



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105348390 A

(43) 申请公布日 2016. 02. 24

(21) 申请号 201510697260. 3

(22) 申请日 2015. 10. 26

(71) 申请人 北京智仁美博生物科技有限公司
地址 100176 北京市大兴区亦庄科创六街
88 号 A3-501

(72) 发明人 刘志刚 刘玉兰 郭晶晶 郝小勃

(51) Int. Cl.

C07K 16/40(2006. 01)

A61K 39/395(2006. 01)

A61P 3/06(2006. 01)

权利要求书1页 说明书6页
序列表23页 附图3页

(54) 发明名称

抗人 PCSK9 单克隆抗体

(57) 摘要

本发明公开了一种利用噬菌体抗体库技术筛选并利用基因工程方法制备的新型抗人 PCSK9 的单克隆抗体或其片段,其特征在于对人 PCSK9 具有高亲和力。本发明抗体可以是全长抗体、基本上完整的抗体、Fab 片段、F(ab')₂片段或单链 Fv 片段。该单克隆抗体或其片段用于治疗由人 PCSK9 介导的疾病中的用途,所述的疾病包括但不限于原发性高胆固醇血症、混合型高脂血症和家族性高胆固醇血症。

1. 一种特异性结合人 PCSK9 的单克隆抗体,其包含含 HCDR1、HCDR2、和 HCDR3 序列的重链可变区,其特征在于:所述 HCDR1 序列为 GY X1X2X3 NY;所述 HCDR2 序列为 SFYNGN;所述 HCDR3 序列为 GYVMD X4;其中 X1X2X3 序列为 AIY、TLN 或者 ALY;X4 为 I 或者 F;而且其中 HCDRs 序列根据 Chothia 定义。

2. 根据权利要求 1 所述的单克隆抗体,其特征在于,所述抗体的重链可变区序列如 SEQ ID NO:16、17、18 或 19 所示的氨基酸序列。

3. 一种特异性结合人 PCSK9 的单克隆抗体,其包含含 LCDR1、LCDR2、和 LCDR3 序列的轻链可变区,其特征在于:所述 LCDR1 序列为 RASQSINNWLD;所述 LCDR2 序列为 AASTRPS;所述 LCDR3 序列为 QQDQDIPPT;而且其中 LCDRs 定义根据 Chothia 定义。

4. 根据权利要求 3 所述的单克隆抗体,其特征在于,所述抗体的轻链可变区序列如 SEQ ID NO:20 的氨基酸序列。

5. 一种特异性结合 PCSK9 的单克隆抗体,其包含含 HCDR1、HCDR2、和 HCDR3 序列的重链可变区及含 LCDR1、LCDR2、和 LCDR3 序列的轻链可变区,其特征在于:所述 HCDR1 序列为 GY X1X2X3 NY;所述 HCDR2 序列为 SFYNGN;所述 HCDR3 序列为 GYVMD X4;所述 LCDR1 序列为 RASQSINNWLD;所述 LCDR2 序列为 AASTRPS;所述 LCDR3 序列为 QQDQDIPPT;其中 X1X2X3 序列为 AIY、TLN 或者 ALY;X4 为 I 或者 F;而且其中 HCDRs 和 LCDRs 序列根据 Chothia 定义。

6. 根据权利要求 5 所述的单克隆抗体,所述抗体的重链可变区序列为 SEQ ID NO:16,轻链可变区序列为 SEQ ID NO:20;或重链可变区序列为 SEQ ID NO:17,轻链可变区序列为 SEQ ID NO:20;或重链可变区序列为 SEQ ID NO:18,轻链可变区序列为 SEQ ID NO:20;或重链可变区序列为 SEQ ID NO:19,轻链可变区序列为 SEQ ID NO:20。

7. 根据权利要求 1 至 6 所述的任何一项的抗体,其中所述抗体为全长抗体、基本上完整的抗体、Fab 片段、F(ab')₂ 片段或单链 Fv 片段。

8. 根据权利要求 7 所述的单克隆抗体,其特征在于,所述的抗体是全人源抗体。

9. 根据权利要求 1 至 6 所述的任何一项的抗体,其中所述抗体还包含选自 IgG1、IgG2 或 IgG4 亚型的重链恒定区和包含选自 kappa 或 Lambda 亚型的轻链恒定区。

10. 根据权利要求 1 至 6 所述的任何一项的抗体,其用作药物。

11. 权利要求 1-6 中任一项的单克隆抗体在治疗由人 PCSK9 介导的高胆固醇血症中的用途。

12. 根据权利要求 10 所述的用途,其特征在于,所述的高胆固醇血症为原发性高胆固醇血症、混合型高脂血症和家族性高胆固醇血症。

抗人 PCSK9 单克隆抗体

技术领域

[0001] 本发明为基因工程抗体药物领域,特别是抗人 PCSK9 的单克隆抗体领域。本发明涉及人源性功能性抗人 PCSK9 单克隆抗体,以及这类抗体在治疗人 PCSK9 介导的疾病中的用途。

背景技术

[0002] 心血管疾病是目前我国首位的死亡原因,其中动脉粥样硬化引起的心脏病、脑卒中和外周动脉疾病是导致死亡的主要原因,而低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)水平升高是动脉粥样硬化性心血管疾病最大的危险因素。他汀类药物是目前降低 LDL-C 最有效的药物,但是仍有部分患者的血脂水平未能达标,以及有些患者不能耐受他汀类药物。因此,需要寻找他汀以外的强效降胆固醇药物,以降低动脉粥样硬化性心血管疾病的风险。

[0003] 前蛋白枯草溶菌素转化酶 9 (proprotein convertase subtilisin kexin 9, PCSK9),又称为神经凋亡调节转化酶 1 (neural apoptosis-regulated convertase 1, NARC-1)。PCSK9 蛋白主要在肝脏中合成和分泌,PCSK9 蛋白进入血液循环后,在肝脏与低密度脂蛋白受体(the low-density lipoprotein receptor, LDLR)结合,介导 LDLR 降解,从而降低肝脏对 LDL-C 的清除能力,升高血浆 LDL-C 水平。PCSK9 基因敲除的小鼠表现出血浆胆固醇水平大约降低 50%,而且使他汀类药物降低血浆胆固醇的灵敏度变高(Rashid S, et al 2005, Proc Natl Acad Sci 102:5374-5379)。

[0004] 抗 PCSK9 单克隆抗体可有效阻止 PCSK9 与 LDL-R 结合,从而发挥强效降胆固醇的作用,可用于他汀治疗未达标或他汀不耐受的高胆固醇血症的患者。

