



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102576018 A

(43) 申请公布日 2012. 07. 11

(21) 申请号 201080049529. 2

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2010. 10. 29

G01N 33/53(2006. 01)

(30) 优先权数据

61/256, 752 2009. 10. 30 US

61/368, 081 2010. 07. 27 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 05. 02

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2010/054595 2010. 10. 29

(87) PCT申请的公布数据

W02011/053743 EN 2011. 05. 05

(71) 申请人 默沙东公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 M. 伊彻托夫金 Z. 陈 C. 勒格朗

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

代理人 李慧惠 刘健

权利要求书 2 页 说明书 16 页

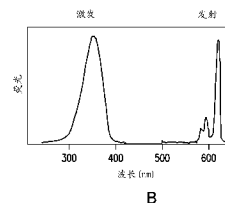
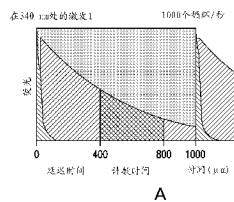
序列表 20 页 附图 3 页

(54) 发明名称

PCSK9 免疫测定

(57) 摘要

使用 PCSK9 拮抗剂的方法。更具体地, 利用免疫测定法测量生物样品的循环 PCSK9 水平的方法。



1. 一种测量生物样品的循环 PCSK9 水平的方法,其包括以下步骤:对获自受试者的生物样品进行免疫测定和将所述样品的 PCSK9 水平与具有已知 PCSK9 浓度的标准物相比较,其中包被或捕获抗体为 AX213 并且检测抗体为 AX1。

2. 权利要求 1 的方法,其中 AX213 和 AX1 为全长抗体。

3. 权利要求 1 的方法,其中 AX213 包括含有 SEQ ID NO: 3 的可变轻链("VL")序列和含有 SEQ ID NO: 7 的可变重链("VH")序列,并且 AX1 包括含有 SEQ ID NO: 15 的可变轻链("VL")序列和含有 SEQ ID NO: 19 的可变重链("VH")序列。

4. 权利要求 1 的方法,其中 AX213 包括含有 SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 11 的轻链和含有 SEQ ID NO: 9 的重链,以及 AX1 包括 (a) 含有 SEQ ID NO: 13 或 SEQ ID NO: 23 的轻链和 (b) 含有 SEQ ID NO: 21 的重链。

5. 权利要求 1 的方法,其中进行免疫测定包括:(a) 将生物样品沉积在具有固定的抗 PCSK9 抗体 AX213 的支持物上;(b) 将具有沉积在其上的生物样品的支持物与具有可检测的标记的抗 PCSK9 抗体 AX1 接触;和 (c) 检测所述标记。

6. 权利要求 1 的方法,其中所述免疫测定为固相免疫测定。

7. 权利要求 6 的方法,其中所述固相免疫测定为解离增强镧系元素荧光免疫测定(DELFI A)。

8. 权利要求 1 的方法,其中所述样品选自血液、血浆和血清。

9. 权利要求 8 的方法,其中所述血液、血浆或血清来自人。

10. 一种用于对已与假定的 PCSK9 拮抗剂接触的生物样品进行免疫测定的方法,其包括 (a) 将生物样品沉积在具有固定的抗 PCSK9 抗体 AX213 的支持物上;(b) 将具有沉积在其上的生物样品的支持物与具有可检测标记的抗 PCSK9 抗体 AX1 接触;(c) 检测标记;和 (d) 将所述样品中的 PCSK9 水平与具有已知 PCSK9 浓度的标准物相比较。

11. 权利要求 10 的方法,其中 AX213 和 AX1 为全长抗体。

12. 权利要求 10 的方法,其中 AX213 包括含有 SEQ ID NO: 3 的可变轻链("VL")序列和含有 SEQ ID NO: 7 的可变重链("VH")序列,以及 AX1 包括含有 SEQ ID NO: 15 的可变轻链("VL")序列和含有 SEQ ID NO: 19 的可变重链("VH")序列。

13. 权利要求 10 的方法,其中 AX213 包括含有 SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 11 的轻链和含有 SEQ ID NO: 9 的重链,以及 AX1 包括 (a) 含有 SEQ ID NO: 13 或 SEQ ID NO: 23 的轻链和 (b) 含有 SEQ ID NO: 21 的重链。

14. 权利要求 10 的方法,其中所述免疫测定为固相免疫测定。

15. 权利要求 14 的方法,其中所述固相免疫测定为解离增强镧系元素荧光免疫测定(DELFI A)。

16. 权利要求 10 的方法,其中所述样品选自血液、血浆和血清。

17. 权利要求 16 的方法,其中所述血液、血浆或血清来自人。

18. 一种用于测量生物样品的循环 PCSK9 水平的试剂盒,其包括:

a). 生物样品收集设备;

b). 包括免疫测定的组合物,其包含包被或捕获抗体和检测抗体;和

c). 用于检测样品中 PCSK9 抗原与免疫测定中抗体之间的反应的装置;

其中所述包被或捕获抗体为 AX213 并且检测抗体为 AX1。

19. 权利要求 18 的试剂盒,其中 AX213 和 AX1 为全长抗体。

20. 权利要求 19 的方法,其中 AX213 包括含有 SEQ ID NO: 3 的可变轻链 (“VL”) 序列和含有 SEQ ID NO: 7 的可变重链 (“VH”) 序列,以及 AX1 包含含有 SEQ ID NO: 15 的可变轻链 (“VL”) 序列和含有 SEQ ID NO: 19 的可变重链 (“VH”) 序列。

21. 权利要求 20 的方法,其中 AX213 包括含有 SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 11 的轻链和含有 SEQ ID NO: 9 的重链,以及 AX1 包括 (a) 含有 SEQ ID NO: 13 或 SEQ ID NO: 23 的轻链和 (b) 含有 SEQ ID NO: 21 的重链。

PCSK9 免疫测定

[0001] 发明背景

前蛋白转化酶枯草溶菌素 9 型 (Proprotein convertase subtilisin-kexin type 9) (PCSK9), 也称为神经细胞凋亡调节转化酶 1 (NARC-1), 为被鉴定为分泌型亚麻酶 (subtilase) 家族的第 9 成员的蛋白酶 K 样亚麻酶 (Seidah, N.G. 等, 2003 Proc Natl Acad Sci USA 100:928-933)。PCSK9 在能够增殖和分化的细胞例如肝细胞、肾间充质细胞、肠道回肠、结肠上皮和胚胎脑端脑神经元中表达 (Seidah 等, 2003)。

[0002] 已对人 PCSK9 的基因进行了测序, 并且发现其约为 22-kb 长, 具有 12 个外显子, 编码 692 个氨基酸的蛋白质 (NP_777596.2)。在几个专利申请包括: PCT 公开号 WO 01/31007、WO 01/57081、WO 02/14358、WO 01/98468、WO 02/102993、WO 02/102994、WO 02/46383、WO 02/90526、WO 01/77137 和 WO 01/34768; US 公开号 US 2004/0009553 和 US 2003/0119038 以及欧洲公开号 EP 1 440 981、EP 1 067 182 和 EP 1 471 152 中公开和/或要求保护 PCSK9。

[0003] PCSK9 牵涉胆固醇稳态 (cholesterol homeostasis), 因为其看起来在胆固醇生物合成或摄取中具有特殊作用。在胆固醇喂养的大鼠 (cholesterol-fed rat) 的研究中, Maxwell 等发现 PCSK9 以与参与胆固醇生物合成的其它基因相似的方式被下调 (Maxwell 等, 2003 J. Lipid Res. 44:2109-2119)。PCSK9 的表达受固醇调节元件结合蛋白 (SREBP) 调节, 这可在参与胆固醇代谢的其它基因中被看到 (Maxwell 等, 2003)。

[0004] 此外, PCSK9 表达被他汀类药物以促成药物的降胆固醇作用的方式上调 (Dubuc 等, 2004 Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 24:1454-1459)。已显示 PCSK9 的腺病毒表达导致显著的循环低密度脂蛋白 (LDL) 的时间依赖性增加 (Benjannet 等, 2004 J. Biol. Chem. 279:48865-48875) 并且具有 PCSK9 基因缺失的小鼠增加了肝 LDL 受体 (LDLR) 的水平并且更快地从血浆清除 LDL (Rashid 等, 2005 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:5374-5379)。来自利用 PCSK9 瞬时转染的 HepG2 细胞的培养基, 当转移至未被转染的 HepG2 细胞时, 减少细胞表面 LDLR 的量和 LDL 的内化 (Cameron 等, 2006 Human Mol. Genet. 15:1551-1558)。还已显示添加至 HepG2 细胞的培养基的纯化的 PCSK9 具有以剂量和时间依赖性方式减少细胞表面 LDLR 的作用 (Lagace 等, 2006 J. Clin. Invest. 116:2995-3005)。

[0005] 基因 PCSK9 中的许多突变与常染色体显性高胆固醇血症 (ADH) (特征在于血浆中低密度脂蛋白 (“LDL”) 颗粒的显著升高的遗传代谢障碍) 明确相关, 该常染色体显性高胆固醇血症可导致早熟心血管功能衰竭 (premature cardiovascular failure) (例如, Abifadel 等, 2003 Nature Genetics 34:154-156; Timms 等, 2004 Hum. Genet. 114:349-353; Leren, 2004 Clin. Genet. 65:419-422)。

[0006] 因此 PCSK9 看起来在 LDL 产生的调控中起着重要作用。PCSK9 的表达或上调与增加的 LDL 胆固醇血浆水平相关, 并且 PCSK9 的表达的抑制或不存在与低 LDL 胆固醇血浆水平相关。显著地, 与 PCSK9 的序列变异相关的更低的 LDL 胆固醇水平赋予抗冠状动脉心脏病的保护作用 (Cohen, 等, 2006 N. Engl. J. Med. 354:1264-1272)。

