



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103781802 B

(45)授权公告日 2016.08.24

(21)申请号 201280044580.3

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

(22)申请日 2012.09.12

代理人 刘健 李炳爱

(30)优先权数据

61/535625 2011.09.16 US

(51)Int.Cl.

C07K 16/40(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2014.03.13

(56)对比文件

US 20100166768 A1, 2010.07.01, 实施例4-14.

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/054737 2012.09.12

审查员 刘婷

(87)PCT国际申请的公布数据

W02013/039958 EN 2013.03.21

权利要求书1页 说明书14页

序列表21页

(54)发明名称

针对PCSK9的抗体及其用途

(57)摘要

本发明涉及针对9型前蛋白转变酶枯草芽孢杆菌素/kexin (PCSK9)的抗体,或其抗原结合片段,包含此类PCSK9抗体或抗原结合片段的组合物,以及使用其治疗高脂血症或高胆固醇血症的方法。

1. 抗体或其抗原结合片段,其包含重链可变区(HCVR)和轻链可变区(LCVR),其中所述HCVR包含互补决定区域(CDR)HCDR1、HCDR2和HCDR3并且所述LCVR包含CDR LCDR1、LCDR2和LCDR3,其中HCDR1的氨基酸序列由SEQ ID NO: 1给出,HCDR2的氨基酸序列由SEQ ID NO: 2给出,HCDR3的氨基酸序列由SEQ ID NO: 3给出,LCDR1的氨基酸序列由SEQ ID NO: 4给出,LCDR2的氨基酸序列由SEQ ID NO: 5给出,LCDR3的氨基酸序列由SEQ ID NO: 6给出,其中所述抗体或其抗原结合片段结合人PCSK9。

2. 权利要求1的抗体或抗原结合片段,其包含重链可变区(HCVR)和轻链可变区(LCVR),其中所述HCVR的氨基酸序列由SEQ ID NO: 7给出并且所述LCVR的氨基酸序列由SEQ ID NO: 8给出。

3. 权利要求2的抗体或抗原结合片段,其包含两个HCVR和两个LCVR,其中每一HCVR的氨基酸序列由SEQ ID NO: 7给出,并且每一LCVR的氨基酸序列由SEQ ID NO: 8给出。

4. 权利要求1的抗体或抗原结合片段,其包含重链(HC)和轻链(LC),其中所述HC的氨基酸序列由SEQ ID NO: 9给出,并且所述LC的氨基酸序列由SEQ ID NO: 10给出。

5. 权利要求4的抗体或抗原结合片段,其包含两条重链(HC)和两条轻链(LC),其中每一HC的氨基酸序列由SEQ ID NO: 9给出,并且每一LC的氨基酸序列由SEQ ID NO: 10给出。

6. 抗体,其包含两条重链(HC)和两条轻链(LC),其中每一HC的氨基酸序列由SEQ ID NO: 9给出,并且每一LC的氨基酸序列由SEQ ID NO: 10给出。

7. 抗体,其由两条重链和两条轻链组成,其中每一重链的氨基酸序列由SEQ ID NO: 9给出,并且每一轻链的氨基酸序列由SEQ ID NO: 10给出。

8. 药物组合物,其包含权利要求1的抗体或抗原结合片段以及一种或多种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

9. 权利要求1的抗体或抗原结合片段在制备用于治疗高脂血症或高胆固醇血症的药物中的用途。

10. 权利要求6的抗体在制备用于治疗高脂血症或高胆固醇血症的药物中的用途。

## 针对PCSK9的抗体及其用途

[0001] 本发明在医药领域中。具体而言，本发明涉及针对9型前蛋白转变酶枯草芽孢杆菌素/kexin (PCSK9)的抗体，包含此类PCSK9抗体的组合物，以及使用PCSK9抗体治疗高脂血症或高胆固醇血症的方法。

[0002] 9型前蛋白转变酶枯草芽孢杆菌素/kexin (PCSK9)是分泌的丝氨酸蛋白酶，主要在肝中产生，其调节低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)的血浆浓度。分泌的PCSK9结合位于肝细胞表面的LDL受体(LDLR)并与其内化。LDLR功能为通过从血浆中结合并转运LDL颗粒至溶酶体进行降解来清除LDL-C。一旦LDL颗粒被递送进行降解，则LDLR再循环至肝细胞表面以从血浆中结合并清除另外的LDL-C。PCSK9通过引导内化的LDLR进行降解而非循环至细胞表面来调节血浆LDL-C，从而减少LDL-C清除。在PCSK9缺陷的或过表达的啮齿动物中的研究目前已经证实了PCSK9通过调整LDLR水平来控制循环的LDL水平。循环的PCSK9参与肝LDLR的降解这一观察结果暗示PCSK9的抗体中和是用于降低LDL-C的可行的治疗方法。此外，已经报道作为目前用于降低LDL-C的护理标准的抑制素药物实际上可以提高PCSK9的表达和血清水平。因此，PCSK9抗体还具有以与抑制素治疗协同的方式降低LDL-C的潜力。

[0003] PCSK9抗体及其在降低血浆LDL-C中的作用在本领域是已知的。例如，US2009/0246192、US2009/0142352、US2010/0166768和WO2010/029513公开了此类PCSK9抗体及其用途。然而，截至目前，还没有靶向PCSK9的抗体被批准用于治疗用途。因此，存在替代PCSK9抗体的需求。具体而言，存在以高效能降低LDL-C的替代PCSK9抗体的需求。还更具体的是，存在以高效能降低LDL-C并提供持久的起效持续时间(例如，持久的LDL-C水平的抑制)的替代PCSK9抗体的需求。此类抗体将还优选具有利于开发、制造或配制的良好的物理化学特性。

[0004] 本发明提供抗体或其抗原结合片段，其包含重链可变区(HCVR)和轻链可变区(LCVR)，其中HCVR包含互补决定区域(CDRs)HCDR1、HCDR2和HCDR3并且LCVR包含CDRs LCDR1、LCDR2和LCDR3，其中HCDR1的氨基酸序列由SEQ ID NO: 1给出，HCDR2的氨基酸序列由SEQ ID NO: 2给出，HCDR3的氨基酸序列由SEQ ID NO: 3给出，LCDR1的氨基酸序列由SEQ ID NO: 4给出，LCDR2的氨基酸序列由SEQ ID NO: 5给出，LCDR3的氨基酸序列由SEQ ID NO: 6给出，其中所述抗体或其抗原结合片段结合人PCSK9。在一个实施方案中，本发明提供抗体或其抗原结合片段，其包含重链可变区(HCVR)和轻链可变区(LCVR)，其中HCVR的氨基酸序列由SEQ ID NO: 7给出并且LCVR的氨基酸序列由SEQ ID NO: 8给出，其中所述抗体或其抗原结合片段结合人PCSK9。在另一个实施方案中，本发明提供抗体或其抗原结合片段，其包含两个重链可变区(HCVRs)和两个轻链可变区，其中每一HCVR的氨基酸序列由SEQ ID NO: 7给出并且每一LCVR的氨基酸序列由SEQ ID NO: 8给出。

[0005] 在另一个具体实施方案中，本发明提供抗体或其抗原结合片段，其包含重链(HC)和轻链(LC)，其中HC的氨基酸序列由SEQ ID NO: 9给出并且LC的氨基酸序列由SEQ ID NO: 10给出。在甚至更具体的实施方案中，本发明提供抗体，其包含两条重链(HCs)和两条轻链(LCs)，其中每一HC的氨基酸序列由SEQ ID NO: 9给出并且每一LC的氨基酸序列由SEQ ID NO: 10给出。在最具体的实施方案中，本发明提供抗体，其由两条HCs和两条LCs组成，其中每一HC的氨基酸序列由SEQ ID NO: 9给出并且每一LC的氨基酸序列由SEQ ID NO: 10给

