

一种抗肾上腺髓质素非中和抗体、其制备方法及应用

本申请要求享有于 2022 年 7 月 20 日向中国国家知识产权局提交的，专利申请号为 202210863441.9，名称为“一种抗肾上腺髓质素非中和抗体、其制备方法及应用”的在先申请的优先权。该在先申请的全文通过引用的方式结合于本申请中。

技术领域

本发明涉及一种抗肾上腺髓质素非中和抗体、其制备方法及应用，属于生物工程和生物治疗领域。

背景技术

肾上腺髓质素（Adrenomedullin, ADM）是一段由 52 个氨基酸组成的 6 kDa 的多肽，1993 年最早在嗜铬细胞瘤中发现，后发现在血管表皮细胞及血管平滑肌细胞均广泛分泌表达。肾上腺髓质素的基因位于 11 号染色体上，翻译后由前激素原逐步酶切，形成作为降钙素基因相关肽（CLR）。CLR 与 RAMP2 或 RAMP3 组成的异源二聚体是肾上腺髓质素的受体，基于其受体介导的内吞作用以及蛋白酶的作用，其半衰期仅为 22 min。

肾上腺髓质素具有维持内皮细胞完整性，增强屏障的作用。这是通过以下两方面实现的：（1）加强 GTPase Rac1 的活性，提高皮层肌动蛋白和应力纤维的生成；（2）通过抑制 RhoA/ROCK 途径，减少肌球蛋白轻链激酶诱导的肌球蛋白收缩。肾上腺髓质素还具有血管舒张，降低血压的作用。这是通过以下两方面实现的：（1）通过 PI3K/Akt 途径，释放 NO，活化环磷酸鸟苷（cGMP）/激活蛋白激酶 K（PKG）；（2）通过与血管平滑肌的结合，导致环

磷酸腺苷（cAMP）/激活蛋白激酶 A（PKA）浓度提高，通过磷酸化作用，引起平滑肌细胞的松弛。

在健康人群中，肾上腺髓质素浓度极低，在 10 pg/mL 左右，可以灵活穿梭于血管内外，灵活调节血管舒张和维持内皮细胞屏障功能。在脓毒症休克患者中，肾上腺髓质素浓度是正常情况下的 5-6 倍，和病情严重程度和预后直接相关。在脓毒症休克患者中，基于炎症的作用减弱了血管的屏障作用，血管舒张导致血压进一步降低。

肾上腺髓质素非中和抗体将肾上腺髓质素限制于血管内，纠正了血管内屏障功能，减弱了胞外的血管舒张作用，提高了肾上腺髓质素在血浆内的半衰期，以达到治疗及减弱脓毒症的休克症状。因此，目前亟需研制能与肾上腺髓质素具有较高亲和力的非中和抗体。

发明内容

针对上述技术问题，本发明一方面提供了一种抗肾上腺髓质素（抗 ADM）单克隆抗体或其片段，其中所述单克隆抗体或片段特异性结合人肾上腺髓质素（ADM）的 N 端第 1-21 个氨基酸序列，所述人 ADM 的 N 端第 1-21 位氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示，并且所述单克隆抗体或片段展现出对 ADM 的 KD 值小于 10^{-10} M 的亲和力。

在本发明的整篇说明书中，本发明的“抗体”或“抗体片段”能够结合 ADM，因此针对 ADM，并因此可被称为“抗 ADM 抗体”或“抗 ADM 抗体片段”。

本发明所述“抗体”或“抗体片段”是抗肾上腺髓质素的非中和抗体或其片段。

在这种背景下，出于简化的目的，统称为“非中和”抗 ADM 抗体或抗体片段（其例如封闭 80% 以下的 ADM 生物活性）的具有“非中和抗 ADM 活性”的抗体或抗体片段被定义为：