[0005] 目前安进研发的 PCSK9 抑制剂 Repatha (Evolocumab)和赛诺菲/再生元研发的 PCSK9 抑制剂 Praluent (Alirocumab)都已经获得欧洲和美国 FDA 的批准上市,用于治疗原发性高胆固醇血症、混合型高脂血症和家族性高胆固醇血症。但是本领域仍然需要更多适于治疗患者的改善的抗 PCSK9 抗体。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种新型抗人 PCSK9 的单克隆抗体或其片段。由本发明涉及的抗体基因可变区的序列,可构建全长的抗体分子作为药物用于临床上由人 PCSK9 介导的疾病使用。这些适应症包括但不限于下列:原发性高胆固醇血症、混合型高脂血症和家族性高胆固醇血症。

[0007] 本发明从先前构建的大容量天然人源噬菌体抗体库(抗人 IL-17 单克隆抗体,专利申请号 201510097117.0)中筛选并优化得到了全人源抗 PCSK9 单克隆抗体。

[0008] 本发明的抗体为全人源的单克隆抗体,拮抗至少一种与 PCSK9 或其部分相关的体外或体内生物活性。

[0009] 在一个实施例中,本发明抗体的特征在于能够有效抑制 PCSK9 结合重组人 LDLR 胞外区 EGF-AB 结构域。

[0010] 在一个实施例中,本发明抗体的特征在于对人 PCSK9 具有强结合亲和力,亲和力优于(H7B12-IgG4)或与安进公司的同类抗体 EvoLocumab 以及赛诺菲公司的同类抗体 Alirocumab 相似。

[0011] 在一个实施例中,本发明抗 PCSK9 单克隆抗体含有重链可变区多肽,该多肽含有 3 个 HCDR,其特征在於:所述 HCDR1 序列为 GY X1X2X3 NY;所述 HCDR2 序列为 SFYNGN;所述 HCDR3 序列为 GYVMD X4。其中 X1X2X3 序列为 AIY、TLN 或者 ALY;X4 为 I 或者 F。而且其中 HCDRs 序列根据 Chothia 定义。优选地,本发明抗 PCSK9 单克隆抗体包含重链可变区多肽,该多肽具有选自 SEQ ID NO :16-19 的氨基酸序列。

[0012] 在另一个实施例中,本发明抗 PCSK9 单克隆抗体含有轻链可变区多肽,该多肽含有 3 个 LCDR 序列,其特征在於:所述 LCDR1 序列为 RASQSINNWLD;所述 LCDR2 序列为 AASTRPS;所述 LCDR3 序列为 QQDQDIPPT。而且其中 LCDRs 定义根据 Chothia 定义。优选地,本发明抗 PCSK9 单克隆抗体包含轻链可变区多肽,该多肽具有选自 SEQ ID NO:20 的氨基酸序列。

[0013] 在优选的实施例中,本发明抗 PCSK9 单克隆抗体含有(i):含 HCDR1、HCDR2、和 HCDR3 序列的重链可变区,其特征在於:所述 HCDR1 序列为 GY X1X2X3 NY;所述 HCDR2 序列为 SFYNGN;所述 HCDR3 序列为 GYVMD X4;其中 X1X2X3 序列为 AIY、TLN 或者 ALY;X4 为 I 或者 F。而且其中 HCDRs 序列根据 Chothia 定义。(ii):含 LCDR1、LCDR2、和 LCDR3 序列的轻链可变区,其特征在於:所述 LCDR1 序列为 RASQSINNWLD;所述 LCDR2 序列为 AASTRPS;所述 LCDR3 序列为 QQDQDIPPT。而且其中 LCDRs 定义根据 Chothia 定义。

[0014] 在更优选的实施例中,本发明抗 PCSK9 单克隆抗体的重链可变区序列为 SEQ ID NO :16,轻链可变区序列为 SEQ ID NO :20;或重链可变区序列为 SEQ ID NO :17,轻链可变区序列为 SEQ ID NO :20;或重链可变区序列为 SEQ ID NO :18,轻链可变区序列为 SEQ ID NO :20;或重链可变区序列为 SEQ ID NO :19,轻链可变区序列为 SEQ ID NO :20。

[0015] 本发明抗 PCSK9 单克隆抗体可包含或由完整的抗体(即全长)、基本上完整的抗体或其抗原结合部分,例如 Fab 片段、F(ab')₂ 片段或单链 Fv 片段组成。

[0016] 本发明抗 PCSK9 单克隆抗体包括可变区和恒定区,其中抗体重链恒定区可以是 IgG1 亚型(Seq ID 7)、IgG2 (Seq ID 8) 或者 IgG4 亚型(Seq ID 9),轻链恒定区可以是 kappa 亚型(Seq ID 10) 或者 Lambda 亚型(seq ID 11)。

[0017] 本发明所述的单克隆抗体或其片段是全人源的。

[0018] 本发明抗体的亲和力可以在标准测试方法中进行证明。简言之,测量使用仪器 Biacore 3000,将抗人 F_c段的抗体偶联至芯片 CM5 的表面上,稀释抗体蛋白至合适浓度,保证 200RU 左右的抗体被抗人 F_c的抗体捕获。将抗体设置一系列的浓度梯度(ex. 100nm, 50nm, 25nm, 12.5nm, 6.25nm, 3.125nm, 1.5625nm, 0nm)流经固定相表面,测定各单克隆抗体的亲和力。

[0019] 在一个实施例中,分析了 6 种不同抗 PCSK9 单抗(包括 4 种本发明的单抗和 2 种对照单抗)抑制 LDLR 与 PCSK9 结合的能力,结果是均能有效抑制 LDLR 与 PCSK9 的结合。

[0020] 本发明抗体在人血清中的稳定性可以在标准测试方法中进行证明。简言之,取过滤去菌的单抗样品,分别稀释于 200u1 无菌的正常人混合血清或 PBS 至终浓度 30ug/ml,混匀后置 37° C 水浴放置 12 天(288 小时)。12 天后,利用 ELISA 分析血清样品(A: Ab/

normal human serum), PBS 样品 (B: Ab/PBS) 和冻存的单抗样品 (C: Ab) 与 huPCSK9 的结合, 并分别比较各单抗样品结合 huPCSK9 能力的变化 (A/C)。结果表明本发明中的四株抗 huPCSK9 单抗具有好的血清稳定性。