出。

[0006] 本发明进一步提供药物组合物，其包含本发明的抗体或其抗原结合片段以及一种或多种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。更具体而言，本发明的药物组合物进一步包含一种或多种另外的治疗剂。

[0007] 此外，本发明提供治疗高脂血症或高胆固醇血症的方法，其包括向有其需要的患者施用有效量的本发明的抗体或抗原结合片段。本发明还提供本发明的抗体或其抗原结合片段，其用于治疗。更具体而言，本发明提供本发明的抗体或其抗原结合片段，其用于治疗高脂血症或高胆固醇血症。此外，本发明提供本发明的抗体或其抗原结合片段在制造治疗高脂血症或高胆固醇血症的药物中的用途。

[0008] 本发明还涉及编码本发明的抗体或抗原结合片段的核酸分子和表达载体。此外，本发明提供按照这样的方法制备的抗体，其中所述方法包括(a)培养包含编码由SEQ ID NO: 9给出的第一条多核苷酸序列和编码由SEQ ID NO: 10给出的第二条多肽序列的宿主细胞，并在所述多肽序列被表达的条件下进行；和(b)从所述宿主细胞中回收包含重链和轻链的抗体，其中所述重链的多肽序列由SEQ ID NO:9给出，并且所述轻链的多肽序列由SEQ ID NO:10给出。更具体而言，由上述方法产生的抗体包含两条重链和两条轻链，其中每一重链的多肽序列由SEQ ID NO:9给出，并且每一轻链的多肽序列由SEQ ID NO:10给出。

[0009] 全长抗体是包含由二硫键互联的2条重(H)链和2条轻(L)链的免疫球蛋白分子。每一条链的氨基末端部分包括经其中包含的互补性决定区域(CDRs)主要负责抗原识别的约100-110个氨基酸的可变区。每一条链的羧基末端部分限定主要负责效应子功能的恒定区。将轻链分类为κ或λ，其每一条的特征在于本领域中已知的特定的恒定区。将重链分为γ、μ、α、δ或ε，并限定抗体的同种型分别为IgG、IgM、IgA、IgD或IgE。IgG抗体可以进一步分入亚类例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4中。每一重链类型的特征还在于具有本领域熟知的序列的特定恒定区。如本文所用，“抗原结合片段”指Fab片段、Fab'片段、F(ab')<sub>2</sub>片段、和结合人PCSK9的单链Fv片段。如本文所用，术语“结合(bind)(或‘结合(binds)’)人PCSK9”指与由SEQ ID NO: 14的氨基酸序列给出的人PCSK9上的表位的相互作用。如本文所用，术语“表位”指抗原上分离的、三维位点，其被本发明的抗体或抗原结合片段所识别。

[0010] CDRs散布在更保守的名为框架区(“FR”)的区域中。每一轻链可变区(LCVR)和重链可变区(HCVR)由3个CDRs和4个FRs构成，其从氨基末端至羧基末端以下顺序排列：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。将轻链的3个CDRs称为“LCDR1、LCDR2和LCDR3”并将重链的3个CDRs称为“HCDR1、HCDR2和HCDR3”。CDRs包含大部分与抗原形成特异性相互作用的残基。本发明的抗体或抗原结合片段的LCVR和HCVR区内的CDR氨基酸残基的编号和位置可以按照众所周知的Kabat编号协定(LCDR 1-3, HCDR2-3)或按照Kabat加Chothia (HCDR1)进行确定。

[0011] 产生和纯化抗体和抗原结合片段的方法是本领域熟知的，并且可见于例如Harlow和Lane (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, chapters 5-8 and 15。例如，可以用人PCSK9或其片段免疫小鼠，并可以随后将产生的抗体回收，纯化，并使用本领域熟知的常规方法确定氨基酸序列。抗原结合片段还可以通过常规方法制备。将本发明的抗体或抗原结合片段工

程化以包含环绕来源于非人抗体的CDRs的一个或多个人框架区。人框架种系序列可以经其网址<http://imgt.cines.fr>获自ImMunoGeneTics (IMGT),或者获自Marie-Paule Lefranc和Gerard Lefranc, Academic Press, 2001, ISBN 012441351的The Immunoglobulin Facts Book。具体而言,用于本发明的抗体或抗原结合片段的种系轻链框架包括A3和O2。具体而言,用于本发明的抗体或抗原结合片段的具体种系重链框架区包括VH3-21和VH3-23。

[0012] 可以使用已知方法制备并纯化本发明的工程化的抗体或抗原结合片段。例如,可以将编码重链(例如,由SEQ ID NO: 9给出的氨基酸序列)和轻链(例如,由SEQ ID NO: 10给出的氨基酸序列)的cDNA序列克隆并工程化入GS(谷氨酰胺合酶)表达载体。工程化的免疫球蛋白表达载体可以随后稳定地转染入CHO细胞中。如本领域技术人员将理解,抗体的哺乳动物表达将导致糖基化,通常在Fc区内的高度保守的N糖基化位点上。可以确认稳定克隆表达了特异性结合人PCSK9的抗体。可以将阳性克隆在生物反应器中在无血清培养基中扩大培养用于抗体生产。抗体已分泌入其中的培养基可以通过常规技术纯化。例如,可以将培养基方便地应用到已经用相容性缓冲液诸如磷酸缓冲盐溶液平衡的Protein A或GSepharose FF柱上。洗涤该柱以去除非特异性结合的组分。例如,通过pH梯度将结合的抗体洗脱下来,并通过诸如SDS-PAGE检测抗体级分,并随后混合。可以使用常规技术将抗体浓缩和/或无菌过滤。通过常规技术包括尺寸排阻、疏水相互作用、离子交换或羟基磷灰石层析可以将可溶的聚集体或多聚体有效去除。可以将产物立即冷冻,例如在-70℃下,或可以冷冻干燥。

[0013] 本发明的抗体是单克隆抗体。如本文所用,“单克隆抗体”或“mAb”指来源于包括例如真核生物的、原核生物的或噬菌体克隆的单一拷贝或克隆的抗体,而不指其产生的方法。单克隆抗体或其抗原结合片段可以例如通过杂交瘤技术、重组技术、噬菌体展示技术、合成技术例如CDR嫁接(grafting)、或此类或其它本领域已知的技术的组合来产生。

[0014] 在本发明的另一个实施方案中,抗体或其抗原结合片段、或编码其的核酸以分离的形式提供。如本文所用,术语“分离的”指不含或基本上不含细胞环境中发现的其他大分子种类的蛋白、肽或核酸。如本文所用,“基本上不含”表示目标蛋白、肽或核酸包含多于80%(以摩尔计)的存在の大分子种类,优选多于90%,并更优选多于95%。

[0015] 本发明的抗体或抗原结合片段可以用于治疗患者。术语“治疗(treating)”(或“治疗(treat)”或“治疗(treatment)”)指减缓、中断、阻滞、缓解、停止、降低、或逆转已存在的症状、病症、病况或疾病的进展或严重性。如本文所用,“患者”指人或非人哺乳动物,但优选指人。如本文所用,术语“有效量”指本发明的抗体或抗原结合片段这样的量或剂量,其以单一或多次剂量施用患者后,在治疗的患者中产生预期效果。有效量可以由作为本领域技术人员的主治医师通过考虑以下多种因素来容易地确定:诸如哺乳动物的物种;它的大小、年龄和一般健康;涉及的具体疾病;疾病的程度或严重性;个体患者的应答;施用的具体抗体;施用模式;施用制剂的生物利用率特征;选择的给药方案;和任何伴随疗法的使用。