[0007] 临床试验数据已证明 LDL 胆固醇水平的降低与冠状动脉事件 (coronary event) 的比率相关 (Law 等, 2003 BMJ 326:1423-1427)。已显示血浆 LDL 胆固醇水平的适度终生降低与冠状动脉事件的发病率的降低充分相关 (Cohen 等, 2006, 同上), 即使在具有非脂质相关心血管风险因子 (non-lipid-related cardiovascular risk factor) 的高流行性的群体中亦如此。因此, 可从 LDL 胆固醇水平的管理控制获得巨大的益处。

[0008] 因此, 期望进一步研究作为心血管疾病的治疗的靶的 PCSK9。用作 PCSK9 拮抗剂的抗体已被鉴定并且具有作为治疗剂的效用。在支持这样的研究中, 有用地是具有用于测量已被暴露于 PCSK9 拮抗剂例如抗体的生物样品的循环 PCSK9 水平的方法。

[0009] 还期望能够鉴定新型 PCSK9 拮抗剂以帮助寻找在心血管疾病的治療中有效的化合物和 / 或试剂。因此, 为了这类目的例如评估假定的 PCSK9 拮抗剂的效力, 测量生物样品的循环 PCSK9 的水平的方法是期望的。

[0010] 另外, 有用地是提供测定生物样品的循环 PCSK9 的水平试剂盒。

[0011] 发明概述

本发明涉及测量生物样品的循环 PCSK9 水平的方法。所述方法包括对获自受试者的生物样品进行免疫测定和将所述样品的 PCSK9 水平与具有已知 PCSK9 浓度的标准物相比较的步骤。

[0012] 本发明还涉及用于鉴定新型 PCSK9 拮抗剂的方法, 包括对已将其与假定的 PCSK9 拮抗剂接触的生物样品进行免疫测定和将所述样品的 PCSK9 水平与具有已知 PCSK9 浓度的标准物相比较的步骤。

[0013] 本发明的其它方面涉及用于测量生物样品的循环 PCSK9 水平的试剂盒, 其中所述试剂盒包括:

- a). 生物样品收集设备;
- b). 包括免疫测定的组合物, 其包含包被或捕获抗体和检测抗体;
- 和 c). 用于检测样品的 PCSK9 抗原与免疫测定中的抗体之间的反应的装置。

[0014] 附图概述

图 1A-B 举例说明镧系元素螯合延迟时间 (Lanthanide Chelate Delay time) 和斯托克斯位移 (Stokes' shift)。

[0015] 图 2 举例说明稀释于测定缓冲液的重组人 PCSK9 标准曲线。曲线的范围为 10.26 nM 至 0.005 nM。

[0016] 图 3 举例说明在 3 周的时间内在不同的 3 天显示的 6 个正常健康志愿者的生物差异 (biological variability)。浓度以 nM 显示。

[0017] 发明详述

本发明涉及测量生物样品的循环 PCSK9 水平的方法, 包括对获自受试者的生物样品进行免疫测定和将所述样品的 PCSK9 水平与具有已知 PCSK9 浓度的标准物相比较的步骤。本测定法具有用于测量人 PCSK9 的特殊效用。

[0018] 免疫测定是利用特异性结合分析物的抗体的分析或方法。免疫测定的特征在于使用至少一种特定的抗体的特异性结合性质来分离、靶向或定量分析物。

[0019] 在具体的实施方案中, 免疫测定包括步骤:(a) 将生物样品沉积在具有与其结合的固定的结合的抗 PCSK9 抗体 AX213 的支持物上;(b) 将具有沉积在其上的生物样品的支

持物与具有可检测标记的抗 PCSK9 抗体 AX1 接触 ;和 (c) 检测所述标记。

[0020] PCSK9 是指前蛋白转化酶枯草溶菌素 9 型 (PCSK9), 也称为神经细胞凋亡调节转化酶 1 (NARC-1), 为被鉴定为分泌型亚麻酶家族的第 9 成员的蛋白酶 K 样亚麻酶 (Seidah, N. G., 等, 2003 Proc Natl Acad Sci USA 100:928-933), 如文献中所定义的并且, 除非另有所指, 否则包括可溶性和不溶性形式。术语在适当的上下文中可以指其抗原性成分或基因座。

[0021] AX213 为包括含有 SEQ ID NO: 3 的可变轻链 (“VL”) 序列和含有 SEQ ID NO: 7 的可变重链 (“VH”) 序列的抗体分子。在具体实施方案中, AX213 为全长抗体分子。在具体实施方案中, AX213 为 IgG 抗体分子, 和在具体实施方案中, 为 IgG2。在具体实施方案中, AX213 包括 (a) 含有 SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 11 的轻链和 (b) 含有 SEQ ID NO: 9 的重链。

[0022] AX1 为包括含有 SEQ ID NO: 15 的可变轻链 (“VL”) 序列和含有 SEQ ID NO: 19 的可变重链 (“VH”) 序列的抗体。在具体实施方案中, AX1 为全长抗体分子。在具体实施方案中, AX213 为 IgG 抗体分子, 以及在本实施方案中, 为 IgG2。在具体实施方案中, AX213 包含 (a) 含有 SEQ ID NO: 13 或 SEQ ID NO: 23 的轻链和 (b) 含有 SEQ ID NO: 21 的重链。

[0023] 抗体分子可以例如以完整 (intact) 免疫球蛋白的形式或以许多良好表征的片段 (通过例如利用不同肽酶消化产生的) 的形式存在。公认的免疫球蛋白基因包括 κ 、 λ 、 α 、 γ 、 δ 、 ϵ 和 μ 恒定区基因, 以及许多免疫球蛋白可变区基因。轻链被分类为 γ 、 μ 、 α 、 δ 或 ϵ , 其反过来分别定义免疫球蛋白种类 IgG、IgM、IgA、IgD 和 IgE。“完整” (“whole”) 抗体或“全长” (“full length”) 抗体通常是指包括通过二硫键链间连接的两条重链 (H) 和两条轻链 (L) 的蛋白质, 其包括 (1) 就重链而言, 可变区 (在本文中缩写为 “V_H”) 和重链恒定区 (其包括 3 个结构域 C_{H1}、C_{H2} 和 C_{H3}); 和 (2) 就轻链而言, 轻链可变区 (在本文中缩写为 “V_L”) 和轻链恒定区 (其包括 1 个结构域 C_L)。胃蛋白酶 (pepsin) 在铰链区内二硫键下方消化抗体, 从而产生 F(ab)'₂, 其本身为通过二硫键连接成 V_H-C_{H1} 的轻链的 Fab 的二聚体。可在温和条件下还原 F(ab)'₂ 以断裂铰链区内的二硫键, 从而将 F(ab)'₂ 二聚体转变成 Fab' 单体。Fab' 单体本质上为具有断裂的铰链区的部分的 Fab。虽然根据完整抗体的消化定义不同的抗体片段, 但本领域技术人员将理解, 可化学地或通过利用重组 DNA 法从头合成这样的 Fab' 片段。因此, 术语抗体, 如本文中所使用的, 还包括通过完整抗体的修饰产生的抗体片段或使用重组 DNA 法从头合成的抗体片段。

[0024] 在具体实施方案中, 在使用之前独立地分离 AX213 和 AX1 抗体分子。“分离的”, 如本文中所使用的, 是指使它们与自然界中发现的不同的性质。差异可以是例如它们具有与在自然界中发现的不同的纯度, 或它们具有与在自然界中发现的不同的结构或形成与自然界中发现的不同的结构的一部分。未在自然界中发现的结构例如包括重组人免疫球蛋白结构。未在自然界中发现的结构的其他实例是基本上不含其它细胞材料的抗体分子。

[0025] 可检测标记, 如本文中所使用的, 是指掺入或附着至抗体分子的另一种分子或试剂。在一个实施方案中, 标记是可检测标记物, 例如放射标记的氨基酸或至可通过标记的抗生物素蛋白 (例如, 含有可通过光学或比色法检测的荧光标记物或酶促活性的链霉抗生物素蛋白) 检测的生物素基部分的多肽的附着。标记多肽或糖蛋白的多种方法在本领域是已知的并且可被使用。用于多肽的标记的实例包括但不限于下列: 放射性同位素或放射性核

素（例如， ^3H 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I ）、荧光标记（例如，FITC、罗丹明、镧系元素磷光体）、酶促标记（例如，辣根过氧化物酶、 β -半乳糖苷酶、虫荧光素酶、碱性磷酸酶）、化学发光标记物、生物素基团、被第二报告分子识别的预定多肽表位（例如，亮氨酸拉链对序列、第二抗体的结合位点、金属结合结构域、表位标签）、磁性试剂例如钆螯合剂、毒素例如百日咳毒素、紫杉醇、细胞松弛素 B、短杆菌肽 D、溴化乙锭、依米丁、丝裂霉素、依托泊苷、tenoposide、长春新碱、长春碱、秋水仙素、多柔比星、柔红霉素、二羟基炭疽菌素二酮、米托蒽醌、光辉霉素、放线菌素 D、1-脱去氢睾酮、糖皮质激素、普鲁卡因、丁卡因、利多卡因、普萘洛尔和嘌呤霉素及其类似物或同源物。在某些实施方案中，标记通过不同长度的间隔臂连接以减小潜在位阻。

[0026] 在本发明的具体实施方案中，免疫测定法为固相免疫测定法。在具体实施方案中，固相免疫测定法为解离增强镧系元素荧光免疫测定法 (dissociation-enhanced lanthanide fluorescence immunoassay) (DELFI A)。然而，使用对于本领域技术人员来说是公知的任何基于溶液的免疫测定法或固相免疫测定法在本发明的范围内。这类测定包括但不限于，使用磁性珠粒代替酶、ELISA、放射性同位素或荧光部分（荧光免疫测定法）作为标记的测定法。