[0021] 本发明抗体的抑制 PCSK9 诱导细胞表面 LDLR 下调的活性可以在标准测试方法中进行证明。简言之, 将 HEK293 细胞密度调整至 8×10^5 cells/ml, 接种于 24 孔板 (500ul/孔)。然后在细胞中加入抗体和 PCSK9, 悬浮培养 3h。然后分别收集各孔中细胞, 用 1%BSA-PBS 洗涤 2 次, 然后与 FITC-anti-LDLR 单抗 (Sino Biological Inc. Cat# 10231-R301-F) 于冰上孵育 45 分钟, 用 PBS 洗涤 2 次后, 用 BD 公司的 Accuri C6 流式细胞仪分析 FITC 信号。以未处理的 HEK293 细胞为对照, 比较各种处理后细胞表面 LDLR 的水平。结果显示本发明的抗 PCSK9 单抗 (20ug/ml) 能够明显抑制 PCSK9 诱导的 LDLR 水平下调。

[0022] 本发明抗体抑制 PCSK9 诱导细胞摄取 LDL-C 能力的活性可以在标准测试方法中进行证明。简言之, 将 HEK293 细胞密度调整至 8×10^5 cells/ml, 接种于 24 孔板 (500ul/孔)。然后在细胞中加入 PCSK9 和抗体, 悬浮培养 2.5h。然后再分别在每个孔中补加 BODIPY FL LDL (Invitrogen, Cat#:L3483) 至终浓度 6ug/ml, 继续悬浮培养 2.5h。然后分别收集各孔中细胞, 用 PBS 洗涤 2 次后, 用 BD 公司的 Accuri C6 流式细胞仪分析 BODIPY 信号 (激发波长 488nm, 发射波长 520)。以未处理的 HEK293 细胞为对照, 比较各种处理后细胞摄取 LDL-C 的水平。结果显示本发明的多种抗 PCSK9 单抗 (20ug/ml) 能够明显抑制 PCSK9 诱导的 HEK293 细胞摄取 LDL-C 水平的下调。

[0023]

附图说明

[0024] 图 1: 单抗抑制 PCSK9 结合人 LDLR 胞外区 EGF-AB 结构域。

[0025] 图 2: 抗人 PCSK9 单克隆抗体竞争 LDLR 结合人 PCSK9。

[0026] 图 3: 不同抗 huPCSK9 单抗在在血清中的稳定性分析。

[0027] 图 4: 抗 PCSK9 单抗抑制 PCSK9 诱导的 HEK293 细胞表面的 LDLR 下调 (其中 anti-IL17 为一株抗 IL17 的单抗; Aliro 为抗 PCSK9 的对照单抗 Alirocumab; Evolo 为抗 PCSK9 的对照抗体 Evolocumab; H4H4, H7B12, H8A7, H8F4 为四株抗 PCSK9 的单抗)。

[0028] 图 5: 抗 PCSK9 单抗抑制 PCSK9 诱导的 HEK293 细胞摄取 LDL-C 能力的下调 (其中 anti-IL17 为一株抗 IL17 的单抗; Aliro 为抗 PCSK9 的对照单抗 Alirocumab; Evolo 为抗 PCSK9 的对照抗体 Evolocumab; H4H4, H7B12, H8A7, H8F4 为四株抗 PCSK9 的单抗)。

[0029]

具体实施方式

[0030] 以下实施例仅仅对本发明进行进一步的说明, 不应理解为对本发明的限制。

[0031] 实施例 1: 各种重组蛋白的制备。

[0032] 制备抗 PCSK9 单抗的过程中需要用到多种不同的重组蛋白, 包括人 PCSK9 (huPCSK9, Seq ID No:1), 小鼠 PCSK9 (moPCSK9, Seq ID No:2) 和猕猴 PCSK9 (mmPCSK9, Seq ID No:3), 人 LDLR 胞外区 (EGF-AB, Seq ID No:4), 以及重组抗体。而这些蛋白都有大量的翻译后修饰 (如: 糖基化或二硫键等), 因而利用哺乳动物细胞表达系统将更有利

于保持重组蛋白的结构和功能。此外,为了方便纯化,非抗体类的重组蛋白在C端添加了His-tag (Seq ID No:5)或者鼠抗体的Fc段 (mFc, Seq ID No:6)。重组抗体制备时,抗体重链恒定区可以是IgG1亚型(Seq ID No:7),IgG2亚型(Seq ID No:8)或者IgG4亚型(Seq ID No:9),轻链恒定区可以是kappa亚型(Seq ID No:10)或者Lambda亚型(Seq ID No:11)。

[0033] 根据Uniprot数据库的各种目的重组蛋白的氨基酸序列,设计并合成上述各种重组蛋白的基因(包含His-tag或者mFc编码基因)。利用常规的分子生物学技术将合成的各种重组蛋白基因克隆至合适的真核表达载体(如invitrogen公司的pcDNA3.1等),然后利用脂质体(如invitrogen公司的293fectin等)或其它转染试剂(如PEI等)将制备的重组蛋白表达质粒转染入HEK293细胞(如invitrogen公司的HEK293F),在无血清悬浮培养条件下培养3-4天。然后通过离心等方式收获培养上清。

[0034] His-tag融合表达的重组蛋白利用金属螯合亲和层析柱(如GE公司的HisTrap FF等)对培养上清中的重组蛋白进行一步纯化。而mFc融合表达的重组蛋白和重组抗体用ProteinA/G亲和层析柱(如GE公司的Mabselect SURE等)进行一步纯化。然后利用脱盐柱(如GE公司的Hitrap desalting等)将重组蛋白保存缓冲液置换为PBS(pH7.0)或者其它合适的缓冲液。必要时,可以对抗体样品进行过滤除菌,然后分装保存于-20°C。

[0035] 实施例2:利用噬菌体呈现抗体库技术筛选和优化抗人PCSK9单抗。

[0036] 以制备的重组huPCSK9-his(以下简称为PCSK9-His)为抗原,参照文献(抗人IL-17单克隆抗体,专利申请号201510097117.0),利用固相筛选策略筛选呈现人单链抗体库的噬菌体,获得多株序列不同但特异性结合人PCSK9的人抗体,包括克隆:S2B8(Seq ID No:12),S2F5(Seq ID No:13),S2G1(Seq ID No:14),S3A12(Seq ID No:15)。其中重组全抗体S3A12能够有效抑制PCSK9结合重组人LDLR胞外区EGF-AB结构域(图1)。