[0016] 本发明的抗体或抗原结合片段或包含其的药物组合物可以通过肠胃外途径(例如皮下、静脉内、腹膜内、肌内或经皮)施用。本发明的药物组合物可以通过本领域熟知的方法制备(例如, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第19版 (1995), A. Gennaro et al., Mack Publishing Co.)并包含如本文公开的抗体或其抗原结合片段以及一种和多种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。例如,本发明的抗体或抗原结合片段

可以与试剂诸如柠檬酸钠、柠檬酸、聚山梨酯80和蔗糖配制，并且产生的组合物可随后冷冻干燥并储存在2°C – 8°C下。冷冻干燥的组合物在施用前可以用注射用的无菌水重构。

[0017] 以下实施例进一步说明本发明，然而，应理解实施例以说明而非限定的方式来描述，并且本领域技术人员可以进行多种修改。

[0018] 实施例1

[0019] 工程化的PCSK9抗体

[0020] 用包含人PCSK9 (SEQ ID NO: 17)的C末端截短片段的肽免疫鼠类宿主，并使用标准方法分离并克隆结合PCSK9的IgG抗体。分离的鼠类Fab的CDRs通过诱变进行随机化，并筛选产生的抗体对人PCSK9的亲和力。将亲和力增强的突变组合，并将最优CDRs分别工程化到人VH3-21和A3重链和轻链框架中。为了进一步优化人源化抗体的生物物理特性，进行CDR序列内芳香族和疏水氨基酸的靶向替换。还对随机CDR文库筛选另外的亲和力增强突变。将有益的CDR突变随机组合并表达，并筛选产生的抗体对人PCSK9的亲和力。获得具有以下氨基酸序列的全长人源化且优化的PCSK9抗体：

[0021]

mAb片段	氨基酸序列
HCDR1	SEQ ID NO:1
HCDR2	SEQ ID NO:2
HCDR3	SEQ ID NO:3
HCVR	SEQ ID NO:7
HC	SEQ ID NO:9
LCDR1	SEQ ID NO:4
LCDR2	SEQ ID NO:5
LCDR3	SEQ ID NO:6
LCVR	SEQ ID NO:8
LC	SEQ ID NO:10

[0022] 分别编码SEQ ID NO: 9和SEQ ID NO: 10的重链和轻链氨基酸序列的对应的cDNA序列如下：

[0023]

mAb片段	cDNA序列, 其编码
HC	SEQ ID NO:11
LC	SEQ ID NO:12

[0024] 实施例2

[0025] 工程化的PCSK9抗体的表达

[0026] 实施例1的工程化的PCSK9抗体可以在稳定转染的CHO细胞系中表达。使用含有SEQ ID NO: 11 (编码SEQ ID NO: 9的重链氨基酸序列)和SEQ ID NO: 12 (编码SEQ ID NO: 10的轻链氨基酸序列)的cDNA的谷氨酰胺合酶(GS)表达载体通过电穿孔来转染中国仓鼠细胞系CHOK1SV (Lonza Biologics PLC, Slough, United Kingdom)。表达载体编码SV早期(猿猴病毒40E)启动子和GS的基因。GS的表达允许谷氨酰胺(CHOK1SV细胞需要的一种氨基酸)的生物化学合成。转染后，将细胞用50μM L-甲硫氨酸磺基肟(MSX)进行大量选择。利用

MSX对GS的抑制来增加选择的严格性。可以将整合表达载体cDNA入宿主细胞基因组的转录活性区内的细胞对CHOK1SV野生型细胞进行选择,其表达内源水平的GS。使用荧光激活细胞分选术(FACS)技术将大量培养物进行单细胞克隆,并将克隆细胞系扩大培养并筛选实施例1的工程化PCSK9抗体的表达。

[0027] 实施例3

[0028] 表位结合

[0029] 将鼠类IgG(实施例1的工程化的PCSK9抗体从其衍生)的PCSK9结合表位通过表位提取和氢/氘置换质谱法来确定,并缩小至人PCSK9的催化域的线性氨基酸序列160-181内的区域中(氨基酸编号基于全长人PCSK9序列,包括二十八个氨基酸的信号肽)。实施例1的工程化抗体与人PCSK9的催化域中的该表位之间的相互作用通过评价它与对应于残基160-181的合成肽(表1)的结合来驱使。实施例1的工程化抗体以高于完整的人PCSK9的亲和力结合肽160-181,差异由更快的结合速率( $k_{on}$ )来产生。解离速率( $k_{off}$ )在完整的PCSK9的2倍之内,暗示(结合发生后)相互作用的强度是相似的。此外,数据暗示几乎所有的结合决定子均包含在PCSK9的该线性区内。实施例1的工程化抗体与肽166-181的结合明显弱于肽160-181,证明在160-165区内的一个氨基酸(或多个氨基酸)的作用。实施例1的工程化抗体与肽163-174的结合明显强于166-181,还暗示残基163-165的贡献。

[0030] 表1:实施例1的抗体与对应于人PCSK9的催化域序列的肽的结合动力学和亲和力

[0031]

PCSK9 片段	序列	$k_{on}$ (1/Ms)	$k_{off}$ (1/s)	$K_D$ (nM)
成熟 hPCSK9 C末端 His*	(SEQ ID NO:13)	8.67E +04	1.50E -04	1.8
hPCSK9 160-181**	RITPPPRYRADEYQPPDGGSVLVE (SEQ ID NO:14)	1.45E +06	2.42E -04	0.17
hPCSK9 166-181**	YRADEYQPPDGGSVLVE (SEQ ID NO:15)	4.58E +06	1.56E -01	34
hPCSK9 163-174**	PPRYRADEYQPP (SEQ ID NO:16)	2.75E +06	8.31E -03	3.0

[0032] \* 使用的hPCSK9为缺少28个氨基酸的信号肽并且含有C末端His标签的成熟形式。

[0033] \*\* 指定的氨基酸编号参考完整人PCSK9,包括了28个氨基酸的信号肽。

[0034] 实施例4

[0035] 结合动力学和亲和力

[0036] 将如本领域众所周知的表面等离子共振(SPR)测定用于评估受试PCSK9抗体对人、食蟹猴、小鼠、大鼠和兔PCSK9的结合动力学和亲和力。在生理缓冲液条件(离子强度和pH)和温度(37°C)下,实施例1的工程化抗体以 $1.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 的平均结合速率( $k_{on}$ )和 $1.2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 的平均解离速率( $k_{off}$ )结合人PCSK9。人PCSK9结合实施例1的工程化抗体的平均 $K_D$ 测定为约11 nM。实施例1的工程化抗体以 $1.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 的平均结合速率( $k_{on}$ )和 $2.5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 的平均解离速率( $k_{off}$ )结合食蟹猴PCSK9,导致对食蟹猴PCSK9结合的约25 nM的 $K_D$ 。下文表2显示了使用小鼠、大鼠和兔PCSK9用实施例1的工程化PCSK9抗体获得的另外的结果的

概述。这些数据说明实施例1的工程化PCSK9抗体在pH、离子强度和温度的生理条件下以纳摩尔亲和力结合人及食蟹猴PCSK9。

[0037] 表2:实施例1的PCSK9抗体对人、食蟹猴、小鼠、大鼠和兔PCSK9的结合动力学和亲和力

[0038]