[0027] 生物样品选自血液、血浆和血清。在具体实施方案中，血液、血浆和血清源自哺乳动物受试者，包括但不限于人。

[0028] 本发明还涉及用于在假定的 PCSK9 拮抗剂存在的情况下测量 PCSK9 的方法。所述方法包括步骤：对已与假定的 PCSK9 拮抗剂接触的生物样品进行免疫测定，并将所述样品的 PCSK9 水平与具有已知 PCSK9 浓度的标准物相比较。在具体实施方案中，所述方法包括 (a) 将生物样品沉积在具有固定的抗 PCSK9 抗体 AX213 的支持物上；(b) 将具有沉积在其上的生物样品的支持物与具有可检测的标记的抗 PCSK9 抗体 AX1 接触；(c) 检测所述标记；和 (d) 将所述样品的 PCSK9 水平与具有已知 PCSK9 浓度的标准物相比较。在优选实施方案中，免疫测定是固相免疫测定。在更优选实施方案中，固相免疫测定为解离增强镧系元素荧光免疫测定 (DELFI A)。

[0029] 在具体实施方案中，将抗 PCSK9 固定的抗体 AX213 包被在平板上（在具体实施方案中，黑色高结合测定平板）过夜。在具体实施方案中，用 100-500ng/孔的 AX213 抗体在 4°C 下包被黑色高结合测定平板过夜。

[0030] 所述生物样品选自血液、血浆和血清。在具体实施方案中，血液、血浆和血清源自哺乳动物受试者，包括但不限于人。

[0031] 在具体实施方案中，将 10-50 ng/孔的生物素化 AX1IgG 用于抗原检测。

[0032] 术语“拮抗剂”或其衍生词（例如，“拮抗”）的使用是指受试分子或试剂可拮抗、对抗、抵消、抑制、中和或减弱 PCSK9 的功能的事实。在具体实施方案中，拮抗剂减弱 PCSK9 的功能或活性至少 10% 或至少 20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 或 95%。本文中提及的 PCSK9 功能或 PCSK9 活性是指由 PCSK9 驱动的，需要 PCSK9 的，或由 PCSK9 加重的或增强的任何功能或活性。

[0033] 本发明另外地涉及用于测量生物样品的循环 PCSK9 水平的试剂盒，其包括：

- a). 生物样品收集设备；
- b). 包括免疫测定的组合物，其包含包被或捕获抗体和检测抗体；

和 c)。用于检测样品中的 PCSK9 抗原与免疫测定中的抗体之间的反应的装置；其中所述包被或捕获抗体为 AX213 并且检测抗体为 AX1。

[0034] 在具体实施方案中，试剂盒包括固定在支持物上的 AX213 抗体。

[0035] 试剂盒通常但不必包括指示试剂盒的内容物的期望的用途的标记。术语标签 (label) 在试剂盒的上下文中包括在试剂盒上或与试剂盒一起提供的或另外试剂盒附带的任何书面或记录材料。

[0036] 提供下列实施例以举例说明本发明而不将其限于此。在本文中使用下列首字母缩写表：

BSA:	牛血清白蛋白
ddH ₂ O	双蒸馏水
EDTA:	乙二胺四乙酸
IPTG:	异丙基-β-d-硫代半乳糖吡喃糖苷
PBS:	磷酸缓冲盐溶液
PBST 或 PBS-T:	含 Tween 的磷酸缓冲盐溶液
TBS-T:	含 Tween 的 Tris- 缓冲盐溶液。

[0037] 实施例 1

PCSK9 拮抗剂 AX213 & AX1

本测定中使用的 PCSK9 拮抗剂为抗体 AX213 和 AX1。AX213 和 AX1 公开于 2009 年 10 月 30 日提交的共同未决申请系列号 61/256,732 和 61/256,720 (将其通过引用整体并入本文)。

[0038] 针对 PCSK9 蛋白的 PDL1 噬菌体文库淘选 (panning): 通过针对人 PCSK9 淘选 VH3/Vκ3 和 VH3/Vκ1 PDL1 Abmaxis 合成人 Fab 文库鉴定了 AX1 和 AX213。以 1-10 μg/ml 的浓度将抗原蛋白 PCSK9 包被在 Maxisorp 孔条 (Maxisorp well stripe) (Nunc-Immuno Modules) 上, 于 4°C 过夜。对于每一个文库制备多个抗原的孔。将 PBS 中 5% 牛奶用于在室温下封闭包被的孔 1-2 小时。在用 PBS 洗涤后, 将 100 μl 的噬菌体文库溶液 / 孔 (通常 1-5 × 10¹² 于 2% 牛奶-PBS 中) 加入 4 个平行孔, 温育设计的时间长度 (通常 1-2 小时)。在用 PBST 和 PBS 洗涤数次后, 利用新鲜制备的 ddH₂O 中的 1.4% 三乙胺从孔洗脱结合的噬菌体 (在室温下温育 10 分钟), 然后立即通过加入 50 μl 1M Tris-HCl (pH 6.8) 进行中和。

[0039] 通过下列步骤进一步扩增洗脱的富集的噬菌体库: 首先, 用洗脱的噬菌体于 37°C 感染 TG1 细胞 1 小时, 然后将其涂铺在具有 2% 葡萄糖和 100 μg/ml 羧苄西林的 2YT 琼脂平板上, 进行过夜培养。因此, 从平板收获具有富集的噬菌粒文库的 TG1 细胞, 并利用辅助噬菌体 GMCT 感染所述细胞, 进行 1 小时。随后通过在 22°C 下在 2xYT / 羧苄西林 / 卡那霉素中过夜生长来从具有文库噬菌粒和 GMCT 辅助噬菌体基因组的那些 TG1 细胞产生 Fab- 展示噬菌体。通过用 PEG/NaCl 沉淀从过夜培养物上清液纯化噬菌粒颗粒, 并将其重悬浮于 PBS 中。再重复一次 PEG- 沉淀。通过 OD₂₆₈ 测量测定噬菌体浓度。

[0040] 对于扩增的第一轮噬菌体, 重复两次上述淘选过程, 以进一步富集 PCSK9 结合噬菌体。将来自 3 轮淘选的洗脱的噬菌体用于感染 TG1 细胞。从 2YT 琼脂平板挑拣具有来自第三轮淘选的噬菌粒的 TG1 细胞以进行 Fab ELISA 筛选测定。

[0041] 针对 PCSK9 结合剂的 Fab ELISA 筛选：利用 MegaPix 挑拣机 (MegaPix Picking Robot) (Genetix) 挑拣 10,000 多个来自第 3 轮淘选的克隆, 将其接种至具有 60 μ l 2YT/2% 葡萄糖 / 羧苄西林的 384-孔平板中, 在 450 rpm 振荡的条件下于 30°C 培养过夜。通过将约 1-3 μ l 来自每一个孔的过夜培养物转移至具有 50 μ l / 孔的 2YT/0.1% 葡萄糖 / 羧苄西林的新平板中来制备一式二份平板。将一式二份平板在振荡器中于 30°C 温育 6 小时, 随后加入 10 μ l / 孔的 IPTG, 终浓度为 1mM。在于 22°C 过夜培养后, 通过将溶菌酶加入每一个孔中来在 IPTG- 诱导平板中释放可溶性 Fab。

[0042] 为了检测从上述实验产生的可溶性 Fab 的抗原结合活性, 通过 5 μ g/ml 抗原的过夜包被产生抗原平板。在利用牛奶 -PBS 封闭和利用 PBST 洗涤后, 将 15-20 μ l 来自 IPGT- 诱导平板的 Fab 样品转移至抗原平板中, 在室温下进行 1-2 小时的温育。利用 PBS-T 洗涤平板 5 次, 随后加入 5% MPBS 中的 1:2000 稀释的山羊抗人 κ -HRP (SouthernBiotech Cat. No. 2060-05) 或 1:10,000 稀释的山羊抗人 Fab-HRP, 温育 1 小时。在用 PBST 洗去未结合的 HRP- 缀合物后, 随后向每一个孔中加入底物溶液 QuantaBlu WS (Pierce 15169), 并温育 5-15 分钟。通过使用激发波长 330nm 和发射检测波长 410nm 测量每一个孔的相对荧光单位 (RFU) 以测定 Fab 结合活性。

[0043] ELISA 结果显示 30 至 80% 的来自单个 PDL1 sun- 文库 (PDL1 sun-library) 的第 3 轮淘选的克隆结合抗原 PCSK9。随后将阳性克隆送去进行 DNA 测序。

[0044] 序列如下所示：

AX213

AX213 全长轻链蛋白 [SEQ ID NO: 1]

EIVLTQSPATLSLSPGERATITCRASQYVGSYLNWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPAR
FSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQVWDSSPPVVFVGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD
EQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTL
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

AX213 全长轻链核酸 [SEQ ID NO: 2]

GAAATCGTGCTGACCCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTCTGTCTCCCGGGGAACGTGCC
ACCATCACCTGCCGTGCCTCTCAGTATGTCGGCAGCTACCTGAACTGGTATCAGCAG
AAGCCAGGTCAGGCGCCACGTCTGCTGATCTACGACGCCTCTAACCGTGCCACCGGT
ATCCCAGCCCGTTTCTCTGGTTCTGGTTCTGGCACCGACTTCACCCTGACCATCTCTT
CTCTGGAACCAGAAGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGGTATGGGACAGCTCTCCTC
CTGTGGTGTTCGGTGGTGGTACCAAAGTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCAT
CTGTATTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGT
GTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATA
ACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGAC
AGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACA

CAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGA
GCTTCAACAGGGGAGAGTGT

AX213-VL [SEQ ID NO: 3], CDR 以下划线标示

EIVLTQSPATLSLSPGERATITCRASQYVGSYLNWYQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPAR
FSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQVWDSSPPVVFVGGGTKVEIK

AX213-VL [SEQ ID NO: 4]

GAAATCGTGCTGACCCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTCTGTCTCCCGGGGAACGTGCC
ACCATCACCTGCCGTGCCTCTCAGTATGTCGGCAGCTACCTGAACTGGTATCAGCAG
AAGCCAGGTCAGGCGCCACGTCTGCTGATCTACGACGCCTCTAACCGTGCCACCGGT
ATCCCAGCCCGTTTCTCTGGTTCTGGTTCTGGCACCGACTTCACCCTGACCATCTCTT
CTCTGGAACCAGAAGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGGTATGGGACAGCTCTCCTC
CTGTGGTGTTCGGTGGTGGTACCAAAGTGGAGATCAA