[0037] 然后参照文献(抗人IL-17单克隆抗体,专利申请号201510097117.0)利用轻链置换和重链CDRs突变的策略对抗体进行体外亲和力成熟,最终获得四株亲和力提高的抗人PCSK9的单抗,具体序列信息见表1。

[0038] 表1:亲和力成熟的抗人PCSK9的单抗。

单抗	H4H4	H7B12	H8A7	H8F4
重链(序列号)	H4H4 (seqID 16)	H7B12 (seqID 17)	H8A7 (seqID 18)	H8F4 (seqID 19)
轻链(序列号)	L3A8 (seqID 20)	L3A8 (seqID 20)	L3A8 (seqID 20)	L3A8 (seqID 20)

[0039] 实施例3:BIacore 3000测定全抗体的亲和力。

[0040] Amine coupling kit和human antibody capture kit以及CM5芯片和pH7.4的10×HBS-EP均购自GE Healthcare。

[0041] 根据试剂盒中的说明书,将抗人Fc段的抗体偶联至芯片CM5的表面上,稀释抗体蛋白至合适浓度,保证200RU左右的抗体被抗人Fc的抗体捕获。将huPCSK9设置一系列的浓度梯度(ex. 100nm,50nm,25nm,12.5nm,6.25nm,3.125nm,1.5625nm,0nm)流经固定相表面,测定各单克隆抗体的亲和力,用同样的方法测定Evolocumab(Seq ID No:21, Seq ID No:22)和Alirocumab(Seq ID No:23,Seq ID No:24)的亲和力作为对照。结果如表2所示。

[0042] 表2.anti-huPCSK9 mAbs亲和力常数测定数值。

Antibody	Kon (1/MS)	Koff(1/S)	KD
H4H4-IgG4	7.14E+05	4.70E-05	65.9pM
H7B12-IgG4	1.01E+06	3.26E-05	32.3pM
H8F4-IgG4	6.63E+05	4.48E-05	67.5pM
H8A7-IgG4	7.46E+05	4.83E-05	64.8pM
Evolocumab-IgG4	2.28E+05	1.93E-05	76.4pM
Alirocumab	2.27E+06	1.54E-04	67.7pM

[0043] 实施例 4:抗人 PCSK9单克隆抗体竞争 PCSK9受体 LDLR结合 PCSK9。

[0044] 功能性的抗 PCSK9 单抗应该能在蛋白水平上阻断 LDLR 和 PCSK9 之间的结合,本实施例分析了 6 种不同抗 PCSK9 单抗(H4H4, H7B12, H8A7, H8F4, Evolocumab 和 Alirocumab)抑制 LDLR 与 PCSK9 结合的能力。

[0045] 用 5.6ug/ml 的 PCSK9-his 对各单克隆抗体进行梯度稀释,共 11 个稀释浓度,前 6 个梯度 1:1 稀释,后 5 个梯度 1:2 稀释,各抗体起始浓度调整为 30ug/ml。利用 HRP-mouse-anti-his IgG 单抗检测 LDLR 与 PCSK9 的结合信号,然后利用 GraphPad Prism 6 进行数据分析和作图(图 2)。

[0046] 实施例 5:抗 PCSK9单抗在人血清中的稳定性分析。

[0047] 为了初步分析不同抗 PCSK9 单抗分子的特异性及血清稳定性,进行了抗 PCSK9 单抗在人血清中的稳定性分析。此研究包括 6 种不同抗 PCSK9 单抗,分别为 H4H4, H7B12, H8A7, H8F4, Evolocumab 和 Alirocumab。取过滤去菌的单抗样品,分别稀释于 200u1 无菌的正常人混合血清或 PBS 至终浓度 30ug/ml,混匀后置 37°C 水浴放置 12 天(288 小时)。12 天后,利用 ELISA 分析血清样品(A: Ab/normal human serum),PBS 样品(B: Ab/PBS)和冻存的单抗样品(C: Ab)与 huPCSK9 的结合(图 3),并分别比较各单抗样品结合 huPCSK9 能力的变化(A/C)。结果(表 3)表明本发明中的四株抗 huPCSK9 单抗具有好的血清稳定性。

[0048]

表 3:不同处理条件下单抗样品结合 huPCSK9 能力的变化。

Anti-PCSK9 mAb	Evolocumab IgG4	H4H4 IgG4	H7B12 IgG4	H8A7 IgG4	H8F4 IgG4	Alirocumab IgG4
A/C	0.437	0.642	0.607	0.600	0.535	0.868

[0049] 实施例 6:抗 PCSK9单抗抑制 PCSK9诱导 HEK293细胞表面 LDLR受体的下调。

[0050] 本实施例研究用悬浮培养于 293 Freestyle 培养基(Invitrogen)的 HEK293 细胞。将 HEK293 细胞密度调整至 8×10^5 cells/ml,接种于 24 孔板(500u1/孔)。然后按照表 4 所列方式处理细胞,悬浮培养 3h。然后分别收集各孔中细胞,用 1%BSA-PBS 洗涤 2 次,然后与 FITC-anti-LDLR 单抗(Sino Biological Inc. Cat# 10231-R301-F)于冰上孵育 45 分钟,用 PBS 洗涤 2 次后,用 BD 公司的 Accuri C6 流式细胞仪分析 FITC 信号。以未处理的 HEK293 细胞为对照,比较各种处理后细胞表面 LDLR 的水平。结果(图 4)显示:10ug/ml 的 PCSK9 处理 HEK293 细胞后导致细胞表明 LDLR 水平明显下降,而多种抗 PCSK9 单抗(20ug/ml)能够明显抑制 PCSK9 诱导的 LDLR 水平下调。

[0051] 表 4:HEK293 细胞的不同处理方式。

	untreat	PCSK9	PCSK9+Anti-IL17	PCSK9+Aliro	PCSK9+Evoloc	PCSK9+H4H4	PCSK9+H7B12	PCSK9+H8A7	PCSK9+H8F4
PCSK9 (10ug/ml)	-	+	+	+	+	+	+	+	+
mAB (20ug/ml)	-	-	Anti-IL17	Alirocumab	Evolocumab	H4H4	H7B12	H8A7	H8F4