抗原	K <sub>off</sub> 平均值±SD M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> (10 <sup>-3</sup> )	K <sub>on</sub> 平均值±SD s <sup>-1</sup> (10 <sup>-3</sup> )	K <sub>d</sub> 平均值±SD nM	n
人 PCSK9*	1.2 ± 0.46	1.2 ± 0.18	11 ± 2.9	6
食蟹猴 PCSK9*	1.1 ± 0.51	2.5 ± 0.79	25 ± 6.8	4
小鼠 PCSK9**	NB	NB	NB	3
大鼠 PCSK9**	NB	NB	NB	2
兔 PCSK9**	NB	NB	NB	3

[0039] “NB” 未检测到结合；\* 测定在37°C下进行；\*\* 测定在25°C下进行。

[0040] 实施例5

[0041] PCSK9结合LDL受体的抑制

[0042] PCSK9通过降低肝的LDLR含量并由此降低经肝细胞的LDL摄入来调节血浆LDL-C。PCSK9的催化域是结合LDLR的位点。因此，预期识别PCSK9的催化域的抗体抑制PCSK9与LDLR的结合。

[0043] 使用AlphaLISA® 格式确定受试PCSK9抗体对结合到LDL受体上的PCSK9的作用。用于测定中的重组全长PCSK9在人胚肾(HEK) 293稳定细胞系中表达为C末端HIS标签化的蛋白(Qian等, J. Lipid Res. 48: 1488-1498, 2007)。重组LDL受体胞外域在瞬时转染的HEK 293E细胞中表达为C末端FLAG标签化的蛋白(Qian等, J. Lipid Res. 48: 1488-1498, 2007)。结合人PCSK9的C末端结构域的鼠类抗PCSK9 Mab在HEK293细胞中表达，并通过Protein-G亲和柱随后为Superdex 200进行纯化。单克隆ANTI-FLAG® BioM2抗体(Sigma)为纯化的小鼠IgG1单克隆抗体，其通过酰肼键与生物素共价连接。ANTI-FLAG BioM2会识别FLAG融合蛋白的N末端、Met-N末端或C末端的FLAG序列。ANTI-FLAG BioM2能够通过抗生物素蛋白或链霉抗生物素蛋白缀合物来检测。单克隆ANTI-FLAG BioM2-生物素在含有0.02%叠氮化钠的50%甘油、10 mM磷酸钠、pH 7.25、150 mM NaCl中提供并储存于-20°C下。

[0044] AlphaLISA® 实验在384-孔白色proxiplates (Perkin Elmer)中用25mM HEPES; pH 7.5, 100mM NaCl, 2.5mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5% TX-100, 0.1% 酪蛋白, 1mg/ml 葡聚糖-500 和0.05% Proclin-300作为缓冲液进行。测定使用 AlphaLISA® Streptavidin供体珠(Perkin Elmer)和与AlphaLISA® 受体珠缀合的鼠类抗PCSK9 Mab。当经结合配偶体PCSK9 和LDLR的相互作用使珠紧密接近时，单价氧从供体珠转移至受体珠上。在680nm处激光激发后，单价氧激发受体珠来发光。使用NaBH<sub>3</sub>CN (Sigma)通过还原性氨基化将受体珠与鼠类抗PCSK9 Mab连接，并储存在 4°C下。将鼠类抗PCSK9 Mab缀合受体珠(22μg/ml)用2.22 nM PCSK9预装载1小时。将供体珠(44μg/ml)用5.55 nM ANTI-FLAG® BioM2和2.22 nM的FLAG-标签化的LDLR预装载1小时。预装载后，使用完全自动的Multimek (Beckman)将2μl的受试

PCSK9抗体或对照IgG加入到含有9 $\mu$ l每种珠混合物的proxiplate中(PCSK9和LDLR的终浓度= 1nM),并允许在室温下结合过夜。在Envision Turbo (Perkin Elmer)上测量AlphaLISA<sup>®</sup>信号(每秒计数)。所有AlphaLISA<sup>®</sup>测定的实验在低光条件下进行。

[0045] 在基本上如上文描述的程序后,在AlphaLISA<sup>®</sup>测定中人PCSK9与LDLR的结合作为PCSK9浓度的函数而增加。加入实施例1的工程化PCSK9抗体(受试PCSK9抗体)导致与LDLR结合的PCSK9的浓度相关的和完全的抑制,并且平均IC50为约90 pM。对照IgG4在测定中没有作用。该测定结果证明实施例1的工程化PCSK9抗体抑制人PCSK9与LDLR的结合。

[0046] 实施例6

[0047] HepG2细胞上PCSK9功能的抑制

[0048] 为了确定受试PCSK9抗体对肝细胞上LDLR密度的作用,将人HepG2细胞在聚-D-赖氨酸包被的T75烧瓶中培养。24小时后,将细胞以5,000细胞/孔接种于聚-D-赖氨酸包被的96孔黑色板(Becton-Dickinson)中的100 u1含有5% (v/v)人脂蛋白缺失血清(LPDS; Intrace1)的DMEM / F-12 (3:1)培养基中。在含LPDS的培养基中过夜孵育后,将细胞与69 nM (5ug/mL) C末端HIS标签化重组人PCSK9和以浓度范围为2.6至1333 nM的受试PCSK9抗体或IgG4对照抗体孵育2小时。所有孵育均在37°C下进行。LDLR水平使用用Zenon<sup>®</sup> Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 Mouse IgG2b Labeling Kit (Invitrogen)荧光标记的LDLR抗体(Progen)来监测。将细胞与检测抗体在室温下孵育90分钟,并随后使用无福尔马林的固定剂(Prefe; ANATECH, Ltd)固定10分钟,并随后在0.01% Triton X-100中透化。将细胞用10 ug/ml碘化丙啶(Invitrogen)染色以确定总细胞数。使用Acumen Explorer<sup>™</sup> 激光扫描荧光微量培养板细胞计数器荧光检测器(TTP LabTech)对LDLR信号定量。

[0049] 在基本上如上文描述的程序后,人PCSK9导致在HepG2细胞上的LDLR浓度依赖性的降低,并且EC50为18 nM。实施例1的工程化PCSK9抗体(受试PCSK9抗体)以104 nM的IC50抑制HepG2细胞上PCSK9诱导的LDLR的抑制。人IgG4对照在高至1333 nM的浓度下相对无活性。这些数据证明实施例1的工程化PCSK9抗体抑制PCSK9介导的LDLR降解。

[0050] 实施例7

[0051] LDL摄入的PCSK9诱导的降低的抑制

[0052] 为了确定受试PCSK9抗体对LDL摄入的作用,将HepG2细胞以5,000细胞/孔接种于聚-D-赖氨酸包被的96孔黑色板中的100 u1添加有5%人LPDS的DMEM / F-12 (3:1)培养基中,并在37°C下和5% CO<sub>2</sub>气氛中孵育18小时。将人PCSK9 (69nM)以范围从2.6 nM至1333 nM的浓度加入到具有或不具有PCSK9受试抗体或人IgG4对照的细胞中,并与细胞在37°C下预温育2小时。加入100 ng/的荧光标记的LDL (BODIPY-LDL, Invitrogen)后,将细胞随后在37°C下孵育4小时。将细胞用无福尔马林的固定剂(Prefe; ANATECH, Ltd.)在室温下固定20分钟。用PBS洗涤细胞两次后,将细胞用含有0.01% Triton X-100的PBS缓冲液在室温下透化15分钟,并用10 ug/mL的碘化丙啶染色以确定总细胞数。将LDL摄入用Acumen Explorer<sup>™</sup> 激光扫描荧光微量培养板细胞计数器确定,并表示为荧光细胞相对于总细胞的百分比。将对受试PCSK9抗体或对照IgG的应答表示为PCSK9的百分比抑制,即,在不存在PCSK9的情况下最大LDL摄入相对于在仅存在PCSK9的情况下基线LDL-C摄入产生的百分比。还计算对于抑制LDL摄入的PCSK9诱导降低的对应IC50。