AX213 FD链(对于FABS)蛋白[SEQ ID NO: 5]

QVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCKASGYTFSTRYGINWVRQAPGKGLEWIGRIDPGNGGTR
YNEKFKGKATISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARANDGYSFDYWGQGLVTV
SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKHT

AX213 FD链(对于FABS)核酸[SEQ ID NO: 6]

caggtgcaattgctggaactggtggtgctggtgagccaggtggttctctgctgctgcaaggetagcgggttacaccttctctcgcta
cggtalcaactgggtgctcagcaccaggaagggctggaatggatcggtcggatcgaccagglaacgggtgactaggtacaacgaa
aagttcaagggtgagccaccalcctagagacaacttaagaacacctgacttgcatgaactctctgctgcccaggacactgcagig
tactactgcgccgctgcaaatgacgggtactcttcgactactggggcagggtagcgtggtgactgtctgagcgcgaagcaccaaaggccc
atcggtatccccctggcaccctcctcaagagcacctctggggcacagcggccctgggctgctgctgtaaggactactccccgagccg
gtgacgggtgctggaactcagcgcctgaccagcggcgtgcacacctcccgctgctctacagtcctcaggactctactccctcagcag
cgtggtgactgtgccctcagcagcttggcaccagacctacatctgcaactggaatcacaagcccagcaacactaagggtggacaagaaa
gttgagcccaaatctgtgacaaaactcacaca

AX213-VH [SEQ ID NO: 7], CDR以下划线标示

EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCKASGYTFSTRYGINWVRQAPGKGLEWIGRIDPGNGGTR
YNEKFKGKATISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARANDGYSFDYWGQGLVTV
SS

AX213-VH [SEQ ID NO: 8]

CAGGTGCAATTGCTGGAATCTGGTGGTGGTCTGGTGCAGCCAGGTGGTTCTCTGCGT
CTGTCTTGCAAGGCTAGCGGTTACACCTTCTCTCGCTACGGTATCAACTGGGTGCGT
CAGGCACCAGGTAAGGGTCTGGAATGGATCGGTCCGATCGACCCAGGTAACGGTGG
TACTAGGTACAACGAAAAGTTCAAGGGTAAGGCCACCATCTCTAGAGACAACTCTA
AGAACACCCTGTACTTGCAGATGAACTCTCTGCGTGCCGAGGACACTGCAGTGTACT
ACTGCGCCCGTGCAAATGACGGTTACTCCTTCGACTACTGGGGTCAGGGTACGCTGG
TGACTGTCTCGAGC

AX213 IGG2重链蛋白质[SEQ ID NO: 9]

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCKASGYTFSRYGINWVRQAPGKGLEWIGRIDPQNGGTR
YNEKFKGKATISRDNSKNLYLQMNSLRAEDTAVYYCARANDGYSFDYWGQGLVTV
SSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSVVTVPSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVKCCVECPPCPAPPVAGPS
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS
TFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTKGQPREPQVYITLPPSREE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSGDFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

AX213 IGG2重链核酸[SEQ ID NO: 10]

GAGGTCCAACCTTTGGAGTCTGGAGGAGGACTGGTCCAACCTGGAGGCTCCCTGAG
ACTGTCCTGTAAGGCATCTGGCTACACCTCAGCAGATATGGCATCAACTGGGTGAG
ACAGGCTCCTGGCAAGGGATTGGAGTGGATTGGCAGGATTGACCCTGGCAATGGAG
GCACCAGATACAATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCTACCATCAGCAGGGACAACAGC
AAGAACACCCTCTACCTCAAATGAACTCCCTGAGGGCTGAGGACACAGCAGTCTA
CTACTGTGCCAGGGCTAATGATGGCTACTCCTTTGACTACTGGGGACAAGGCACCCT
GGTGACAGTGTCTCTGCTAGCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTG
CTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACT
TCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAACCTCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGAC
ACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACC
GTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGATAGATCACAAGCCC
AGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTCGAGTGCCCACC
GTGCCAGCACCACTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCTTCCCCCAAACCCAA
GGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAG
CCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATA

ATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTCAGC
GTCCTCACCGTCGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGT
CTCCAACAAAGGCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGGC
AGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAG
AACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTG
GAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACA ACTACAAGACCACACCTCCCATGCT
GGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTG
GCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTA
CACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

AX213全长轻链蛋白[SEQ ID NO: 11]

EIVLTQSPATLSLSPGERATITCRASQYVGSYLNWYQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPAR
FSGSGSGTDFILTISSLEPEDFAVYYCQVWDSSPPVVFVGGGTKVEIKRTVAAPS VFIFPPSD
EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTL
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

与IGG2核酸配对的AX213 IGG轻链[SEQ ID NO: 12]

GAGATTGTGCTGACCCAGAGCCCTGCCACCCTGTCCCTGAGCCCTGGAGAGAGGGC
TACCATCACTTGTAGGGCAAGCCAATATGTGGGCTCCTACCTGAACTGGTATCAACA
GAAGCCTGGACAAGCCCCAAGACTGCTGATTTATGATGCCAGCAACAGGGCTACAG
GCATCCCTGCCAGGTTCTCTGGCTCTGGCTCTGGCACAGACTTCACCCTGACCATCTC
CTCCTTGGAACCTGAGGACTTTGCTGTCTACTACTGTCAGGTGTGGGACTCCAGCCC
TCCTGTGGTGTITGGAGGAGGCACCAAGGTGGAGATTAAGCGTACGGTGGCTGCAC
CATCTGTCTTCATCTTCCC GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGA ACTGCCTCTGT
TGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGG
ATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAG
GACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAA
ACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAA
AGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

AX1

AX1全长轻链蛋白[SEQ ID NO: 13]

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISRYLAWYQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPS
RFSGSGSGTDFILTISSLQPEDFATYYCAAYDYS LGGYVFGDGTKVEIKRTVAAPS VFIFP
PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSST
LTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

AX1全长轻链核酸[SEQ ID NO: 14]

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCTCTGTCTGCCTCTGTGGGCGACCGGGTG
 ACCATCACCTGCCGTGCCTCTCAGGATATCTCTAGGTATCTGGCCTGGTATCAGCAG
 AAGCCAGGTAAGGCGCCAAAGCTGCTGATCTACGCCGCCTCTTCTTTGCAGTCTGGT
 GTGCCATCTCGTTTCTCTGGTTCTGGTTCTGGCACCGACTTCACCCTGACCATCTCTT
 CTTTGCAGCCAGAAGACTTCGCCACCTACTACTGCGCGGCTTACGACTATTCTTTGG
 GCGGTTACGTGTTCCGGTGATGGTACCAAAGTGGAGATCAAACGTACGGTGGCTGCA
 CCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTG
 TTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGG
 ATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACACAGAGCAGGACAGCAAG
 GACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAA
 ACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAA
 AGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

AX1-VL [SEQ ID NO: 15], CDR以下划线标示

DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRASODISRYLAWYQQKPKAPKLLIYAASSLSQGVPS
 RFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCAAYDYSLGGYVFGDGTKVEIK

AX1-VL [SEQ ID NO: 16]

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCTCTGTCTGCCTCTGTGGGCGACCGGGTG
 ACCATCACCTGCCGTGCCTCTCAGGATATCTCTAGGTATCTGGCCTGGTATCAGCAG
 AAGCCAGGTAAGGCGCCAAAGCTGCTGATCTACGCCGCCTCTTCTTTGCAGTCTGGT
 GTGCCATCTCGTTTCTCTGGTTCTGGTTCTGGCACCGACTTCACCCTGACCATCTCTT
 CTTTGCAGCCAGAAGACTTCGCCACCTACTACTGCGCGGCTTACGACTATTCTTTGG
 GCGGTTACGTGTTCCGGTGATGGTACCAAAGTGGAGATCAAA

AX1 FD链(对于FABS)蛋白[SEQ ID NO: 17]

EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCKASGFTFTSYMHVWRQAPGKGLEWIGRINPDSGSK
 YNEKFKGRATISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGRLSWDFDVGQGLVT
 VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVL
 QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKHT

AX1 FD链(对于FABS)核酸[SEQ ID NO: 18]

gaagtgcagctgctggaatcgggtggctggcagccaggiggttctctgcgtctgtcttgaaggcctctggttcacettcacttcttac
 tacatgcactgggtgcgtcaggcaccaggttaagggctggaatggatcggcggatcaaccagattctgtagtactaagtacaacgagaa
 gttcaagggtcgtgccaccatctctagagacaactctaagaacacctgtacttcagatgaactctctgcgtgccgaggacactgcagtga
 ctactgcgcccgtgggtgctgttaicctgggacttcgacgtcggggcagggctgactgctcagcgcgaagcaccacaaaggcc

catcgggtattccccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggacacagcggccctgggctgcctggtaaggactactccccgagcc
 ggtgacgggtgctggaactcaggcgtctgaccagcggcgtgcacacctcccggtgtcctacagtcctcaggactctaccctcagca
 gcgtggtgactgtgccctccagcagctgggcaccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacactaagggtggacaagaa
 agttgagcccaaatctgtgacaaaactcacaca

AX1-VH [SEQ ID NO: 19], CDR以下划线标示

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCKASGFTFTSYMHWVRQAPGKGLEWIGRINPDSGSTK
YNEKFKGRATISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGRLSWDFDVWGQGLVT
 VSS

AX1-VH [SEQ ID NO: 20]

GAAGTGCAGCTGCTGGAATCTGGTGGTGGTCTGGTGCAGCCAGGTGGTTCTCTGCGT
 CTGTCTTGCAAGGCCTCTGGTTTCACCTTCACTTCTTACTACATGCACTGGGTGCGTC
 AGGCACCAGGTAAGGGTCTGGAATGGATCGGTCGGATCAACCCAGATTCTGGTAGT
 ACTAAGTACAACGAGAAGTTC AAGGGTCTGTGCCACCATCTCTAGAGACA ACTCTAA
 GAACACCCTGTACTTG CAGATGAACTCTCTGCGTGCCGAGGACACTGCAGTGTACTA
 CTGCGCCCGTGGTGGTCTGTTTATCCTGGGACTTCGACGCTCTGGGGTCAGGGTACGCT
 GGTGACTGTCTCGAGC

