申請專利範圍第 13 項所述的 PCSK9 抗體或其抗原結合片段，其中，該人源化抗體進一步包含 SEQ ID NO:24 所示的、或 SEQ ID NO:24 變體所示的輕鏈可變區；該 SEQ ID NO:24 變體是在 SEQ ID NO:24 所示的輕鏈可變區位置上具有 1-10 的胺基酸變化的序列。
15. 如申請專利範圍第 14 項所述的 PCSK9 抗體或其抗原結合片段，其中，該 SEQ ID NO:24 變體是在 SEQ ID NO:24 所示的輕鏈可變區的 FR 區位置上具有 1-10 個胺基酸的回復突變。
16. 如申請專利範圍第 15 項所述的 PCSK9 抗體或其抗原結合片段，其中，該回復突變選自 T5S、S66D、Q3V 和 A49S 的胺基酸回復突變。

17. 如申請專利範圍第 15 項所述的 PCSK9 抗體或其抗原結合片段，其中，該回復突變為 A43S 的胺基酸變化。
18. 如申請專利範圍第 13 項所述的 PCSK9 抗體或其抗原結合片段，其中，該人源化抗體包含選自 SEQ ID NO:25、SEQ ID NO: 26 和 SEQ ID NO: 27 的序列所示的輕鏈可變區。
19. 如申請專利範圍第 7 項所述的 PCSK9 抗體或其抗原結合片段，其中，該人源化抗體包含重鏈可變區序列和 / 或輕鏈可變區序列，該重鏈可變區序列選自 SEQ ID NO:19、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22 和 SEQ ID NO: 23 所示的序列，或該重鏈可變區序列選自與 SEQ ID NO:19、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22 和 SEQ ID NO: 23 具有至少 95% 序列同一性的序列；該輕鏈可變區序列選自 SEQ ID NO:25、SEQ ID NO: 26 和 SEQ ID NO: 27 所示的序列，或該輕鏈可變區序列選自與 SEQ ID NO:25、SEQ ID NO: 26 和 SEQ ID NO: 27 具有至少 95% 序列同一性序列。
20. 如申請專利範圍第 7 項所述的 PCSK9 抗體或其抗原結合片段，其中，該 PCSK9 抗體包含選自以下的重鏈可變區和輕鏈可變區：
 - 1) SEQ ID NO: 18 的重鏈可變區和 SEQ ID NO: 25 的輕鏈可變區，
 - 2) SEQ ID NO: 18 的重鏈可變區和 SEQ ID NO: 26 的輕鏈可變區，

- 3) SEQ ID NO: 18 的重鏈可變區和 SEQ ID NO: 27 的輕鏈可變區，
- 4) SEQ ID NO: 19 的重鏈可變區和 SEQ ID NO: 24 的輕鏈可變區，
- 5) SEQ ID NO: 19 的重鏈可變區和 SEQ ID NO: 25 的輕鏈可變區，
- 6) SEQ ID NO: 19 的重鏈可變區和 SEQ ID NO: 26 的輕鏈可變區，
- 7) SEQ ID NO: 19 的重鏈可變區和 SEQ ID NO: 27 的輕鏈可變區，
- 8) SEQ ID NO: 20 的重鏈可變區和 SEQ ID NO: 24 的輕鏈可變區，
- 9) SEQ ID NO: 20 的重鏈可變區和 SEQ ID NO: 25 的輕鏈可變區，
- 10) SEQ ID NO: 20 的重鏈可變區和 SEQ ID NO: 26 的輕鏈可變區，
- 11) SEQ ID NO: 20 的重鏈可變區和 SEQ ID NO: 27 的輕鏈可變區，
- 12) SEQ ID NO: 21 的重鏈可變區和 SEQ ID NO: 24 的輕鏈可變區，
- 13) SEQ ID NO: 21 的重鏈可變區和 SEQ ID NO: 25 的輕鏈可變區，
- 14) SEQ ID NO: 21 的重鏈可變區和 SEQ ID NO: 26 的輕鏈可變區，