[0052] 实施例 7:抗 PCSK9 单抗抑制 PCSK9 诱导 HEK293 细胞摄取 LDL-C 能力的下调。

[0053] 本实施例研究用悬浮培养于 293Freestyle 培养基 (Invitrogen) 的 HEK293 细胞。将 HEK293 细胞密度调整至 8×10^5 cells/ml, 接种于 24 孔板 (500u1/孔)。然后按照表 5 所列方式处理细胞, 悬浮培养 2.5h。然后再分别在每个孔中补加 BODIPY FL LDL (Invitrogen, Cat#:L3483) 至终浓度 6ug/ml, 继续悬浮培养 2.5h。然后分别收集各孔中细胞, 用 PBS 洗涤 2 次后, 用 BD 公司的 Accuri C6 流式细胞仪分析 BODIPY 信号 (激发波长 488nm, 发射波长 520)。以未处理的 HEK293 细胞为对照, 比较各种处理后细胞摄取 LDL-C 的水平。结果 (图 5) 显示: 10ug/ml 的 PCSK9 处理 HEK293 细胞后导致细胞摄取 LDL-C 量明显下降, 而多种抗 PCSK9 单抗 (20ug/ml) 能够明显抑制 PCSK9 诱导的 HEK293 细胞摄取 LDL-C 水平的下调。

[0054]

表 5: HEK293 细胞的不同处理方式。

	untreat	PCSK9	PCSK9+Anti-IL17	PCSK9+Aliro	PCSK9+Evoloc	PCSK9+H4H4	PCSK9+H7B12	PCSK9+H8A7	PCSK9+H8F4
PCSK9 (10ug/ml)	-	+	+	+	+	+	+	+	+
mAB (20ug/ml)	-	-	Anti-IL17	Alirocumab	Evolocumab	H4H4	H7B12	H8A7	H8F4
LDL-BODIPY (6ug/ml)	+	+	+	+	+	+	+	+	+

210	215	220
Gln Pro Val Gly Pro Leu Val Val Leu Leu Pro Leu Ala Gly Gly Tyr		
225	230	235
Ser Arg Val Leu Asn Ala Ala Cys Gln Arg Leu Ala Arg Ala Gly Val		
	245	250
Val Leu Val Thr Ala Ala Gly Asn Phe Arg Asp Asp Ala Cys Leu Tyr		
	260	265
Ser Pro Ala Ser Ala Pro Glu Val Ile Thr Val Gly Ala Thr Asn Ala		
	275	280
Gln Asp Gln Pro Val Thr Leu Gly Thr Leu Gly Thr Asn Phe Gly Arg		
290	295	300
Cys Val Asp Leu Phe Ala Pro Gly Glu Asp Ile Ile Gly Ala Ser Ser		
305	310	315
Asp Cys Ser Thr Cys Phe Val Ser Gln Ser Gly Thr Ser Gln Ala Ala		
	325	330
Ala His Val Ala Gly Ile Ala Ala Met Met Leu Ser Ala Glu Pro Glu		
	340	345
Leu Thr Leu Ala Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ile His Phe Ser Ala Lys		
	355	360
Asp Val Ile Asn Glu Ala Trp Phe Pro Glu Asp Gln Arg Val Leu Thr		
370	375	380
Pro Asn Leu Val Ala Ala Leu Pro Pro Ser Thr His Gly Ala Gly Trp		
385	390	395
Gln Leu Phe Cys Arg Thr Val Trp Ser Ala His Ser Gly Pro Thr Arg		
	405	410
Met Ala Thr Ala Ile Ala Arg Cys Ala Pro Asp Glu Glu Leu Leu Ser		
	420	425
Cys Ser Ser Phe Ser Arg Ser Gly Lys Arg Arg Gly Glu Arg Met Glu		
	435	440
Ala Gln Gly Gly Lys Leu Val Cys Arg Ala His Asn Ala Phe Gly Gly		
	450	455
Glu Gly Val Tyr Ala Ile Ala Arg Cys Cys Leu Leu Pro Gln Ala Asn		
465	470	475
Cys Ser Val His Thr Ala Pro Pro Ala Glu Ala Ser Met Gly Thr Arg		
	485	490
Val His Cys His Gln Gln Gly His Val Leu Thr Gly Cys Ser Ser His		
	500	505
Trp Glu Val Glu Asp Leu Gly Thr His Lys Pro Pro Val Leu Arg Pro		
	515	520
		525

Arg Gly Gln Pro Asn Gln Cys Val Gly His Arg Glu Ala Ser Ile His
 530 535 540
 Ala Ser Cys Cys His Ala Pro Gly Leu Glu Cys Lys Val Lys Glu His
 545 550 555 560
 Gly Ile Pro Ala Pro Gln Glu Gln Val Thr Val Ala Cys Glu Glu Gly
 565 570 575
 Trp Thr Leu Thr Gly Cys Ser Ala Leu Pro Gly Thr Ser His Val Leu
 580 585 590
 Gly Ala Tyr Ala Val Asp Asn Thr Cys Val Val Arg Ser Arg Asp Val
 595 600 605
 Ser Thr Thr Gly Ser Thr Ser Glu Glu Ala Val Thr Ala Val Ala Ile
 610 615 620
 Cys Cys Arg Ser Arg His Leu Ala Gln Ala Ser Gln Glu Leu Gln
 625 630 635
 <210>2
 <211>660
 <212>PRT
 <213> 小鼠 (Mus musculus)
 <220>
 <223>mopcsk9
 <400>2
 Gln Asp Glu Asp Gly Asp Tyr Glu Glu Leu Met Leu Ala Leu Pro Ser
 1 5 10 15
 Gln Glu Asp Gly Leu Ala Asp Glu Ala Ala His Val Ala Thr Ala Thr
 20 25 30
 Phe Arg Arg Cys Ser Lys Glu Ala Trp Arg Leu Pro Gly Thr Tyr Ile
 35 40 45
 Val Val Leu Met Glu Glu Thr Gln Arg Leu Gln Ile Glu Gln Thr Ala
 50 55 60
 His Arg Leu Gln Thr Arg Ala Ala Arg Arg Gly Tyr Val Ile Lys Val
 65 70 75 80
 Leu His Ile Phe Tyr Asp Leu Phe Pro Gly Phe Leu Val Lys Met Ser
 85 90 95
 Ser Asp Leu Leu Gly Leu Ala Leu Lys Leu Pro His Val Glu Tyr Ile
 100 105 110
 Glu Glu Asp Ser Phe Val Phe Ala Gln Ser Ile Pro Trp Asn Leu Glu
 115 120 125
 Arg Ile Ile Pro Ala Trp His Gln Thr Glu Glu Asp Arg Ser Pro Asp
 130 135 140