AX1 IGG2重链蛋白[SEQ ID NO: 21]

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCKASGFTFTSYMHWVRQAPGKGLEWIGRINPDSGSTK
 YNEKFKGRATISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGRLSWDFDVWGQGLVT
 VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
 QSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDPHKPSNTKVDKTVRKKCCVECPAPPVAG
 PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF
 NSTFRVVSVLTVVHQQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTIKTKGQPREPQVYTLPPSRE
 EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKS
 RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

AX1 IGG2重链核酸[SEQ ID NO: 22]

GAGGTCCAACCTTTGGAGTCTGGAGGAGGACTGGTCCAACCTGGAGGCTCCCTGAG
 ACTGTCCTGTAAGGCATCTGGCTTACCTTCACTTCACTTCACTACTATATGCACTGGGTGAG
 ACAGGCTCCTGGCAAGGGATTGGAGTGGATTGGCAGGATAAACCTGACTCTGGCA
 GCACCAAATACAATGAGAAGTTCAAGGGCAGGGCTACCATCAGCAGGGACAACAGC
 AAGAACACCCTCTACCTCAAATGAACTCCCTGAGGGCTGAGGACACAGCAGTCTA
 CTACTGTGCCAGGGGAGGCAGACTGTCCTGGGACTTTGATGTGTGGGGACAAGGCA
 CCCTGGTGACAGTGTCTCTGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGC

CCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGAC
TACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTTCGTGGAACCTCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTG
CACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTG
ACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAA
GCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTCGAGTGCC
CACCGTGCCAGCACCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCCCTCTTCCCCCAAAC
CCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGAC
GTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGT
GCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGG
TCAGCGTCTCACCGTTCGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGC
AAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAA
AGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGA
CCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATC
GCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACACCTCC
CATGCTGGACTCCGACGGTCTCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAG
CAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAA
CCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA

AX1全长轻链蛋白[SEQ ID NO: 23]

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISRYLAWYQQKPKAPKLLIYAASSLQSGVPS
RFSGSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCAAAYDYSLGGYVFGDGTKVEIKRTVAAPSVFIFP
PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSST
LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

与IGG2核酸配对的AX1 IGG轻链[SEQ ID NO: 24]

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCATCCTCCCTGTCTGCCTCTGTGGGAGACAGGGTG
ACCATCACTTGTAGGGCAAGCCAGGACATCAGCAGATACCTGGCTTGGTATCAACA
GAAGCCTGGCAAGGCTCCAAAACCTGCTGATTTATGCTGCCTCCTCCCTCCAATCTGG
AGTGCCAAGCAGGTTCTCTGGCTCTGGCTCTGGCACAGACTTCACCCTGACCATCTC
CTCCCTCCAACCTGAGGACTTTGCCACCTACTACTGTGCTGCCTATGACTACTCCCTG
GGAGGCTATGTGTTTGGAGATGGCACCAAGGTGGAGATTAAGCGTACGGTGGCTGC
ACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCT
GTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTG
GATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAA
GGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGA
AACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACA
AAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

从 TG1 细胞表达和纯化 Fab 蛋白：将 50 ml 在 2YT/2% 葡萄糖 / 羧苄西林 100 μ g/ml

中的单个克隆的过夜培养物于 37°C 振荡培养箱中进行生长。第二天,通过转移 5-10 ml 过夜培养物将每一个克隆接种 750 mL 至 1L 的 2YT/0.1% 葡萄糖 /100ug/mL 羧苄西林。将培养物在于 30°C 振荡培养约 3-4 小时,直至 OD600 大约为 1。向培养物中加入 IPTG 以达到终浓度 0.1-0.5 mM。在于 22°C 过夜 IPTG 温育后,通过以 10,000 rpm 离心 10-15 分钟收集细胞沉淀来进行细胞周质(periplasmic)制备。

[0045] 从细胞周质提取可溶性 Fab。如下进行细胞周质制备。将 TG1 沉淀重悬浮于 20mL 预冷 PPB 缓冲液 (20% 蔗糖 + 2mM EDTA + 30mM Tris, pH = 8) 中,并在冰上温育 1 小时。通过离心收集具有可溶性 Fab 的上清液。随后,将细胞沉淀再次重悬浮于 20mL 预冷 5mM 硫酸镁中,在冰上孵育 1 小时。将两份上清液混合以进行进一步 Fab 纯化。

[0046] 使用 HiTrap Protein G HP 柱子 (GE Healthcare) 纯化来自细胞周质提取物的可溶性 Fab。开始时使用平衡缓冲液 (PBS 或 Tris, pH 7.3) 平衡柱子。将来自细胞周质制备物的上清液加载到 1-ml 或 5-mL 蛋白质 -G 柱子 (HiTrap, GE healthcare) 上。在用 10 倍柱体积 (CV) 的平衡缓冲液洗涤后,利用 8 CV 的洗脱缓冲液 (0.3 M 醋酸, pH3) 洗脱 Fab 蛋白。收集洗脱的级分,用 0.5 倍体积的 1M Tris, pH 9 缓冲液中和。使用具有 10 kD 分子量截断值的 Amicon 离心过滤器将 Fab 样品缓冲交换至 PBS 中。使用大小排阻 HPLC (SE-HPLC) 分析纯化的 Fab 的质量。也将纯化的 Fab 用于 ELISA 测定和 Biacore 测定 (下文中)。总体上, Fab 产量的总计约 1 - 2 mg/L,具有从小于 1 mg/L 至远超 10 mg/L 的高度差异性。通过 SE-HPLC,所有 Fab 显示单个主峰。ELISA 测定结果确认所有 Fab 结合人 PCSK9 抗原。

[0047] 从糖工程化的巴斯德毕赤酵母 (*Pichia Pastoris*) 纯化抗 PCSK9 单克隆抗体:抗 PCSK9 单克隆抗体在糖工程化的巴斯德毕赤酵母 GFI 5.0 宿主 YGLY8316 中表达,所述宿主能够转移其复合 N 连接的聚糖上的末端半乳糖。抗 PCSK9 重链和轻链进行密码子最优化,并且使用酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) α 交配因子前序列作为分泌信号序列将其在甲醇密切诱导型启动子 AOX1 下进行表达。将产生该抗体的糖工程化的毕赤酵母菌株命名为 YGLY18513。使用来自 GE Healthcare 的 MabSelect™ 培养基 (Cat. # 17-5199-01) 通过亲和层析从无细胞上清液培养基捕获来自 YGLY18513 的抗 PCSK9 抗体。将无细胞上清液加载至用 3 倍柱体积的 20mM Tris-HCl pH7.0 以 5.0mL/ 分钟的流速预平衡的 Mabselect 柱子 (XK 16/20, 1.6cm x 10.0 cm)。用 3 倍柱体积的 20mM Tris-HCl pH7.0 洗涤柱子,然后用 5 倍柱体积的含有 1M NaCl 的 20mM Tris-HCl pH7.0 进行洗涤以除去宿主细胞蛋白质。用 5 倍柱体积的 100mM 甘氨酸、100mM 精氨酸 pH 3.0 洗脱抗 PCSK9 抗体,然后立即用 1M Tris-HCl pH8.0 中和。抗体在毕赤酵母中良好表达。

[0048] 将利用来自 GE Healthcare 的 Source 30S 树脂 (Cat # 17-1273-02) 的强阳离子交换层析用作第二步纯化以除去经修整 (clipped) 的种类和聚集体。利用 25mM 醋酸钠 pH5.0 将抗 PCSK9 抗体的 Mabselect 库稀释 5 倍,并将其加载至利用 3 倍柱体积的 25mM 醋酸钠 pH5.0 预平衡的 Source 30S 柱子上。在加载后,用 3 倍柱体积的 25mM 醋酸钠 pH5.0 洗涤柱子,然后通过 10 倍柱体积中产生范围从 100mM 至 150mM 的氯化钠 (于 25mM 醋酸钠 pH5.0 中) 的线性梯度来进行洗脱。将含有良好装配的抗 PCSK9 抗体的级分混合在一起。将含有抗 PCSK9 抗体的 Source30S 混合的级分缓冲交换至含有 6% 蔗糖、100mM 精氨酸、100mM 组氨酸 pH6.0 的配制缓冲液 (HyClone® Cat # RR10804.02) 中,使用 0.2 μ m PES (聚醚砜 (PolyEtherSulfone)) 膜过滤器进行无菌过滤,然后于 4°C 下贮存直至释放。

[0049] 实施例 2

测量人 EDTA 血浆中的 PCSK9

测定使用解离增强镧系元素荧光免疫测定 (DELFI A) 时间分辨荧光光度法 (Time-Resolved Fluorometry) (TRF)。DELFI A TRF 测定依赖于镧系元素螯合物标记的荧光性质,所述性质允许长荧光衰减时间和较大的斯托克斯位移;参见图 1A-B。长荧光衰减时间允许用户在本底荧光减退后测量荧光,有效地降低通常伴随样品的本底发射。此外,测定具有较大的斯托克斯位移 (360nm 激发 /620nm 发射),其允许清晰峰值荧光检测而不干扰峰和峰肩 (peak shoulder)。DELFI A TRF 的这些特征有效地将本底发射降至允许增加的测量灵敏度的水平。

[0050] 测定依赖于捕获抗体至高结合 Costar 平板的表面上的直接吸附。向孔中加入样品、标准物和对照物,然后加入第二抗体,随后进行免疫反应;镧系元素标记与复合物在增强溶液中离解。游离镧系元素 (Eu^{3+} , 铕) 与增强溶液的成分快速形成新型具有高度荧光和稳定性的螯合物。为了进行分析,将平板加载至 Biotek Synergy 2 仪器中,并在 360nm 的波长上激发,在 620nm 处读取发射。该测定定量地测量人血浆中 PCSK9 的浓度。