[0053] 在基本上如上文描述的程序后,人PCSK9导致在HepG2细胞上的LDL摄入的浓度相

关的降低,并且EC50为32 nM。实施例1的工程化PCSK9抗体逆转PCSK9诱导的抑制,反映为增加的LDL摄入,而对照IgG则没有逆转抑制。具体而言,实施例1的工程化PCSK9抗体证明PCSK9的平均最大百分比抑制为84%并且平均IC50为194 nM。这些数据证明实施例1的工程化PCSK9抗体抑制PCSK9诱导的LDL摄入的降低。

[0054] 实施例8

[0055] 体内效力

[0056] 为了测定受试PCSK9抗体的体内药代动力学(PK)和/或药效动力学(PD)作用,受试抗体可以向正常食蟹猴施用,并随后测定多种PK和/或PD参数。例如,可以将受试PCSK9抗体向健康的、首次用于实验的食蟹猴静脉内或皮下施用,并可以随后使用人IgG夹心ELISA测量受试抗体的血清浓度。可以将在抗体施用后多个时间点取得的血清浓度用于测定受试抗体的多种PK参数,包括T<sub>1/2</sub>、C<sub>max</sub>、AUC和血浆清除率(CL)。类似地,可以将受试PCSK9抗体向健康的、首次用于实验的食蟹猴静脉内或皮下施用,并通过自动分析仪(Direct LDL-C Plus, 2<sup>nd</sup> Gen., Roche Diagnostics)测量LDL-C的血清浓度。

[0057] 在基本上如上文描述的程序后,在1、5或15 mg/kg的单次剂量静脉内施用后,和在5 mg/kg的单次皮下剂量后,在健康食蟹猴中评价实施例1的工程化PCSK9抗体的药代动力学。从这些研究中测定的药代动力学参数提供在下文表3中。

[0058] 表3. 食蟹猴中实施例1的工程化PCSK9抗体的药代动力学参数。

[0059]	静脉内(n = 4 /组)				
	剂量 (mg/kg)	T <sub>1/2</sub> (d)	C <sub>max</sub> ( $\mu$ g/mL)	AUC <sub>0-t</sub> (hr <sup>2</sup> $\mu$ g/mL)	CL (mL/hr/kg)
	1	5.4 ± 1.0	19.8 ± 1.1	2218 ± 222	0.45 ± 0.04
	5	7.3 ± 1.3	107.3 ± 3.2	14378 ± 1374	0.35 ± 0.04
	15	8.4 ± 3.0	260.3 ± 45.0	57290 ± 16535	0.28 ± 0.07

  

[0060]	皮下(n = 3 /组)						
	剂量 (mg/kg)	T <sub>1/2</sub> (days)	C <sub>max</sub> ( $\mu$ g/mL)	T <sub>1/2</sub> (d)	AUC <sub>0-t</sub> (hr <sup>2</sup> $\mu$ g/mL)	CL/F (mL/hr/kg)	% F
	5	2.7 ± 0.6	32.4 ± 1.9	5.4 ± 0.7	11575 ± 1345	0.44 ± 0.05	81

[0061] 在两个独立研究中施用实施例1的工程化PCSK9抗体后,测量血清LDL。在两个研究中,LDL-C抑制的证据在用实施例1的工程化PCSK9抗体施用后24小时是显而易见的。实施例1的抗体以 5mg/kg静脉内(i.v.)施用后,观察到60% (研究1)和25% (研究2)的最大平均LDL-C降低。以静脉内5 mg/kg时,平均LDL-C抑制保持大约8周(研究1)和2周(研究2)。在研究2中,存在剂量(1–15 mg/kg)对LDL-C抑制程度的适度作用(25–35%)。剂量对LDL-C抑制持续时间的作用更明显。当皮下施用时(5mg/kg),实施例1的工程化抗体有效抑制LDL-C水平至与静脉内给药后观察到的相似的程度。施用任何剂量的实施例1工程化抗体后,不存在对血清高密度脂蛋白胆固醇的任何作用。

[0062] 实施例9

[0063] 工程化的PCSK9抗体的物理化学特性

[0064] 还发现实施例1的工程化PCSK9抗体具有良好的溶解度、化学稳定性和物理稳定性。

[0065] A. 溶解度

[0066] 需要足够高的溶解度以能够方便给药。例如,通过注射入100 kg的患者1.0 mL来施用1 mg/kg的剂量将需要100mg/mL的溶解度。此外,在高浓度下保持抗体为单体状态而没有高分子量(HMW)聚集也是需要的。为了测定受试抗体的溶解度,可以将抗体透析入(1) 10mM 柠檬酸盐 pH6; (2) 10 mM 柠檬酸盐 pH6, 150 mM NaCl; 和(3) 磷酸缓冲盐溶液(PBS) pH7.4中。回收的透析液可以随后通过分析尺寸排阻层析(SEC)来测量百分比HMW。可以随后将受试抗体在~25°C下在4 mL离心浓缩器中浓缩,直至达到溶解度极限或达到浓缩器的外水体积。如果达到外水体积,将浓缩报道为≥。浓缩的抗体可以随后通过SEC分析来测量百分比HMW。为了确定是否浓缩后%HMW中的任何增加是可逆的,可以将浓缩的样品稀释至1 mg/mL并通过SEC分析。

[0067] 在基本上如上文描述的程序后,实施例1的工程化PCSK9抗体在所有测试条件下均展示出大于128 mg/mL的溶解度。此外,在高浓度下仅存在低水平的HMW。

[0068] 表4:通过SEC测定的溶解度样品的百分比HMW

[0069]

	% HMW (透析液)	% HMW (浓缩液)	% HMW (1 mg/mL稀释)
10 mM 柠檬酸盐, pH6	0.75 %	1.60 %	0.93 %
10 mM 柠檬酸盐, 150 mM NaCl, pH6	0.62 %	1.39%	0.90 %
PBS, pH7.4	0.94 %	2.00 %	1.34%

[0070] B. 化学稳定性

[0071] 化学稳定性利于开发具有足够保质期的药物组合物。为了评估受试抗体的化学稳定性,可以将抗体在10 mM缓冲为pH4、pH5、pH6或pH7的柠檬酸盐中配制为1 mg/mL的浓度。随后在加速降解研究中将配制后的样品在4°C、25°C和40°C下孵育4周。抗体电荷概况中的变化反应了化学变化,可以使用毛细管等电聚焦(cIEF)按照标准程序来评估。在基本上如上描述的程序后,实施例1的工程化抗体的化学稳定性分析提供了以下结果。

[0072] 表5:cIEF测定的化学稳定性

[0073]

	4周后主峰中的%变化 (相对于 4°C)	
	(25°C 储存)	(40°C 储存)
10 mM 柠檬酸盐, pH5	-0.4	NT
10 mM 柠檬酸盐, pH6	-4.1	-24.7
10 mM 柠檬酸盐, pH7	-7.7	NT

[0074] 结果证明在25°C下储存4周后,当以pH6(抗体制剂中使用的常见pH)配制时,%主峰下降为仅4.1,说明实施例1的工程化PCSK9抗体具有足够的化学稳定性以利于开发具有适当保质期的溶液制剂。此外,抗体还展示出在pH5下以及在pH7时较小程度的良好的化学稳定性,说明抗体具有稳定性特征,其可以允许在一定范围的pH单位上的制剂。