15) SEQ ID NO: 21 的重鏈可變區和 SEQ ID NO: 27 的輕鏈可變區，

16) SEQ ID NO: 22 的重鏈可變區和 SEQ ID NO: 24 的輕鏈可變區，

17) SEQ ID NO: 22 的重鏈可變區和 SEQ ID NO: 25 的輕鏈可變區，

18) SEQ ID NO: 22 的重鏈可變區和 SEQ ID NO: 26 的輕鏈可變區，

19) SEQ ID NO: 22 的重鏈可變區和 SEQ ID NO: 27 的輕鏈可變區，

20) SEQ ID NO: 23 的重鏈可變區和 SEQ ID NO: 24 的輕鏈可變區，

21) SEQ ID NO: 23 的重鏈可變區和 SEQ ID NO: 25 的輕鏈可變區，

22) SEQ ID NO: 23 的重鏈可變區和 SEQ ID NO: 26 的輕鏈可變區，

23) SEQ ID NO: 23 的重鏈可變區和 SEQ ID NO: 27 的輕鏈可變區，和

24) SEQ ID NO: 18 的重鏈可變區和 SEQ ID NO: 24 的輕鏈可變區。

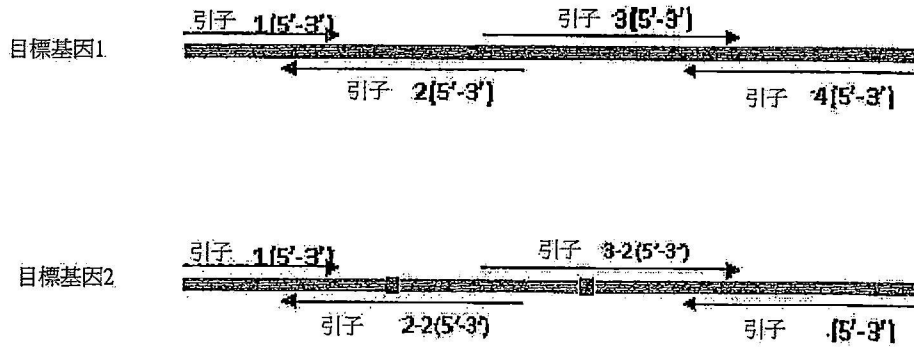
21. 如申請專利範圍第 7 項所述的 PCSK9 抗體或其抗原結合片段，其中，該 PCSK9 抗體的重鏈進一步包含人源 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 或其變體的重鏈恒定區，或與其具有至少 95% 序列同一性的胺基酸序列；

其中，該 PCSK9 抗體的重鏈進一步包含人源 κ 、 λ 鏈或其變體的恒定區，或與其具有至少 95% 序列同一性的胺基酸序列。

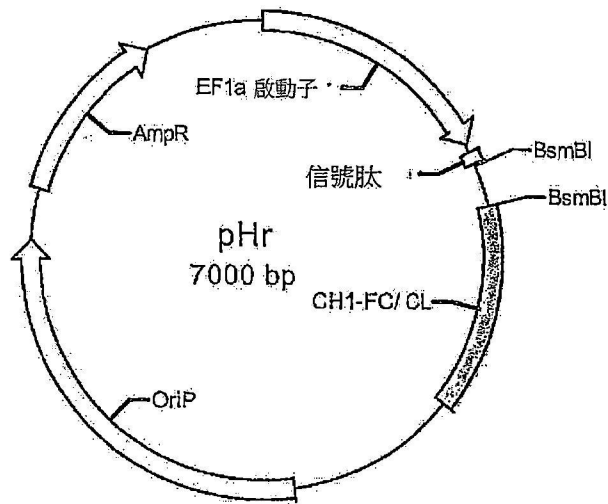
22. 如申請專利範圍第 21 項所述的 PCSK9 抗體或其抗原結合片段，其中，該 PCSK9 抗體的重鏈進一步包含人源 IgG1、IgG2 或 IgG4 或使用胺基酸突變延長抗體在血清中的半衰期的 IgG1、IgG2 或 IgG4 變體的重鏈恒定區。
23. 如申請專利範圍第 21 項所述的 PCSK9 抗體或其抗原結合片段，其中，該 PCSK9 抗體的重鏈進一步包含引入 YTE 突變的 IgG1、IgG2 或 IgG4 重鏈恒定區。
24. 根據申請專利範圍第 21 項所述的 PCSK9 抗體或其抗原結合片段，其中，該人源化抗體包含選自以下的重鏈和輕鏈：
 - 1) SEQ ID NO: 28 的重鏈和 SEQ ID NO: 30 的輕鏈，和
 - 2) SEQ ID NO: 32 的重鏈和 SEQ ID NO: 30 的輕鏈。
25. 一種醫藥組成物，其含有治療有效量的根據申請專利範圍第 1 至 24 項中任一項所述的 PCSK9 抗體或其抗原結合片段，以及一種或多種藥學上可接受的載體、稀釋劑或賦形劑。
26. 一種編碼根據申請專利範圍第 1 至 24 項中任一項所述的 PCSK9 抗體或其抗原結合片段的 DNA 分子。
27. 一種含有根據申請專利範圍第 26 項所述的 DNA 分子的表達載體。