[0051] 设备:Biotek Synergy 2 平板读数器 (激发滤光片 $-360 \pm 40\text{nm}$, 发射滤光片 $-620 \pm 40\text{nm}$);各类移液器 (Assorted pipettor);涡旋搅拌器 (Vortex Mixer);平板振荡器 (Plate Shaker);Biohit 多道移液器 (Biohit Multichannel Pipettor) (1200 μL); Beckman Coulter Biomek FX;Boekel Jitterbug Model 130000。

[0052] 辅助材料:微平板粘性膜 (Microplate Adhesive Film) (USA Scientific cat# 2920-0000);1.5 mL 微量离心管 (Eppendorf, Cat # 022363204);黑色高结合测定平板 (Black High Binding Assay Plate) (Costar #3295);移液管尖头;用于血浆收集的 EDTA 真空管 (BD, cat# 366643)。

[0053] 试剂:(1) DELFI A 成分 (Perkin Elmer) [链霉抗生物素蛋白 / 铕 (100 μg / mL),于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下贮存 (catalog# 1244-360);DELFI A 测定缓冲液,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下贮存 (catalog# 1244-111);DELFI A 增强液,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下贮存 (catalog# 1244-105)];(2) 抗体 [AX213 (抗人 PCSK9 单克隆 Ab) 捕获抗体,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下贮存以及 AX1 (抗人 PCSK9 单克隆 Ab) 生物素化第二抗体,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下贮存];(3) 异嗜性封闭剂 1 (HBRI, 纯化的), Scantibodies Laboratory, catalog# 3KC533 ~ 20 mg/mL;(4) 10% Tween-20,于室温下贮存 (Bio-Rad, catalog# 161-0781);(5) MSD 封闭剂 A: 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下贮存 (Meso Scale Discovery, catalog# R93AA-1);(6) TBS-T 洗涤缓冲液 (Sigma catalog #T-9039) [1 包混合至 1 升 Milli-Q 级水,终浓度:50 mM Tris- 缓冲盐溶液, 0.05% Tween-20 (于 1000 mL 中),于室温下贮存];(7) 1X 磷酸缓冲盐溶液 (Fluka, catalog# 79383) [将 5.0 mL 10X PBS 稀释在 45 mL Milli-Q 级水中,终浓度:1X];(8) 包被溶液 [在即将使用之前如下制备的:将 5.00 μL AX213 (原液 =10.05 mg/mL) 稀释于 5995 μL 1X PBS 中,包被溶液为 8.375 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AX213];(9) 封闭溶液 [在实验当天如下制备的:将 900 mg MSD 封闭剂 A (BSA) 溶解在 30.0 mL TBS-T 缓冲水溶液中,终浓度:3%];(10) 测定缓冲液 (AB) [如下面表 1 中所述在实验当天制备的]:

表 1

成分	体积	终浓度
封闭溶液	5000 μ L	1%BSA
TBS-T 洗涤缓冲液	9490 μ L	--
10%Tween-20	375 μ L	0.25%
HBR(18.44mg/mL)	138.8 μ L	30 μ gHBR 至 25 μ L 血浆
总体积	15000 μ L	

[0054] (11) 1% BSA[在实验当天如下制备的:将4.0 mL封闭溶液通过移液器转移至8.0 mL TBS-T 洗涤缓冲液中];(12) 生物素化的第二抗体溶液[在即将使用之前如下制备的:将5.5 μ L AX1 Ab(原液=1.0 mg/mL)稀释于5494.5 μ L 1% BSA中,终浓度:1.0 μ g/Ml];和(12) Strep-Eu 溶液[在即将使用之前制备的并且避光保存,将8.0 μ L Strep-Eu(原液=100 μ g/mL)稀释于7992 μ L DELFIA 测定缓冲液中,终浓度:0.100 μ g/mL]。

[0055] 校准曲线的制备: PCSK9 的主原液浓度(master stock concentration)为1.32 mg/mL。利用来自自主原液的测定缓冲液,使用1:44的稀释度制备30 μ g/mL的原液。

[0056] 表 2

校准液 (Nm)	体积校准液 / 原液	体积测定缓冲液	稀释因子
10.25	6.0 μ L 的 30 μ g/mL 原液 (384.4nM)	219.0 μ L	37.5
3.42	75 μ L 的 10.25nM 校准液	150 μ L	3.0
1.14	75 μ L 的 3.42nM 校准液	150 μ L	3.0
0.38	75 μ L 的 1.14nM 校准液	150 μ L	3.0
0.13	75 μ L 的 0.38nM 校准液	150 μ L	3.0
0.04	75 μ L 的 0.13nM 校准液	150 μ L	3.0
0.014	75 μ L 的 0.04nM 校准液	150 μ L	3.0
0.004	75 μ L 的 0.014nM 校准液	150 μ L	3.0

[0057] Biomek FX 法:专门针对PCSK9产生Span-8 Head的所有校准。使用Span-8 Head进行所有自动移液功能。将程序分成3个部分:(1) 样品稀释:向聚丙烯稀释平板的每一个孔中加入140 μ L 测定缓冲液;向含有测定缓冲液的孔中加入20 μ L 每种QC和临床样品;(2) 样品添加:将稀释平板中的每种QC和临床样品混合3次;以一式两份将50 μ L 的每种QC和临床样品加入Costar 测定平板;以及标准物添加:以一式两份将50 μ L 的每种校准液加至Costar 测定平板。

[0058] Biotek Synergy 2 设置:将平板在最低设置上振荡5分钟,然后读数。激发和发射波长分别为360 nm(40nm范围)和620 nm(40nm范围)。延迟时间为250微秒,总计数时间为1000微秒。

[0059] 测定法:(1) 平板包被:每孔加入60 μ L包被溶液,在4 $^{\circ}$ C下放置过夜,利用平板密封器进行密封。(2) 封闭平板:不洗涤平板,每孔加入150 μ L 封闭溶液,在室温下振荡温育1小时。打开Jitterbug,将温度设置为37 $^{\circ}$ C。(3) 重组PCSK9曲线:向219.0 μ L 测定缓冲液中加入6.0 μ L 30 μ g/mL原液,使用75 μ L校准液将其3倍系列稀释至150 μ L 测定缓冲液中。(4) 样品和校准液的添加:在封闭后,如步骤1中所述洗涤平板,在Biomek FX上运行。程序将样品和QC以1:8稀释于测定缓冲液中。校准液(标准物)未被稀释。每孔终体积为50 μ L。随后将平板在Jitterbug中于37 $^{\circ}$ C下振荡温育1小时。(5) 检测抗体:向每一个孔中加入50 μ L 生物素化的第二抗体溶液。抗体的终浓度为1.0 μ g/mL。将平板在室温下振荡温育1小时。(6) Strep-Eu:向每一个孔中加入75 μ L Strep-Eu溶液。Strep-Ru的浓度为0.10 μ g/mL。将平板在室温下振荡温育20分钟。(7) 增强溶液:向每一个孔中加入100 μ L DELFIA 增强溶液,用黑色盖子覆盖平板,然后在Biotek Synergy 2 平板读数器

上进行读数。(8) 读取平板 :运行 DELFIA 程序。将板振荡 5 分钟,随后在 360nm 的激发波长和 620nm 的发射波长上进行读数。

[0060] 计算:使用 Gen5 软件完成所有计算。未知物的浓度来源于以 nM PCSK9 表示的校准曲线。

[0061] 结果:图 2 举例说明在测定缓冲液中稀释的重组人 PCSK9 标准曲线。曲线的范围为 10.26 nM 至 0.005 nM。图 3 举例说明在 3 周的时间内在不同的 3 天显示的 6 个正常健康志愿者的生物差异。浓度以 nM 显示。

序列表

<110> Merck Sharp & Dohme Corp.

Ichetovkin, Marina

Chen, Zhu

LeGrand, Cheryl

<120> PCSK9 免疫测定

<130> MRL-ACV-00030

<150> US 61/368,081

<151> 2010-07-27

<150> US 61/256,752

<151> 2009-10-30

<160> 24

<170> 用于 Windows 4.0 版的 FastSEQ

<210> 1

<211> 215

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> AX213 抗体全长轻链

<400> 1

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

gaaatcgtgc tgaccagtc tccagccacc ctgtctctgt ctcccgggga acgtgccacc 60
 atcacctgcc gtgcctctca gtatgtcggc agctacctga actggtatca gcagaagcca 120
 ggtcaggcgc cacgtctgct gatctacgac gcctctaacc gtgccaccgg tatcccagcc 180
 cgtttctctg gttctggttc tggcaccgac ttcaccctga ccatctcttc tctggaacca 240
 gaagacttcg ccgtgtacta ctgccaggta tgggacagct ctctctctgt ggtgttcggt 300
 ggtggtacca aagtggagat caaa 324

<210> 5

<211> 226

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> AX213 抗体 Fd 链

<400> 5

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

	180		185		190
Ser	Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser				
	195		200		205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr					
	210		215		220
His Thr					
225					

<210> 6

<211> 678

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> AX213 抗体 Fd 链

<400> 6

```

caggtgcaat tgctggaatc tgggtggtgt ctggtgcagc caggtgggtc tctgcgtctg 60
tcttgcaagg ctagecgtta caccttctct egctacggta tcaactgggt gcgtcaggca 120
ccaggtaagg gtctggaatg gatecggtegg ategaccagc gtaacgggtg tactaggtac 180
aacgaaaagt tcaagggtaa ggccaccatc tctagagaca actctaagaa caccctgtac 240
ttgcagatga actctctgcg tgccgaggac actgcagtgt actactgcgc ccgtgcaaat 300
gacggttact ccttcgacta ctggggctcag ggtacgctgg tgactgtctc gagcgcaage 360
accaaaggcc catcgggtatt ccccttggea ccctcctcca agagcacctc tgggggcaca 420
gcggecctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgagc cggtgacggt gtcgtggaac 480
tcaggegctc tgaccagcgg cgtgcacacc ttccccgctg tcctacagtc ctcaggactc 540
tactcctca gcagcgtggt gactgtgccc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc 600
tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacact aaggtggaca agaaaagtga gccc aaatct 660
tgtgacaaaa ctcacaca                                     678