Gly Ser Ser Gln Val Glu Val Tyr Leu Leu Asp Thr Ser Ile Gln Gly
 145 150 155 160
 Ala His Arg Glu Ile Glu Gly Arg Val Thr Ile Thr Asp Phe Asn Ser
 165 170 175
 Val Pro Glu Glu Asp Gly Thr Arg Phe His Arg Gln Ala Ser Lys Cys
 180 185 190
 Asp Ser His Gly Thr His Leu Ala Gly Val Val Ser Gly Arg Asp Ala
 195 200 205
 Gly Val Ala Lys Gly Thr Ser Leu His Ser Leu Arg Val Leu Asn Cys
 210 215 220
 Gln Gly Lys Gly Thr Val Ser Gly Thr Leu Ile Gly Leu Glu Phe Ile
 225 230 235 240
 Arg Lys Ser Gln Leu Ile Gln Pro Ser Gly Pro Leu Val Val Leu Leu
 245 250 255
 Pro Leu Ala Gly Gly Tyr Ser Arg Ile Leu Asn Ala Ala Cys Arg His
 260 265 270
 Leu Ala Arg Thr Gly Val Val Leu Val Ala Ala Ala Gly Asn Phe Arg
 275 280 285
 Asp Asp Ala Cys Leu Tyr Ser Pro Ala Ser Ala Pro Glu Val Ile Thr
 290 295 300
 Val Gly Ala Thr Asn Ala Gln Asp Gln Pro Val Thr Leu Gly Thr Leu
 305 310 315 320
 Gly Thr Asn Phe Gly Arg Cys Val Asp Leu Phe Ala Pro Gly Lys Asp
 325 330 335
 Ile Ile Gly Ala Ser Ser Asp Cys Ser Thr Cys Phe Met Ser Gln Ser
 340 345 350
 Gly Thr Ser Gln Ala Ala Ala His Val Ala Gly Ile Val Ala Arg Met
 355 360 365
 Leu Ser Arg Glu Pro Thr Leu Thr Leu Ala Glu Leu Arg Gln Arg Leu
 370 375 380
 Ile His Phe Ser Thr Lys Asp Val Ile Asn Met Ala Trp Phe Pro Glu
 385 390 395 400
 Asp Gln Gln Val Leu Thr Pro Asn Leu Val Ala Thr Leu Pro Pro Ser
 405 410 415
 Thr His Glu Thr Gly Gly Gln Leu Leu Cys Arg Thr Val Trp Ser Ala
 420 425 430
 His Ser Gly Pro Thr Arg Thr Ala Thr Ala Thr Ala Arg Cys Ala Pro
 435 440 445
 Glu Glu Glu Leu Leu Ser Cys Ser Ser Phe Ser Arg Ser Gly Arg Arg

Leu Thr Leu Ala Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ile His Phe Ser Ala Lys
 355 360 365
 Asp Val Ile Asn Glu Ala Trp Phe Pro Glu Asp Gln Arg Val Leu Thr
 370 375 380
 Pro Asn Leu Val Ala Ala Leu Pro Pro Ser Thr His Arg Ala Gly Trp
 385 390 395 400
 Gln Leu Phe Cys Arg Thr Val Trp Ser Ala His Ser Gly Pro Thr Arg
 405 410 415
 Met Ala Thr Ala Val Ala Arg Cys Ala Gln Asp Glu Glu Leu Leu Ser
 420 425 430
 Cys Ser Ser Phe Ser Arg Ser Gly Lys Arg Arg Gly Glu Arg Ile Glu
 435 440 445
 Ala Gln Gly Gly Lys Arg Val Cys Arg Ala His Asn Ala Phe Gly Gly
 450 455 460
 Glu Gly Val Tyr Ala Ile Ala Arg Cys Cys Leu Leu Pro Gln Val Asn
 465 470 475 480
 Cys Ser Val His Thr Ala Pro Pro Ala Gly Ala Ser Met Gly Thr Arg
 485 490 495
 Val His Cys His Gln Gln Gly His Val Leu Thr Gly Cys Ser Ser His
 500 505 510
 Trp Glu Val Glu Asp Leu Gly Thr His Lys Pro Pro Val Leu Arg Pro
 515 520 525
 Arg Gly Gln Pro Asn Gln Cys Val Gly His Arg Glu Ala Ser Ile His
 530 535 540
 Ala Ser Cys Cys His Ala Pro Gly Leu Glu Cys Lys Val Lys Glu His
 545 550 555 560
 Gly Ile Pro Ala Pro Gln Glu Gln Val Ile Val Ala Cys Glu Asp Gly
 565 570 575
 Trp Thr Leu Thr Gly Cys Ser Pro Leu Pro Gly Thr Ser His Val Leu
 580 585 590
 Gly Ala Tyr Ala Val Asp Asn Thr Cys Val Val Arg Ser Arg Asp Val
 595 600 605
 Ser Thr Thr Gly Ser Thr Ser Lys Glu Ala Val Ala Ala Val Ala Ile
 610 615 620
 Cys Cys Arg Ser Arg His Leu Val Gln Ala Ser Gln Glu Leu Gln
 625 630 635

<210>4

<211>120

<212>PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<220>

<223>LDLR-EGFAB

<400>4

Thr Leu Cys Glu Gly Pro Asn Lys Phe Lys Cys His Ser Gly Glu Cys

1 5 10 15

Ile Thr Leu Asp Lys Val Cys Asn Met Ala Arg Asp Cys Arg Asp Trp

20 25 30

Ser Asp Glu Pro Ile Lys Glu Cys Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp Asn

35 40 45

Asn Gly Gly Cys Ser His Val Cys Asn Asp Leu Lys Ile Gly Tyr Glu

50 55 60

Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Glu

65 70 75 80

Asp Ile Asp Glu Cys Gln Asp Pro Asp Thr Cys Ser Gln Leu Cys Val

85 90 95

Asn Leu Glu Gly Gly Tyr Lys Cys Gln Cys Glu Glu Gly Phe Gln Leu

100 105 110

Asp Pro His Thr Lys Ala Cys Lys

115 120

<210>5

<211>11

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>his 标签

<400>5

Ala Ser Gly Ala Ala His His His His His His

1 5 10

<210>6

<211>234

<212>PRT

<213> 小鼠(Mus musculus)