28. 一種用根據申請專利範圍第 27 項所述的表達載體轉化的宿主細胞，該宿主細胞選自原核細胞和真核細胞。
29. 如申請專利範圍第 28 項所述的表達載體轉化的宿主細胞，該宿主細胞為真核細胞。
30. 如申請專利範圍第 28 項所述的表達載體轉化的宿主細胞，該宿主細胞為哺乳動物細胞。
31. 一種申請專利範圍第 1 至 24 項中任一項所述的 PCSK9 抗體或其抗原結合片段、或申請專利範圍第 28 項所述的醫藥組成物，在製備用於治療 PCSK9 介導的疾病或病症的藥物中的用途。
32. 如申請專利範圍第 31 項所述的用途，其中，該疾病或病症為膽固醇相關疾病。
33. 如申請專利範圍第 31 項所述的用途，其中，該疾病或病症為高膽固醇血症、心臟病、代謝綜合症、糖尿病、冠狀動脈心臟病、中風、心血管疾病、阿爾茨海默病和一般性的異常脂血症。
34. 如申請專利範圍第 31 項所述的用途，其中，該疾病或病症為高膽固醇血症、異常脂血症、動脈粥樣硬化、CVD 或冠狀動脈心臟病。

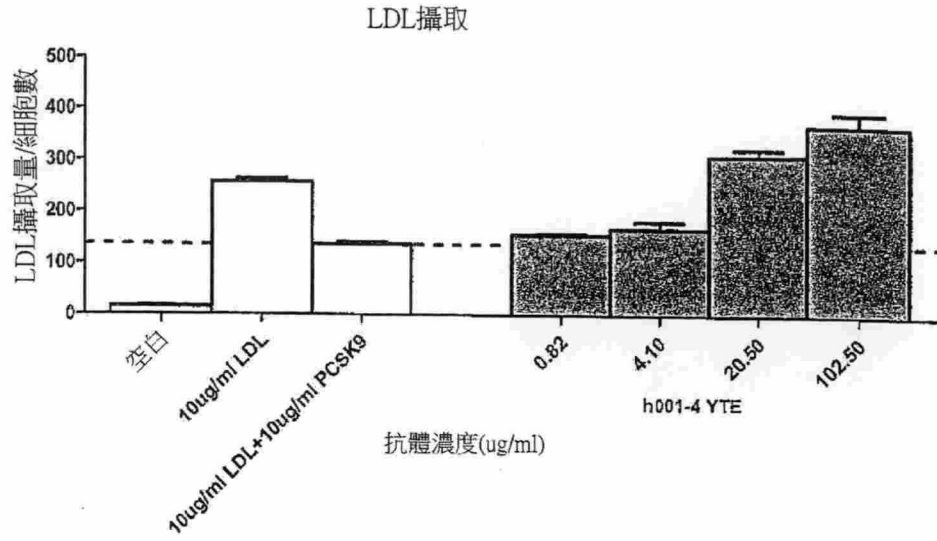