```

<210> 7

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> AX213 抗体可变重链区

<220>

<223> AX213 抗体重链

<400> 9

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

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 275 280 285
 Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 290 295 300
 Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 305 310 315 320
 Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr
 325 330 335
 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 340 345 350
 Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 355 360 365
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 370 375 380
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 385 390 395 400
 Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 405 410 415
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 420 425 430
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440

<210> 10

<211> 1332

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> AX213 抗体重链

<400> 10

gaggtccaac ttttggagtc tggaggagga ctggccaac ctggaggctc cctgagactg 60
 tcctgtaagg catctggcta caccttcagc agatatggca tcaactgggt gagacagget 120
 cctggcaagg gattggagtg gattggcagg attgaccctg gcaatggagg caccagatac 180
 aatgagaagt tcaagggcaa ggctaccatc agcagggaca acagcaagaa caccctctac 240
 ctccaaatga actcctgag ggctgaggac acagcagtct actactgtgc cagggetaat 300
 gatggetact cctttgacta ctggggacaa ggcaccctgg tgacagtgtc ctctgetage 360

```

accaagggcc catcggtctt cccctggcg ccctgctcca ggagcacctc cgagagcaca 420
gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac 480
tcaggcgctc tgaccagcgg cgtgcacacc ttccccggtg tcctacagtc ctcaggactc 540
tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcaact tcggcaccca gacctacacc 600
tgcaacgtag atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agacagttga gcgcaaatgt 660
tgtgtcgagt gccaccctg cccagcacca cctgtggcag gaccgtcagt cttcctcttc 720
ccccaaaac ccaaggacac cctcatgate tcccggaccc ctgaggtcac gtgctgtggtg 780
gtggacgtga gccacgaaga ccccgaggte cagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag 840
gtgcataatg ccaagacaaa gccacgggag gagcagttca acagcacggt ccgtgtggtc 900
agcgtcctca cegtctgca ccaggactgg ctgaacggca aggagtacaa gtgcaaggtc 960
tccaacaaag gcctcccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaaaccaa agggcagccc 1020
cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggagg agatgaccaa gaaccaggtc 1080
agcctgacct gcctggtcaa aggctttctac cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 1140
aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acacctccca tgctggactc cgacggctcc 1200
ttcttctct acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc 1260
tcatgtctcg tgatgatga ggctctgcac aaccactaca cacagaagag cctctccctg 1320
tctccgggta aa 1332

```

<210> 11

<211> 215

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> AX213 抗体轻链

<400> 11

```

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

```

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

<210> 12

<211> 645

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> AX213 抗体轻链

<400> 12

```

gagattgtgc tgaccagag ccctgccacc ctgtccctga gccctggaga gagggtacc 60
atcacttgta gggcaagcca atatgtgggc tcctacctga actggtatca acagaagcct 120
ggacaagccc caagactgct gatttatgat gccagcaaca gggctacagg catccctgcc 180
aggttctctg gctctggctc tggcacagac ttcaccctga ccatctcctc cttggaacct 240
gaggactttg ctgtctacta ctgtcaggtg tgggactcca gccctcctgt ggtgtttgga 300
ggaggcacca aggtggagat taagcgtacg gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 360
ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 420
tatccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaate gggtaacttc 480
caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg 540
acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag 600
ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgt 645

```

<210> 13

<211> 216

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> AX1 抗体轻链

<400> 13

```

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

```

<210> 14
 <211> 648
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> AX1 抗体轻链

<400> 14
 gacatccaga tgaccagtc tccatcttct ctgtctgcct ctgtgggcga cggggtgacc 60
 atcacctgcc gtgcctctca ggatctctct aggtatctgg cctggatca gcagaagcca 120
 ggtaaggcgc caaagctgct gatctacgcc gcctcttctt tgcagtctgg tgtgccatct 180
 cgtttctctg gttctggttc tggcaccgac ttcaccctga ccatctcttc tttgcagcca 240
 gaagacttcg ccacctacta ctgcgcggct tacgactatt ctttgggcgg ttacgtgttc 300
 ggtgatggta ccaaagtgga gatcaaactg acggtggctg caccatctgt cttcatcttc 360
 ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac 420
 ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg aagggtgata acgccctcca atcgggtaac 480
 tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc 540
 ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat 600
 cagggcctga gctcgcccgt cacaaagagc ttcaacaggg gagagtgt 648

<210> 15
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> AX1 抗体可变轻链区

<400> 15
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Arg Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65	70	75	80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Ala Tyr Asp Tyr Ser Leu Gly			
	85	90	95
Gly Tyr Val Phe Gly Asp Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys			
	100	105	

<210> 16

<211> 327

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> AX1 抗体可变轻链区

<400> 16

```

gacatccaga tgaccagtc tccatcttct ctgtctgcct ctgtgggcga ccgggtgacc 60
atcacctgcc gtgcctctca ggatatctct aggtatctgg cctggtatca gcagaagcca 120
ggtaaggcgc caaagctgct gatctacgcc gcctcttctt tgcagtctgg tgtgccatct 180
cgtttctctg gttctggttc tggcaccgac ttcaccctga ccatctcttc tttgcagcca 240
gaagacttcg ccactacta ctgcgcggct tacgactatt ctttgggcgg ttacgtgttc 300
ggtgatggta ccaaagtgga gatcaaa                                     327

```

<210> 17

<211> 227

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> AX1 抗体 Fd 链

<400> 17

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

50	55	60			
Lys Gly Arg Ala Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr					
65	70	75	80		
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys					
	85	90	95		
Ala Arg Gly Gly Arg Leu Ser Trp Asp Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly					
	100	105	110		
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe					
	115	120	125		
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu					
	130	135	140		
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp					
145	150	155	160		
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu					
	165	170	175		
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser					
	180	185	190		
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro					
	195	200	205		
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys					
	210	215	220		
Thr His Thr					
225					

<210> 18

<211> 681

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> AX1 抗体 Fd 链

<400> 18

gaagtgcagc tgctggaate tgggtggtgt ctggtgcagc cagggtggttc tctgcgtctg 60
tcttgcaagg cctctgggtt caccttact tcttactaca tgcaactgggt gcgtcaggca 120
ccaggtaagg gtctggaatg gatcggtcgg atcaaccagc attctggtag tactaagtae 180
aacgagaagt tcaagggtcg tgccaccatc tctagagaca actetaagaa caccctgtac 240
ttgcagatga actctctgcg tgccgaggac actgcagtgt actactgcgc ccgtggtggt 300

cgttttatcct gggacttcga cgtctgggggt cagggtacgc tggtgactgt ctcgagcgca 360
 agcaccaaag gcccatcggt attccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc 420
 acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg agccgggtgac ggtgtcgtgg 480
 aactcaggcg ctctgaccag cggegtgcac accttccccg ctgtcctaca gtcctcagga 540
 ctctactccc tcagcagcgt ggtgactgtg ccctccagca gcttggggcac ccagacctac 600
 atctgcaacg tgaatcaca gcccagcaac actaaggtgg acaagaaagt tgagcccaaa 660
 tcttgtgaca aaactcacac a 681

<210> 19

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> AX1 抗体可变重链区

<400> 19

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

<210> 20

<211> 357

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> AX1 抗体可变重链区

<400> 20

```

gaagtgcagc tgctggaatc tggtaggtgt ctggtgcagc caggtgggtc tctgcgtctg 60
tcttgcaagg cctctgggtt caccttcaact tcttactaca tgcactgggt gcgtcaggca 120
ccaggtaagg gtctggaatg gatcggtcgg atcaaccagc attctggtag tactaagtac 180
aacgagaagt tcaagggtcg tgccaccatc tctagagaca actctaagaa caccctgtac 240
ttgcagatga actctctgcg tgccgaggac actgcagtgt actactgcgc ccgtgggtgt 300
cgtttatcct gggacttcga cgtctgggggt cagggtagcgc tggtagactgt ctcgagc 357

```

<210> 21

<211> 445

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> AX1 抗体重链

<400> 21

```

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

```

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

<210> 22

<211> 1335

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> AX1 抗体重链

<400> 22

```

gaggtccaac ttttggagtc tggaggagga ctggtccaac ctggaggctc cctgagactg 60
tcctgtaagg catctggctt caccttcacc tcctactata tgcactgggt gagacaggct 120
cctggcaagg gattggagtg gattggcagg ataaacctg actctggcag caccaaatac 180
aatgagaagt tcaagggcag ggctaccatc agcagggaca acagcaagaa caccctctac 240
ctccaaatga actccctgag ggctgaggac acagcagtct actactgtgc caggggagge 300
agactgtcct gggactttga tgtgtgggga caaggcaccc tggtgacagt gtccctctgt 360
agcaccaagg gcccatcggt ctteccccctg gcgccctgct ccaggagcac ctccgagagc 420
acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 480
aactcaggcg ctctgaccag eggcgtgcac accttccccg ctgtcctaca gtccctcagga 540
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg cctccagca acttcggcac ccagacctac 600
acctgcaacg tagatcaciaa gccccagcaac accaaggtgg acaagacagt tgagcgcaaa 660
tgtttgtgtc agtgcccacc gtgcccagca ccacctgtgg caggaccgtc agtcttctc 720
ttcccccaa aaccaagga caccctcatg atctccccga cccctgaggt cacgtgcgtg 780
gtggtggacg tgagccacga agaccccagag gtccagttca actggtacgt ggacggcgtg 840
gaggtgcata atgccaagac aaagccacgg gaggagcagt tcaacagcac gttccgtgtg 900
gtcagcgtcc tcaccgtcgt gcaccaggac tggctgaacg gcaaggagta caagtgcaag 960
gtctccaaca aaggcctccc agcccccatc gagaaaacca tctccaaaac caaagggcag 1020
ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatccccggg aggagatgac caagaaccag 1080
gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc taccacagcg acatcgccgt ggagtgggag 1140
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacacctc ccatgctgga ctccgacgge 1200
tcctttctcc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1260
ttctcatget cegtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacacagaa gagcctctcc 1320
ctgtctccgg gtaaa 1335