结合 ADM 的一种或多种分子，在添加至真核细胞系培养物之后，通过平行添加的合成的人 ADM 肽的作用降低所述细胞系所产生的 cAMP 的量，所述细胞系表达由 CRLR（降钙素受体样受体）和 RAMP3（受体活性修饰蛋白 3）组成的功能性人重组 ADM 受体，其中所述添加的合成的人 ADM 以这样的量添加：在不存在待分析的非中和抗体的情况下，导致 cAMP 合成的半最大刺激，其中所述分子结合 ADM 导致 cAMP 降低的程度不超过 80%，甚至当待分析的能与 ADM 结合的所述非中和分子以所述量（用待分析的非中和抗体能得到的获得 cAMP 的最大降低所需的）10 倍以上的量添加时也如此。

相同的定义适用于其他范围：95%、90%、50%等。

生物活性被定义为这样的作用：一种物质在其相互作用后在体内或体外（例如，在测定中）呈现为活的生物体或组织或器官或功能单元。就 ADM 生物活性而言，这可以是 ADM 在人重组肾上腺髓质素受体 cAMP 功能测定中的作用。因此，根据本发明，生物活性通过肾上腺髓质素受体 cAMP 功能测定来定义。

为了在这样的测定中测定 ADM 生物活性，可以进行以下步骤：

在所述人重组肾上腺髓质素受体 cAMP 功能测定中用 ADM 进行剂量反应曲线。

可以计算半最大 cAMP 刺激的 ADM 浓度。

在恒定的半最大 cAMP 刺激时，分别通过 ADM 稳定抗体或肾上腺髓质素稳定抗体片段进行 ADM 浓度剂量反应曲线（高达 100 μ g/ml 的终浓度）。

所述 ADM 生物测定中 50% 的最大抑制表示，所述抗 ADM 抗体或所述抗肾上腺髓质素抗体片段分别封闭基线值 50% 的生物活性。所述 ADM 生物测定中 80% 的最大抑制表示，所述抗 ADM 抗体或所述抗肾上腺髓质素抗体片段分别封闭 80% 的 ADM 生物活性。其含义是封闭不超过 80% 的 ADM 生物活性。这意味着仍存在约 20% 的残余 ADM 生物活性。

然而，通过本说明书以及在上述背景下，结合本文公开的抗 ADM 抗体和

抗 ADM 抗体片段而言，表述“封闭 ADM 的生物活性”应当被理解为仅降低 ADM 的生物活性，优选最大时将 ADM 生物活性从 100%降低至 20%的剩余 ADM 生物活性，优选将 ADM 生物活性从 100%降低至 50%的剩余 ADM 生物活性，但是在任何情况下，仍有可以如上所述测定的 ADM 生物活性。

本文中，抗肾上腺髓质素(ADM)抗体是能特异性结合 ADM 的抗体，抗肾上腺髓质素抗体片段是 ADM 抗体的片段，其中所述片段能特异性结合 ADM。特异性结合 ADM 也允许结合其他抗原。这意味着，该特异性不排除该抗体可以与激发该抗体的多肽之外的多肽交叉反应。这也适合本发明的抗 ADM 抗体或其片段的特异性。

本发明的非中和抗 ADM 抗体或非中和抗 ADM 抗体片段提供显著超越中和抗 ADM 抗体或中和抗 ADM 抗体片段的治疗优势。

本发明的抗体是蛋白，包括实质上由免疫球蛋白基因编码的能特异性结合抗原的一种或多种多肽。公认的免疫球蛋白基因包括 κ 、 λ 、 α (IgA)、 γ (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4)、 δ (IgD)、 ϵ (IgE) 和 μ (IgM) 恒定区基因以及无数的免疫球蛋白可变区基因。全长免疫球蛋白轻链长度通常为约 25KDa 或 214 个氨基酸。全长免疫球蛋白重链的长度通常为约 50KDa 或 446 个氨基酸。轻链由位于 NH_2 -端的可变区基因（长度约 110 个氨基酸）和位于 COOH -端的 κ 或 λ 恒定区基因编码。重链同样由可变区基因（长度约 116 个氨基酸）和其他恒定区基因之一编码。