<220>

<223>mFc 标签

<400>6

Ala Ser Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys

1 5 10 15

Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro

35	40	45	
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser			
50	55	60	
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr			
65	70	75	80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys			
85	90	95	
Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys			
100	105	110	
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro			
115	120	125	
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys			
130	135	140	
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp			
145	150	155	160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu			
165	170	175	
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu			
180	185	190	
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn			
195	200	205	
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly			
210	215	220	
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu			
225	230	235	240
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr			
245	250	255	
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn			
260	265	270	
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe			
275	280	285	
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn			
290	295	300	
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr			
305	310	315	320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
325	330		

<210>8

<211>326

<212>PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<220>

<223>IgG2-C

<400>8

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 115 120 125
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 130 135 140
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 145 150 155 160
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
 165 170 175
 Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
 180 185 190
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
 195 200 205
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 210 215 220
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 225 230 235 240
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 245 250 255
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 260 265 270

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 275 280 285
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 290 295 300
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 305 310 315 320
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325

<210>9

<211>327

<212>PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<220>

<223>IgG4-C

<400>9

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140
 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205
 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320
 Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 325

<210>10

<211>107

<212>PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<220>

<223>kappa 亚型轻链恒定区

<400>10

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

<210>11

<211>105

<212>PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<220>

<223>lambda 亚型轻链恒定区

<400>11

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

<210>12

<211>245

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>S2B8

<400>12

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

	85	90	95
Ala Arg Gly Gly Leu Gly Pro Glu Tyr Leu Gln His Trp Gly Gln Gly			
	100	105	110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly			
	115	120	125
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Ser Glu Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val			
	130	135	140
Ser Gly Ser Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser			
145	150	155	160
Ser Asp Ile Gly Asp Asn Asn Phe Val Ser Trp Tyr Gln Gln Tyr Pro			
	165	170	175
Gly Lys Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser			
	180	185	190
Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser			
	195	200	205
Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys			
	210	215	220
Ser Ser Tyr Thr Ser Ser Ser Thr Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys			
225	230	235	240
Val Thr Val Leu Gly			
	245		
<210>13			
<211>242			
<212>PRT			
<213>人工序列			
<220>			
<223>S2F5			
<400>13			
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser			
1	5	10	15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Thr Gly Tyr			
	20	25	30
Ser Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met			
	35	40	45
Gly Trp Ile Asn Pro Ile Ser Gly Ser Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe			
	50	55	60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr			
65	70	75	80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			

	85	90	95
Ala Arg Thr Gln Asn Asn Thr Gly Tyr Arg Gly Thr Asp Tyr Trp Gly			
	100	105	110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly			
	115	120	125
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser			
	130	135	140
Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala			
145	150	155	160
Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly			
	165	170	175
Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Pro Ser Gly			
	180	185	190
Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu			
	195	200	205
Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln			
	210	215	220
Gln His Ala Asp Thr Pro Thr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu			
225	230	235	240
Ile Lys			
<210>14			
<211>237			
<212>PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223>S2G1			
<400>14			
Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser			
1	5	10	15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Thr Ser Gly Gly Thr Phe Gly Ser Ser			
	20	25	30
Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Met			
	35	40	45
Gly Arg Ile Asn Pro Val Leu Gly Thr Thr Asn Tyr Thr Gln Lys Phe			
	50	55	60
His Asp Arg Leu Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Thr Thr Ala Tyr			
65	70	75	80
Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
	85	90	95

Ala Arg Glu Gly Ile Pro Met Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
115 120 125
Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser
130 135 140
Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile His
145 150 155 160
Asn Trp Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
165 170 175
Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
180 185 190
Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
195 200 205
Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Gly Lys Gln
210 215 220
Pro Val Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
225 230 235

<210>15

<211>235

<212>PRT

<213>人工序列

<220>

<223>S3A12

<400>15

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

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 115 120 125
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 130 135 140
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asn Val Asn Asn Trp
 145 150 155 160
 Leu Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 165 170 175
 Tyr Ala Ala Ser Thr Arg Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 180 185 190
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 195 200 205
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Arg Asp Val Pro Val
 210 215 220
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 225 230 235
 <210>16
 <211>115
 <212>PRT
 <213>人工序列
 <220>
 <223>H4H4
 <400>16
 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 Ala Ile Tyr Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Val Ser Phe Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
 50 55 60
 Gln Gly Arg Gly Thr Met Thr Thr Asp Pro Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Tyr Val Met Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser
 115

<210>17

<211>115

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>H7B12

<400>17

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Leu Asn Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Val Ser Phe Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
 50 55 60
 Gln Gly Arg Gly Thr Met Thr Thr Asp Pro Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Tyr Val Met Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser
 115

<210>18

<211>115

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>H8H7

<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 Ala Ile Tyr Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Val Ser Phe Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
 50 55 60
 Gln Gly Arg Gly Thr Met Thr Thr Asp Pro Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