```

<210> 23

<211> 216

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> AX1 抗体轻链

<400> 23

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

<210> 24

<211> 648

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> AX1 抗体轻链

<400> 24

```
gacatccaga tgaccagag cccatcctcc ctgtctgcct ctgtgggaga cagggtgacc 60
atcacttgta gggcaagcca ggacatcage agatacctgg cttggtatca acagaagcct 120
ggcaaggctc caaaactgct gatttatgct gcctcctccc tccaatctgg agtgccaage 180
aggttctctg gctctggctc tggcacagac ttcaccctga ccatctcctc cctccaacct 240
gaggactttg ccacctacta ctgtgctgcc tatgactact ccctgggagg ctatgtgttt 300
ggagatggca ccaaggtgga gattaagcgt acggtggctg caccatctgt cttcatcttc 360
ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac 420
ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg aaggtggata acgccctcca atcgggtaac 480
tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc 540
ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat 600
cagggcctga gctcgccctg cacaaagagc ttcaacaggg gagagtgt 648
```

在340 nm处的激发1

1000个循环/秒

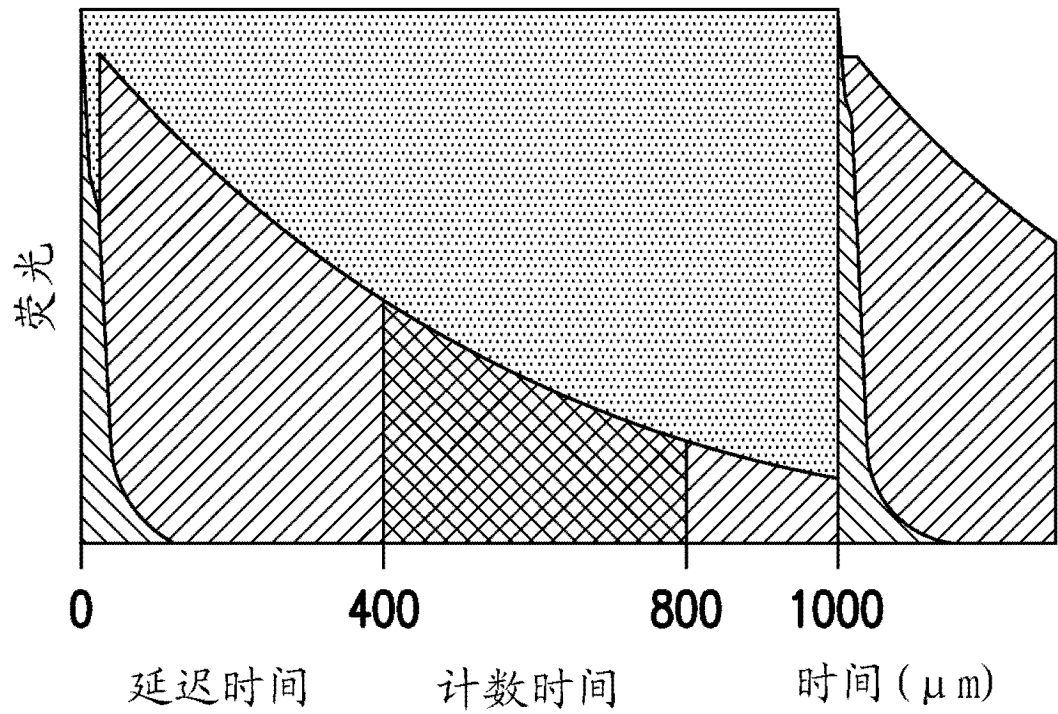


图 1A

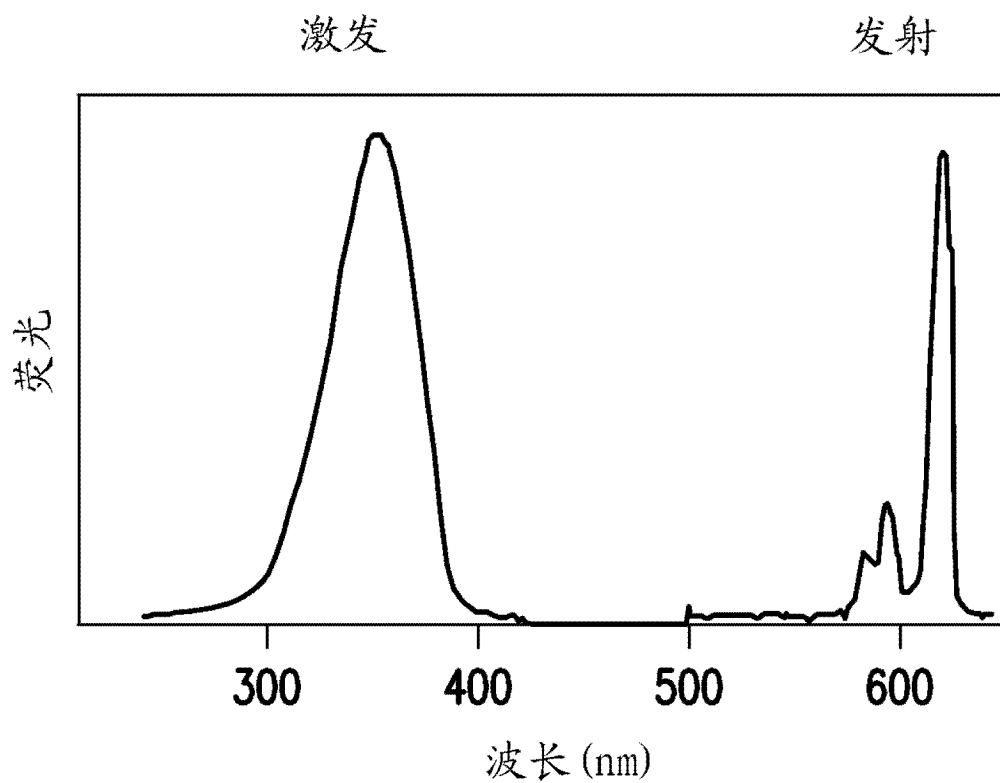


图 1B

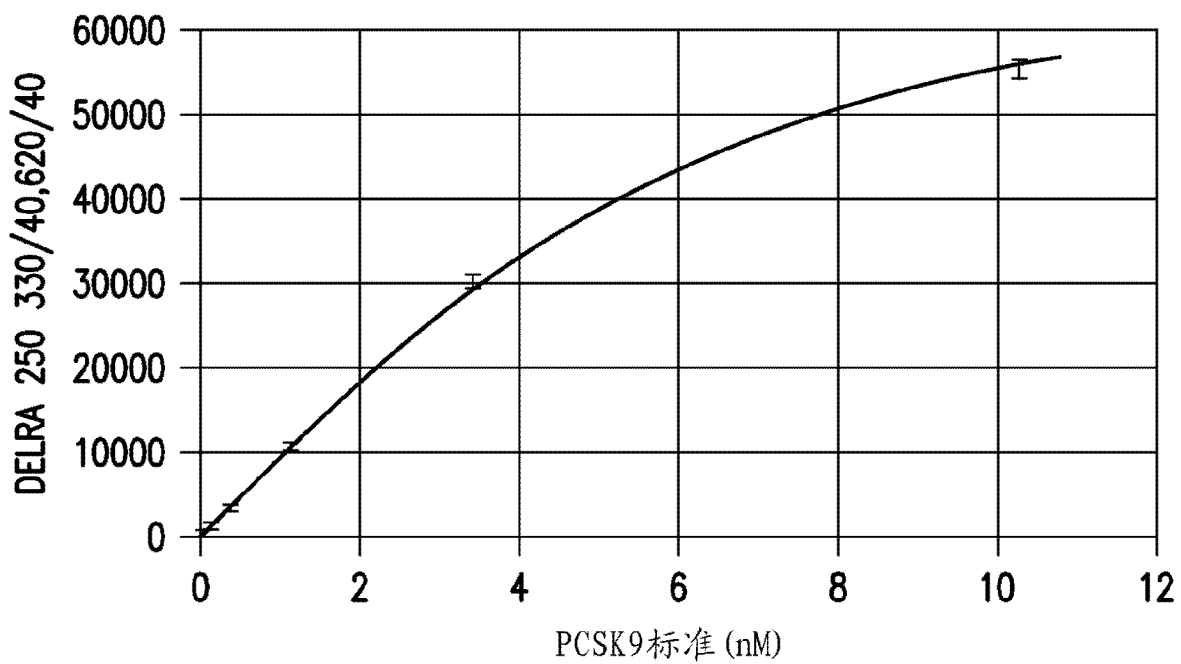


图 2

	PCSK9 (nM)					
	E	F	G	H	I	J
第1周	1.63	5.52	3.27	5.40	5.16	4.57
第3周	3.21	4.98	4.04	3.92	3.49	4.23
第4周	1.55	3.86	4.44	4.05	5.07	4.54
%CV	43.83	17.74	15.15	18.40	20.57	4.17

图 3

专利名称(译)	PCSK9免疫测定		
公开(公告)号	CN102576018A	公开(公告)日	2012-07-11
申请号	CN201080049529.2	申请日	2010-10-29
申请(专利权)人(译)	默沙东公司		
当前申请(专利权)人(译)	默沙东公司		
[标]发明人	M 伊彻托夫金 Z 陈 C 勒格朗		
发明人	M.伊彻托夫金 Z.陈 C.勒格朗		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N2333/96425 G01N33/573		
代理人(译)	李慧惠 刘健		
优先权	61/368081 2010-07-27 US 61/256752 2009-10-30 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

使用PCSK9拮抗剂的方法。更具体地，利用免疫测定法测量生物样品的循环PCSK9水平的方法。