抗体的基本结构单元通常是由两对相同的免疫球蛋白链组成的四聚体，每一对都具有一条轻链和一条重链。在每对中，轻链和重链可变区结合抗原，而恒定区介导效应或功能。免疫球蛋白还以多种其他形式存在，包括例如，Fv、Fab 和 F(ab')_2 以及双功能杂合抗体和单链抗体。免疫球蛋白轻链或重链可变区包括由三个高变区中断的框架区，所述高变区也称为互补决定区 (CDR's)。如上文所指出的，CDR 主要负责结合抗原的表位。免疫复合物是抗体如单克隆抗体、嵌合抗体人源化抗体或人抗体或功能性抗体片段特异性结合抗原。

在本领域中，可以通过多种方法来定义抗体的 CDR，例如基于序列可变性的 Kabat 定义规则、基于结构环区域位置的 Chothia 定义规则和基于 IMGT 本体论 (IMGT-ONTOLOGY) 的概念。本发明中，所述抗 ADM 抗体的 VL 和 VH 的氨基酸序列按 Chothia 编码规则进行编码，所述抗 ADM 抗体的轻链 CDR1-3 (LCDR 1-3) 和重链 CDR1-3 (HCDR 1-3) 按 Chothia 定义。

嵌合抗体是这样的抗体：通过基因工程从属于不同物种的免疫球蛋白可变区和恒定区基因构建其轻链和重链基因。例如，可以将来自小鼠单克隆抗体基因的可变节段连接至人恒定节段如 κ 和 $\gamma 1$ 或 $\gamma 3$ 。在一个实例中，治疗性嵌合抗体因而是由来自小鼠抗体的可变结构域或抗原结合结构域和来自人抗体的恒定或效应结构域组成的杂合蛋白，尽管可以使用其他哺乳动物物种或通过分子技术产生可变区。

“人源化”免疫球蛋白是包括人框架区和非人（诸如小鼠、大鼠或合成的）免疫球蛋白的一个或多个 CDR 的免疫球蛋白。提供 CDR 的非人免疫球蛋白称为“供体”，提供框架的人免疫球蛋白称为“受体”。

在一个实施方案中，人源化免疫球蛋白中的所有 CDR 都来自供体免疫球蛋白。不需要存在恒定区，但是如果存在，它们必须与人免疫球蛋白恒定区基本一致，即至少约 85-90%，诸如约 95% 一致或更加一致。因此，人源化免疫球蛋白的所有部分，可能除了 CDR，都与天然人免疫球蛋白序列的对应部分基本一致。“人源化抗体”是包含人源化轻链和人源化重链免疫球蛋白的抗体。人源化抗体能与提供 CDR 的供体抗体结合相同的抗原。人源化免疫球蛋白或抗体的受体框架可以具有有限数量的来自供体框架的氨基酸的取代。人源化或其他单克隆抗体可以具有其他保守的氨基酸取代，其对抗原结合或其他免疫球蛋白功能基本上没有影响。人源化免疫球蛋白可以通过基因工程的手段来构建。

人抗体是这样的抗体：其中轻链和重链基因来自人。人抗体可以通过使分泌目的抗体的人 B 细胞永生化来产生。永生化可以例如通过 EBV 感染或通过

将人 B 细胞与骨髓瘤或杂交瘤细胞融合以产生三源杂交瘤细胞来实现。人抗体还可以通过噬菌体展示方法产生，或从人组合单克隆抗体文库选择。人抗体还可以利用携带人免疫球蛋白基因的转基因动物来制备

因此，抗 ADM 抗体可以具有本领域内已知的形式。实例为人抗体、单克隆抗体、人源化抗体、嵌合抗体、CDR 移植抗体。

在优选的实施方案中，本发明的抗体是重组产生的抗体例如 IgG，或至少含有重链和/或轻链的 F-可变结构域的抗体片段例如化学偶联的抗体（片段抗原结合）。

因此，在本发明优选的实施方案中，本发明所述的抗肾上腺髓质素单克隆抗体片段包括 Fab, Fab', F(ab)₂、Fv 片段、F(ab')₂、scFv、di-scFv、VHH 和/或 dAb。