## [0075] C. 物理稳定性

[0076] 为了评估受试抗体的物理稳定性,可以将抗体在10 mM缓冲为pH4、pH5、pH6或pH7的柠檬酸盐(或10mM Tris, pH 8)中配制为1 mg/mL的蛋白浓度。随后在加速降解研究中将样品在4°C、25°C和40°C下孵育4周。孵育后,使用尺寸排阻层析(SEC)评估物理稳定性,其将希望的单体抗体与聚集的高分子量(HMW)抗体分开。

[0077] 表6概述了在基本上如上描述的程序后实施例1的工程化PCSK9抗体的物理稳定性的分析结果。数据显示了在25°C或40°C下在pH5、pH6和pH7下4周后HMW中的变化小于1%,说明该抗体具有良好的物理稳定性,并且对自缔合和聚集作用有抗性。

[0078] 表6:物理稳定性样品的百分比HMW

	通过 SEC 测定的% HMW					
	pH4	pH5	pH6	pH7	pH8	
[0079]	初始样品	0.26	0.32	0.40	0.50	1.31
	25°C 下 4 周	0.37	0.44	0.51	0.66	2.10
	40°C 下 4 周	20.34	1.15	1.02	1.32	3.41

序列HCDR1 (SEQ ID NO: 1):

GFPFSKLG MV

HCDR2 (SEQ ID NO: 2):

TISSGGOYTYYPDSVK G

HCDR3 (SEQ ID NO: 3):

EGISFQGGTYTYVMD Y

LCDR1 (SEQ ID NO: 4):

RSSKSLLHRNGITYSY

LCDR2 (SEQ ID NO: 5):

QLSNLAS

[0080]

LCDR3 (SEQ ID NO: 6):

YQNLEPLT

HCVR (SEQ ID NO: 7):EVQLVESGGGLVKPGQSLRLSCAASGFPFSKLG MVWVRQAPGKGLEWVSTI SSG  
GGYTYYPDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGISFQGGTY  
TYVMDYWQGTLVTVSSLCVR (SEQ ID NO: 8):DIVMTQSPLSLPVTPGE PASISCRSSKSLLHRNGITYSYWYLQKPGQSPQLIYQLS  
NLASGVPDFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCYQNLEPLTFGQGTKVEIKHC (SEQ ID NO: 9):EVQLVESGGGLVKPGQSLRLSCAASGFPFSKLG MVWVRQAPGKGLEWVSTI SSG  
GGYTYYPDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGISFQGGTY

TYVMDYWQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT  
 VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTK  
 VDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQE  
 DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKC  
 KVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDL  
 AVEWESNGOPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEA  
 LHNHYTQKSLSLSLG

LC (SEQ ID NO: 10):

DIVMTQSPLSLPVTPGEPAISCRSSKSLLHRNGITYSYWYLQKPGQSPQLLIYQLS  
 NLASGVPDFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCYQNLELPLTFGQGTKVEIK  
 RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES  
 VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

RC cDNA (SEQ ID NO: 11):

[0081]

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTAAAGCCTGGGGGGTCCC  
 TGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCCCGTTCACTTAAGCTCGGCATGGTT  
 TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAACCATTAGTA  
 GTGGTGGTGGTTACACATACTATCCAGACACTGTGAAGGGCGGTTACCAT  
 CTCCAGAGACAATGCCAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGA  
 GCGAGGACACGGCGTATATTACTGTGCAGAGAGAAGGAATTAGCTTCAGG  
 GTGGCACCTACACTTATGTTATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACC  
 GTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCGCTAGCGCCCTGCTC  
 CAGGAGCACCTCCGAGAGACAGCCGCCCTGGCTGCCCTGGTCAAGGACTAC  
 TTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCG  
 TGACACACCTTCCCGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC  
 GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAAGCTGGCACGAAGACCTACACCTGCAACG  
 TAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCAAATA  
 TGGTCCCCCATGCCACCCCTGCCAGCACCTGAGGGCCGCCGGGGACCATCA  
 GTCTTCCCTGTTCCCCAAAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCGGACCCC  
 TGAGGTACGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAG  
 TTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAGCCGC

GGGAGGAGCAGTTAACACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCT  
 GCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAGGTCTCCAACAA  
 AGGCCTCCCGTCCTCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCAAAGGGCAGCCC  
 CGAGAGCCACAGGTGTACACCCCTGCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGA  
 ACCAGGTCAAGCTGACCTGCCCTGGTCAAAGGCTTACCCCAGCGACATGCC  
 GTGGACTGGAAAGCAATGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCCACGCC  
 CCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCCTCTACAGCAGGCTAACCGTGG  
 CAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGAAATGTCTCTCATGCTCCGTGATGCATGAG  
 GCTCTGCACAAACCACTACACACAGAACGCTCTCCCTGTCTCTGGGTTGA

LCeDNA (SEQ ID NO: 12)

GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCGTACCCCTGGAGAGCC  
 GCCCTCCATCTCCGCAGGTCTAGTAAGAGTCTTACATCGTAATGGCATCA  
 CTTATTCTGATTGGTACCTGCAGAACCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATC  
 TATCAGCTGTOAACCTTGCCTCAGGAGTCCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGG  
 GTCAGGCACITGATTACACTGAAAATCAGCAGGGTGGAGGCTGAGGATGTT  
 GGAGTTTATTACTGCTATCAAAATCTAGAACCTCCGCTCACGTTGGCCAGGG  
 CACCAAGGTGGAAATCAAACGGACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCACTTCC  
 CCCCCATCTGAGCAGGAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGCTGCTG  
 AATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCC  
 TCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGGACAGCAAGGACA  
 GCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCGTGAGCAAAGCAGACTACGAGAA  
 ACACAAAGTCTACGCCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTGCCCGTC  
 ACAAAAGAGCTCAACAGGGAGAGTGTAA

hPCSK9 (SEQ ID NO: 13):

RAQEDEDGDYEELVLALRSEEDGLAEAPEHGTATFHRCAKDPWRLPGTYVVVL  
 KEETHLSQSERTARRLQAQAARROYLTILHVFHGLLPGFLVKMSGDLLELALKL  
 PHVDYIEEDSSVFAQSIPWNLERITPPRYRADEYQPPDGGSLEVYLLDTSIQSDH  
 REIEGRVMVTDFENVPEEDGTRFHRQASKCDSHGTHLAGVVSGRDAGVAKGAS  
 MRSLRVLNCGKGTVSGTLIGLEFIRSQLVQPVGPLVVLLPLAGGYSRVLNAAC  
 QRLARAGVVLVTAAGNFRDDACLYSPASAPEVITVGATNAQDQPVTLGTGTF

[0082]

GRCVDLFAPGEDIIGASSDCSTCFVSQSGTSQAAAHVAGIAAMMLSAEPELTLAB  
LRQRЛИHFSAKDViNEAWFPEDQRVLTPNLVAALPPSTHGAGWQLFCRTVWSAH  
SGPTRMATAVARCAPDEELLSCSSFSRSGKRRGERMEAQGGKLVCRAHNAFGGE  
CVYAIARCCLLPQANCSVHTAPPAEASMGTRVHCHQQGHVLTGCSHHWEVEDL  
GTHKPPVLRPRGQPNCVGHREASHASCCHAPGLECKVKEHGIPAPQEQTVCAC  
EEGWTLTGCALPGTSHVILGAYAVDNTCVVRSRDVSTTGSTSEGAYTAVAICCR  
SRHLAQASQELQDVHHHHHH

bPCSK9\_160-181 (SEQ ID NO: 14):