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

<210>21

<211>115

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>EvolovH

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

<210>22

<211>109

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>Evo1oVL

<400>22

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

<210>23

<211>118

<212>PRT

<213>人工序列

<220>

<223>AliroVH

<400>23

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

115

<210>24

<211>113

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>AliroVK

<400>24

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Arg

20 25 30

Ser Asn Asn Arg Asn Phe Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

Pro Pro Asn Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

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

65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln

85 90 95

Tyr Tyr Thr Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile

100 105 110

Lys

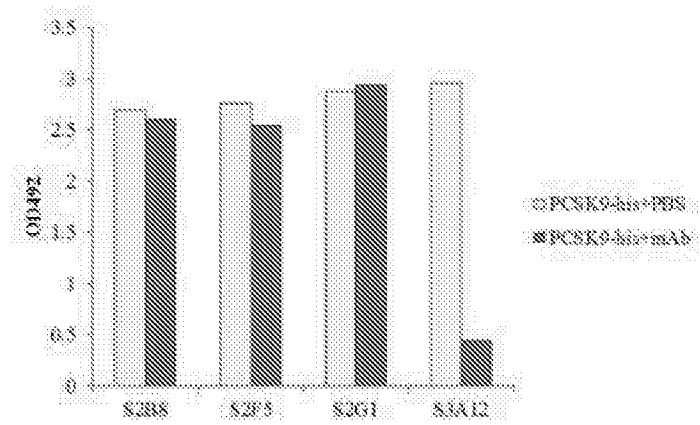


图 1

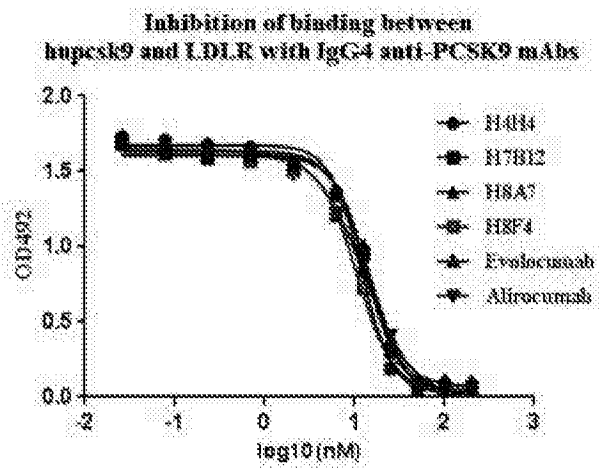


图 2

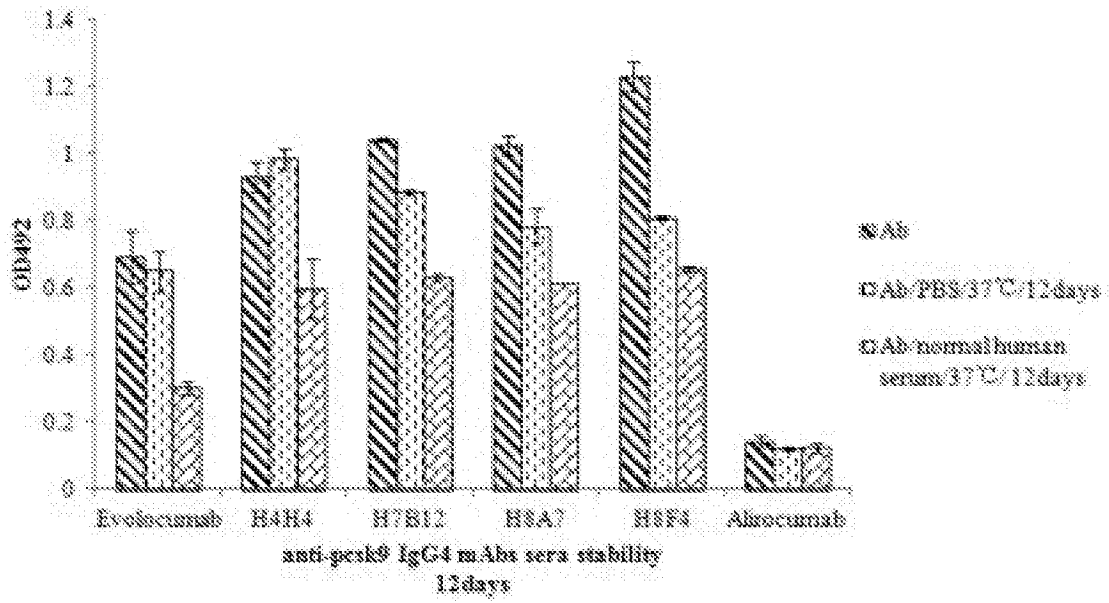


图 3

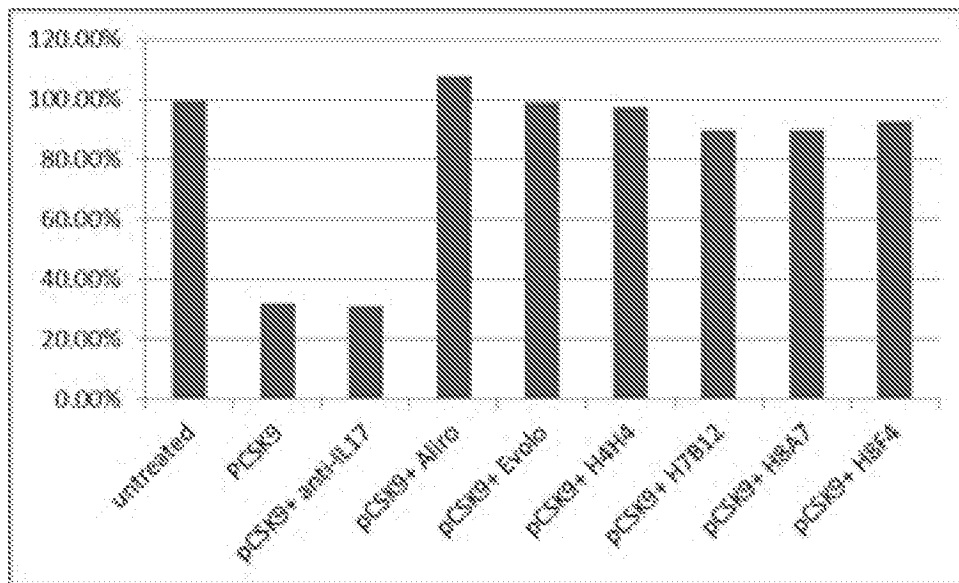


图 4

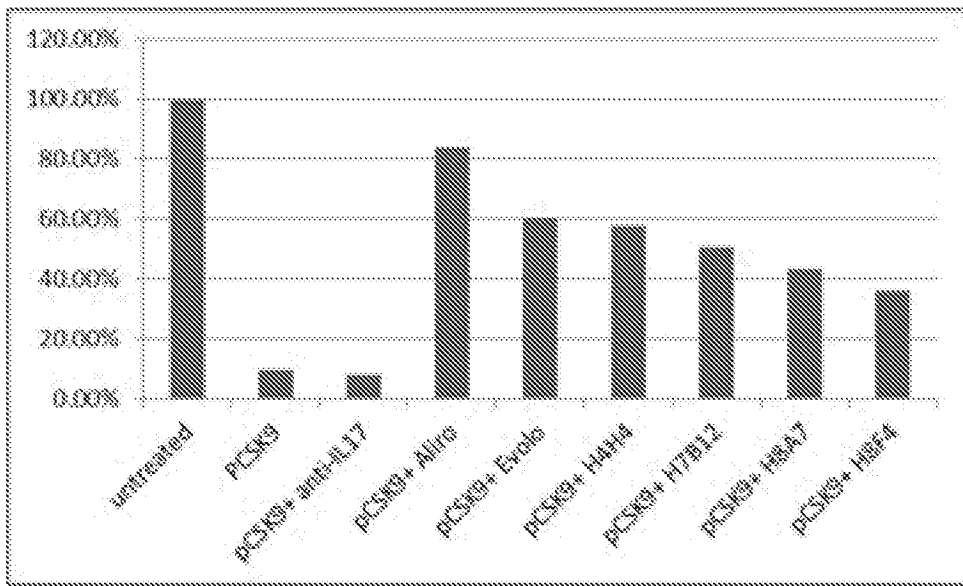


图 5