在本发明一个优选的实施方案中，本发明的抗体可以如下产生：

分别将合成的人 ADM 的 N 端 16 个氨基酸多肽、人 ADM 的 N 端 21 个氨基酸多肽或鼠 ADM 的 N 端 19 个氨基酸多肽（简称 YY-19, SEQ ID NO: 3）与偶联物作为免疫原免疫小鼠。最后一次免疫一周后取血，ELISA 测定血清抗 YY-21 的滴度。血清效价高的鼠经免疫原冲击免疫后，取脾脏细胞进行融合。经脾细胞融合和杂交瘤克隆筛选后，得到杂交瘤克隆。经亲和力测定，杂交瘤克隆展现出对 ADM 的 KD 值小于 10⁻¹⁰M 的亲和力。

本发明中，术语“K_D”、“K_D”或“KD”可互换使用，通常是指抗体-抗原相互作用的平衡解离常数。本发明中使用的“KD”是解离速率常数（k_{dis}，也称为“解离率（off-rate）（k_{off}）”或“kd”）与结合速率常数（k_{on}，也称为“结合率（k_{on}）”或“ka”）的比值。

经测序，所述杂交瘤克隆的重链可变区包含以下 CDR 序列：

- (i) GYAFTTF (如 SEQ ID NO:11 所示)，
- (ii) NTYSRV (如 SEQ ID NO:12 所示)，
- (iii) GYGGEGGLGF (如 SEQ ID NO:13 所示)，以及

所述杂交瘤克隆的轻链可变区包含以下 CDR 序列：

- (i) RSSQSIIDSDGNTYLE(如 SEQ ID NO:14 所示),
- (ii) KVSNRFS(如 SEQ ID NO:15 所示),
- (iii) FQGSHFPYT(如 SEQ ID NO:16 所示)。

在本发明的某些实施方案中,所述杂交瘤克隆包含 SEQ ID NO: 9 所示的重链可变区序列,所述杂交瘤克隆包含 SEQ ID NO: 10 所示的轻链可变区序列。

可以按照以下方案进行抗 ADM 抗体的人源化:

通过序列比对,挑选同源性最高的人抗体胚系基因作为人源化设计框架。将杂交瘤克隆的重链可变区进行 CDR 移植和回复突变获得人源化重链可变区序列。将杂交瘤克隆的轻链可变区进行 CDR 移植和回复突变获得人源化轻链可变区序列。

由此,在本发明的某些实施方案中,所述人源化抗体的重链可变区包含以下 CDR 序列:

- (i) GYAFTTF (如 SEQ ID NO:11 所示),
 - (ii) NTYSRV(如 SEQ ID NO:12 所示),
 - (iii) GYGGEGLGF(如 SEQ ID NO:13 所示), 以及
- 所述人源化抗体的轻链可变区包含以下 CDR 序列:
- (i) RSSQSIIDSDGNTYLE(如 SEQ ID NO:14 所示),
 - (ii) KVSNRFS(如 SEQ ID NO:15 所示),
 - (iii) FQGSHFPYT(如 SEQ ID NO:16 所示)。

在本发明的某些实施方案中,所述人源化抗体包含 SEQ ID NO:17 所示的重链可变区序列,所述人源化抗体包含 SEQ ID NO:18 和 19 任一所示的轻链可变区序列。

在本发明的某些实施方案中,所述人源化抗体包含 SEQ ID NO:17 所示的重链可变区序列,所述人源化抗体包含 SEQ ID NO:18 所示的轻链可变区序列。

在本发明的某些实施方案中，所述人源化抗体包含 SEQ ID NO:17 所示的重链可变区序列，所述人源化抗体包含 SEQ ID NO:19 所示的轻链可变区序列。

在本发明的某些实施方案中，所述单克隆抗体还包含抗体轻链恒定区，所述轻链恒定区为人 Kappa 链恒定区。在本发明中，所述人 Kappa 链恒定区包含 SEQ ID NO: 20 所示的氨基酸序列。

在本发明的某些实施方案中，所述单克隆抗体还包含抗体重链恒定区，所述重链恒定区为人 IgG1 恒定区。在本发明中，所述人 IgG1 恒定区包含 SEQ ID NO: 21 所示的氨基酸序列。