RITPPRYRADEYQPPDGGSVLVE

bPCSK9\_166-181 (SEQ ID NO: 15):

[0083] YRADEYQPPDGGSVLVE

bPCSK9\_163-174 (SEQ ID NO: 16):

PPRYRADEYQPP

C-末端截短的 bPCSK9 (SEQ ID NO: 17):

QEDEDGDYEELVIALRSEEDGLAEAPEHGTATFHRCAKDPWRLPGTYVVVLKE  
ETHLSQSERTARRLQAQAARRGYLTKILHVFHGLPGFLVKMSGDLLELALKLPH  
VDYIEEDSSVFAQSIPWNLERITPPRYRADEYQPPDGGSVLVEVYLLDTSIQSDHREI  
EGRVMVTDFENVPEEDGTRFHRQASKCDSHGTHLAGVVSGRDAGVAKGASMRS  
LRVLNCQGKGTVSGTLIGLEFIRKSQQLVQPVGPLVLLLPLAGGYSRVLNAACQRL  
ARAGVYLVTAAGNFRDDAELYSPASAPEVITVGATNAQDQPVTLGTI.GTNFGRC  
VDLFAPGEDIIGASSDCSTCFVSQSGTSQAAAHVAGIAAMMLSAEPEL

## 序列表

<110> Eli Lilly and Company

<120> 针对PCSK9的抗体及其用途

<130> X19477

<150> 61/535625

<151> 2011-09-16

<160> 17

<170> PatentIn版本3.5

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 1

Gly Phe Pro Phe Ser Lys Leu Gly Met Val

1 5 10

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 合成

<400> 2

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

Gly

<210> 3  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> 人工

<220>  
<223> 合成

<400> 3

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

<210> 4  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> 人工

<220>  
<223> 合成

<400> 4

Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Arg Asn Gly Ile Thr Tyr Ser Tyr  
1 5 10 15

<210> 5  
<211> 7

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 合成

<400> 5

Gln Leu Ser Asn Leu Ala Ser

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 合成

<400> 6

Tyr Gln Asn Leu Glu Leu Pro Leu Thr

1 5

<210> 7

<211> 125

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 合成

<400> 7

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Pro Phe Ser Lys Leu  
 20 25 30

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

Ser Thr Ile Ser Ser Gly Gly Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
 50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Gly Ile Ser Phe Gln Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Val Met  
 100 105 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125

<210> 8

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 合成

<400> 8

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

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

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

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

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

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

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

<210> 9

<211> 451

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 合成

<400> 9

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

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

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

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser  
180 185 190

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys  
195 200 205

Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu  
210 215 220

Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala  
225 230 235 240

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr  
405 410 415

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

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

Ser Leu Gly  
450

<210> 10

<211> 219

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 合成

<400> 10

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

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

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

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

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

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

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

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> 11

<211> 1356

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 合成

<400> 11

gaggtgcagc tggtgaggte tgggggaggc ttggtaaagc ctggggggtc cctgagactc        60

tcctgtcagc cctctggatt cccgttcaagt aagctcgca tggttgggt ccgccaggct        120

ccagggaaagg ggctggagtg ggtctcaacc attagtagtg gtggtggtt cacatactat        180

ccagacagtg tgaaggggcg gttcaccatc tccagagaca atgccaagaa ctcactgtat	240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gagagaagga	300
attagcttc agggtggcac ctacacttat gttatggact actggggcca gggcacccctg	360
gtcaccgtct cctcagcctc caccaagggc ccatcggtct tcccgctagc gccctgctcc	420
aggagcacct cegagagcac agccgcctg ggctgcctgg tcaaggacta cttccccaa	480
ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc ctgaccagcg gcgtgcacac cttccggct	540
gtcctacagt cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc	600
ttggcacga agacctacac ctgcaacgta gatcacaagg ccagcaacac caagggtggac	660
aagagagttg agtccaaata tggccccca tgcccacccct gcccagcacc tgaggccgcc	720
gggggaccat cagtttcct gttccccca aaacccaagg acactctcat gatctccgg	780
accctgagg tcacgtgcgt ggtggggac gtgagccagg aagacccga ggtccagttc	840
aactggtagc tggatggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag	900
ttcaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaac	960
ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaaggcctcc cgtcctccat cgagaaaacc	1020
atctccaaag ccaaaggcca gccccgagag ccacagggtgt acaccctgcc cccatcccag	1080
gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctacccagc	1140
gacatcgccg tggagtggga aagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct	1200
cccggtctgg actccgacgg ctccttcttc ctctacagca ggctaaccgt ggacaagagc	1260
aggtggcagg agggaaatgt cttctcatgc tccgtatgc atgaggctct gcacaaccac	1320

tacacacaga agagcctctc cctgtctctg ggttga	1356
<210> 12	
<211> 660	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 合成	
<400> 12	
gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgta cccctggaga gccggcctcc	60
atctcctgca ggtcttagtaa gagtctctta catcgtaatg gcatcactta ttctgtattgg	120
tacctgcaga agccagggca gtctccacag ctcctgatct atcagctgtc caaccttgcc	180
tcaggaggcc cagacagggtt cagtggcagt gggtcaggca ctgattcac actgaaaatc	240
agcaggggtgg aggctgagga tggtggagtt tattactgct atcaaaatct agaacttccg	300
ctcacgttcg gccagggcac caagggtggaa atcaaacggta ctgtggctgc accatctgtc	360
ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg	420
ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtggaa aggtggataa cgccctccaa	480
tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc	540
agcagcaccc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa	600
gtcaccatc agggcctgag ctgcggcgta acaaagagct tcaacagggg agagtgcataa	660
<210> 13	
<211> 672	
<212> PRT	
<213> 人工	

<220>

<223> 合成

<400> 13

Arg Ala Gln Glu Asp Glu Asp Gly Asp Tyr Glu Glu Leu Val Leu Ala  
1 5 10 15

Leu Arg Ser Glu Glu Asp Gly Leu Ala Glu Ala Pro Glu His Gly Thr  
20 25 30

Thr Ala Thr Phe His Arg Cys Ala Lys Asp Pro Trp Arg Leu Pro Gly  
35 40 45

Thr Tyr Val Val Val Leu Lys Glu Glu Thr His Leu Ser Gln Ser Glu  
50 55 60

Arg Thr Ala Arg Arg Leu Gln Ala Gln Ala Ala Arg Arg Gly Tyr Leu  
65 70 75 80

Thr Lys Ile Leu His Val Phe His Gly Leu Leu Pro Gly Phe Leu Val  
85 90 95

Lys Met Ser Gly Asp Leu Leu Glu Leu Ala Leu Lys Leu Pro His Val  
100 105 110

Asp Tyr Ile Glu Glu Asp Ser Ser Val Phe Ala Gln Ser Ile Pro Trp  
115 120 125

Asn Leu Glu Arg Ile Thr Pro Pro Arg Tyr Arg Ala Asp Glu Tyr Gln

130 135 140

Pro Pro Asp Gly Gly Ser Leu Val Glu Val Tyr Leu Leu Asp Thr Ser  
145 150 155 160

Ile Gln Ser Asp His Arg Glu Ile Glu Gly Arg Val Met Val Thr Asp  
165 170 175

Phe Glu Asn Val Pro Glu Glu Asp Gly Thr Arg Phe His Arg Gln Ala  
180 185 190

Ser Lys Cys Asp Ser His Gly Thr His Leu Ala Gly Val Val Ser Gly  
195 200 205

Arg Asp Ala Gly Val Ala Lys Gly Ala Ser Met Arg Ser Leu Arg Val  
210 215 220

Leu Asn Cys Gln Gly Lys Gly Thr Val Ser Gly Thr Leu Ile Gly Leu  
225 230 235 240