圖式



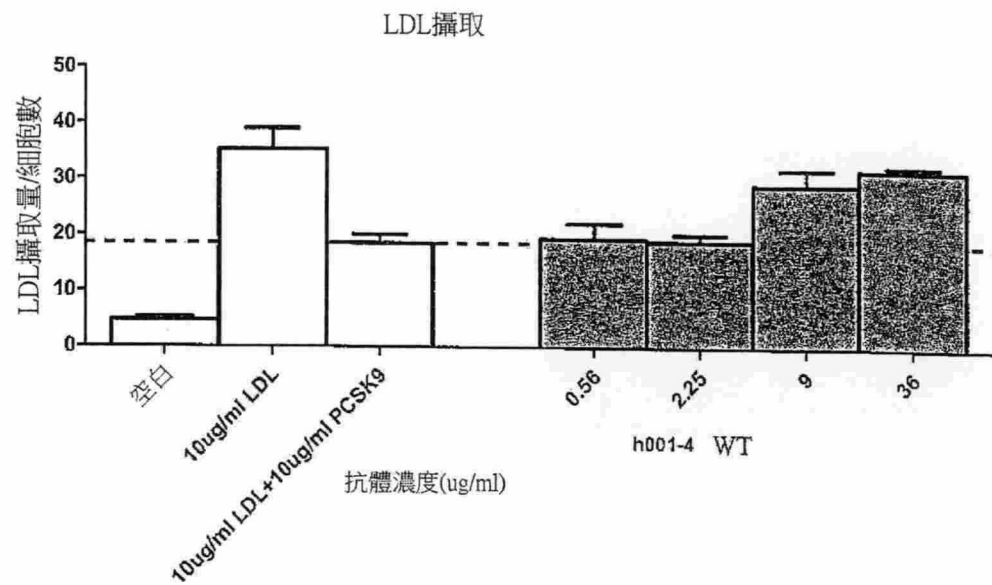
第1圖



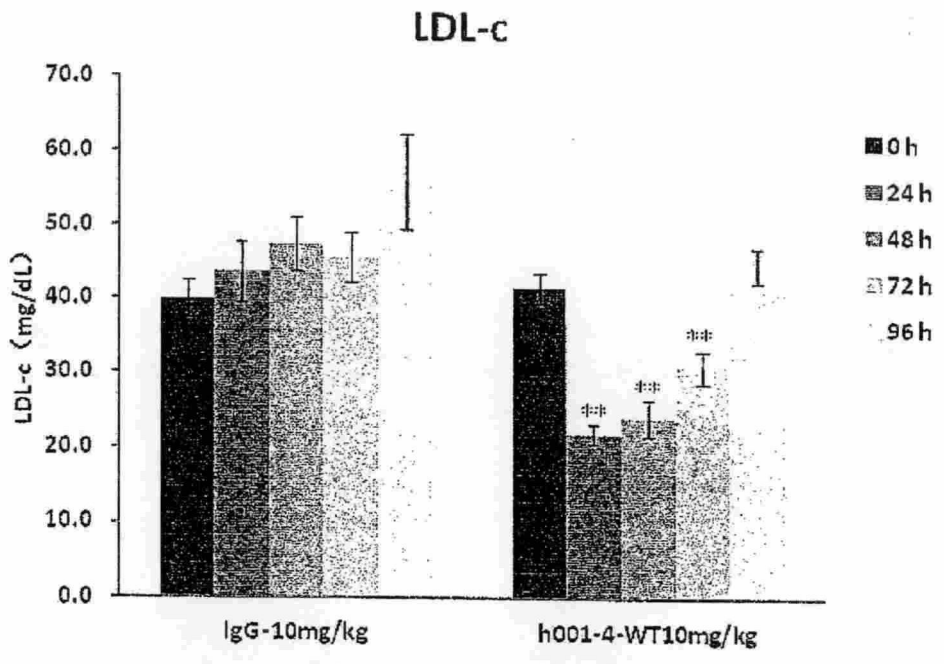
第2圖



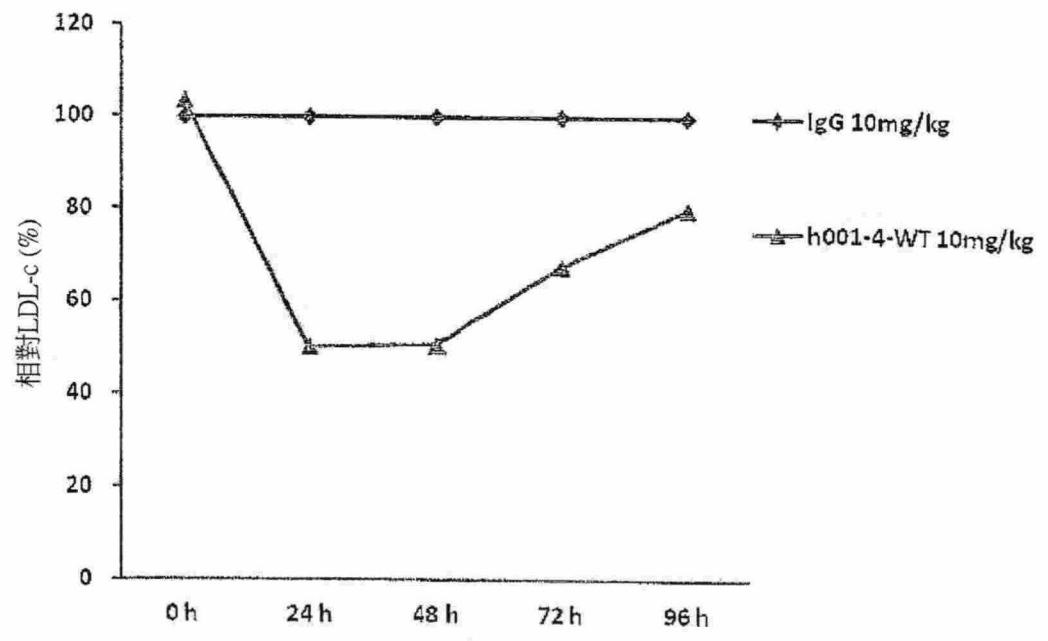
第3圖



第4圖

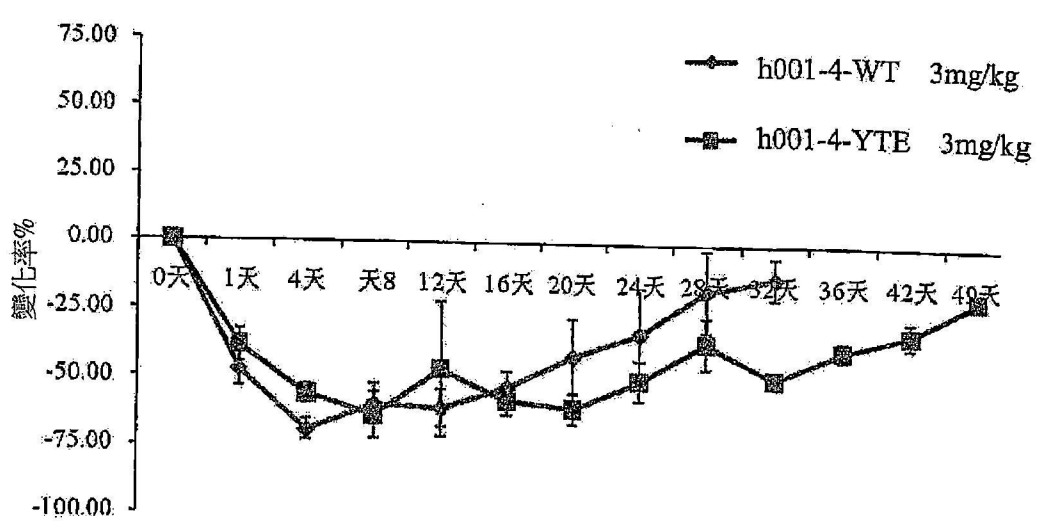


第5圖



第6圖

血清中LDL



第7圖