Glu Phe Ile Arg Lys Ser Gln Leu Val Gln Pro Val Gly Pro Leu Val  
245 250 255

Val Leu Leu Pro Leu Ala Gly Gly Tyr Ser Arg Val Leu Asn Ala Ala  
260 265 270

Cys Gln Arg Leu Ala Arg Ala Gly Val Val Leu Val Thr Ala Ala Gly  
275 280 285

Asn Phe Arg Asp Asp Ala Cys Leu Tyr Ser Pro Ala Ser Ala Pro Glu  
290 295 300

Val Ile Thr Val Gly Ala Thr Asn Ala Gln Asp Gln Pro Val Thr Leu  
305 310 315 320

Gly Thr Leu Gly Thr Asn Phe Gly Arg Cys Val Asp Leu Phe Ala Pro  
325 330 335

Gly Glu Asp Ile Ile Gly Ala Ser Ser Asp Cys Ser Thr Cys Phe Val  
340 345 350

Ser Gln Ser Gly Thr Ser Gln Ala Ala Ala His Val Ala Gly Ile Ala  
355 360 365

Ala Met Met Leu Ser Ala Glu Pro Glu Leu Thr Leu Ala Glu Leu Arg  
370 375 380

Gln Arg Leu Ile His Phe Ser Ala Lys Asp Val Ile Asn Glu Ala Trp  
385 390 395 400

Phe Pro Glu Asp Gln Arg Val Leu Thr Pro Asn Leu Val Ala Ala Leu  
405 410 415

Pro Pro Ser Thr His Gly Ala Gly Trp Gln Leu Phe Cys Arg Thr Val  
420 425 430

Trp Ser Ala His Ser Gly Pro Thr Arg Met Ala Thr Ala Val Ala Arg  
435 440 445

Cys Ala Pro Asp Glu Glu Leu Leu Ser Cys Ser Ser Phe Ser Arg Ser  
450 455 460

Gly Lys Arg Arg Gly Glu Arg Met Glu Ala Gln Gly Gly Lys Leu Val  
465 470 475 480

Cys Arg Ala His Asn Ala Phe Gly Gly Glu Gly Val Tyr Ala Ile Ala  
485 490 495

Arg Cys Cys Leu Leu Pro Gln Ala Asn Cys Ser Val His Thr Ala Pro  
500 505 510

Pro Ala Glu Ala Ser Met Gly Thr Arg Val His Cys His Gln Gln Gly  
515 520 525

His Val Leu Thr Gly Cys Ser Ser His Trp Glu Val Glu Asp Leu Gly  
530 535 540

Thr His Lys Pro Pro Val Leu Arg Pro Arg Gly Gln Pro Asn Gln Cys  
545 550 555 560

Val Gly His Arg Glu Ala Ser Ile His Ala Ser Cys Cys His Ala Pro  
565 570 575

Gly Leu Glu Cys Lys Val Lys Glu His Gly Ile Pro Ala Pro Gln Glu  
580 585 590

Gln Val Thr Val Ala Cys Glu Glu Gly Trp Thr Leu Thr Gly Cys Ser  
595 600 605

Ala Leu Pro Gly Thr Ser His Val Leu Gly Ala Tyr Ala Val Asp Asn  
610 615 620

Thr Cys Val Val Arg Ser Arg Asp Val Ser Thr Thr Gly Ser Thr Ser  
625 630 635 640

Glu Gly Ala Val Thr Ala Val Ala Ile Cys Cys Arg Ser Arg His Leu  
645 650 655

Ala Gln Ala Ser Gln Glu Leu Gln Asp Val His His His His His  
660 665 670

<210> 14

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 合成

<400> 14

Arg Ile Thr Pro Pro Arg Tyr Arg Ala Asp Glu Tyr Gln Pro Pro Asp  
1 5 10 15

Gly Gly Ser Leu Val Glu  
20

<210> 15

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 合成

<400> 15

Tyr Arg Ala Asp Glu Tyr Gln Pro Pro Asp Gly Gly Ser Leu Val Glu  
1 5 10 15

<210> 16

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 合成

<400> 16

Pro Pro Arg Tyr Arg Ala Asp Glu Tyr Gln Pro Pro  
1 5 10

<210> 17

<211> 376

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 合成

<400> 17

Gln Glu Asp Glu Asp Gly Asp Tyr Glu Glu Leu Val Leu Ala Leu Arg  
1 5 10 15

Ser Glu Glu Asp Gly Leu Ala Glu Ala Pro Glu His Gly Thr Thr Ala  
 20 25 30

Thr Phe His Arg Cys Ala Lys Asp Pro Trp Arg Leu Pro Gly Thr Tyr  
 35 40 45

Val Val Val Leu Lys Glu Glu Thr His Leu Ser Gln Ser Glu Arg Thr  
 50 55 60

Ala Arg Arg Leu Gln Ala Gln Ala Ala Arg Arg Gly Tyr Leu Thr Lys  
 65 70 75 80

Ile Leu His Val Phe His Gly Leu Leu Pro Gly Phe Leu Val Lys Met  
 85 90 95

Ser Gly Asp Leu Leu Glu Leu Ala Leu Lys Leu Pro His Val Asp Tyr  
 100 105 110

Ile Glu Glu Asp Ser Ser Val Phe Ala Gln Ser Ile Pro Trp Asn Leu  
 115 120 125

Glu Arg Ile Thr Pro Pro Arg Tyr Arg Ala Asp Glu Tyr Gln Pro Pro  
 130 135 140

Asp Gly Gly Ser Leu Val Glu Val Tyr Leu Leu Asp Thr Ser Ile Gln  
 145 150 155 160

Ser Asp His Arg Glu Ile Glu Gly Arg Val Met Val Thr Asp Phe Glu  
 165 170 175

Asn Val Pro Glu Glu Asp Gly Thr Arg Phe His Arg Gln Ala Ser Lys  
180 185 190

Cys Asp Ser His Gly Thr His Leu Ala Gly Val Val Ser Gly Arg Asp  
195 200 205

Ala Gly Val Ala Lys Gly Ala Ser Met Arg Ser Leu Arg Val Leu Asn  
210 215 220

Cys Gln Gly Lys Gly Thr Val Ser Gly Thr Leu Ile Gly Leu Glu Phe  
225 230 235 240

Ile Arg Lys Ser Gln Leu Val Gln Pro Val Gly Pro Leu Val Val Leu  
245 250 255

Leu Pro Leu Ala Gly Gly Tyr Ser Arg Val Leu Asn Ala Ala Cys Gln  
260 265 270

Arg Leu Ala Arg Ala Gly Val Val Leu Val Thr Ala Ala Gly Asn Phe  
275 280 285

Arg Asp Asp Ala Cys Leu Tyr Ser Pro Ala Ser Ala Pro Glu Val Ile  
290 295 300

Thr Val Gly Ala Thr Asn Ala Gln Asp Gln Pro Val Thr Leu Gly Thr  
305 310 315 320

Leu Gly Thr Asn Phe Gly Arg Cys Val Asp Leu Phe Ala Pro Gly Glu  
325 330 335

Asp Ile Ile Gly Ala Ser Ser Asp Cys Ser Thr Cys Phe Val Ser Gln  
340 345 350

Ser Gly Thr Ser Gln Ala Ala Ala His Val Ala Gly Ile Ala Ala Met  
355 360 365

Met Leu Ser Ala Glu Pro Glu Leu  
370 375