将本发明所述单克隆抗体的轻链可变区序列与人 Kappa 链恒定区组合成抗体轻链，将本发明所述单克隆抗体的重链可变区序列与人 IgG1 恒定区组合成抗体重链。

由此，在本发明的某些实施方案中，所述单克隆抗体包含 SEQ ID NO:23、25、27 任一所示的重链序列，所述单克隆抗体包含 SEQ ID NO:22、24、26 任一所示的轻链序列。

在本发明的某些实施方案中，所述单克隆抗体包含 SEQ ID NO:23 所示的重链序列，所述单克隆抗体包含 SEQ ID NO:22 所示的轻链序列。

在本发明的某些实施方案中，所述单克隆抗体包含 SEQ ID NO:25 所示的重链序列，所述单克隆抗体包含 SEQ ID NO:24 所示的轻链序列。

在本发明的某些实施方案中，所述单克隆抗体包含 SEQ ID NO:27 所示的重链序列，所述单克隆抗体包含 SEQ ID NO:26 所示的轻链序列。

密码子优化后进行基因合成，克隆合成后基因片段到表达载体中。表达质粒扩增和质粒抽提后双质粒共转 Expi293F 或 CHO-K1 细胞中，进行抗体瞬转表达，表达后通过 Protein A 亲和层析柱纯化。经亲和力测定，人源化抗 ADM 抗体展现出对 ADM 的 KD 值小于 10^{-10} M 的亲和力。

本发明还可以通过对全人源单链噬菌体抗体库进行陶选，来进行抗 ADM

单克隆抗体的筛选。

由此，在本发明优选的实施方案中，在所述的抗肾上腺髓质素单克隆抗体或其片段中，

(a)所述单克隆抗体的重链可变区包含以下 CDR 序列：

(i) GYTFTSY (如 SEQ ID NO:43 所示)，

(ii) SAYNGN (如 SEQ ID NO:44 所示)，

(iii) EGRSGGSFDI (如 SEQ ID NO:45 所示)，以及

(b)所述单克隆抗体的轻链可变区包含以下 CDR 序列：

(i) RASQGISSYLA (如 SEQ ID NO:46 所示)，

(ii) DASNLET (如 SEQ ID NO:47 所示)，

(iii) QQYDNLPLT (如 SEQ ID NO:48 所示)。

在本申请中，“单克隆抗体”通常是指从一群基本上同质的抗体获得的抗体，即构成群体的各个抗体相同，除了可能以极少量存在的可能的天然存在突变和/或翻译后修饰（例如异构化、酰胺化）外。例如，在本发明的某些实施方案中，所述的抗肾上腺髓质素单克隆抗体含有 NG 的翻译后修饰（PTM）位点。

在本发明的某些实施方案中，将所述的抗肾上腺髓质素单克隆抗体含有的 NG 的翻译后修饰（PTM）位点，定点突变成 QG 去除脱酰胺异构作用。

由此，在本发明的某些实施方案中，在所述的抗肾上腺髓质素单克隆抗体或其片段中，

(a)所述单克隆抗体的重链可变区包含以下 CDR 序列：

(i) GYTFTSY (如 SEQ ID NO:43 所示)，

(ii) SAYQGN (如 SEQ ID NO:49 所示)，

(iii) EGRSGGSFDI (如 SEQ ID NO:45 所示)，以及

(b)所述单克隆抗体的轻链可变区包含以下 CDR 序列：

(i) RASQGISSYLA (如 SEQ ID NO:46 所示)，

(ii) DASNLET (如 SEQ ID NO:47 所示),

(iii) QQYDNLPLT (如 SEQ ID NO:48 所示)。

在本发明的某些实施方案中, 所述单克隆抗体包含 SEQ ID NO:28 和 29 任一所示的重链可变区序列, 所述单克隆抗体包含 SEQ ID NO:35 所示的轻链可变区序列。

在本发明的某些实施方案中, 所述人源化抗体包含 SEQ ID NO:28 所示的重链可变区序列, 所述人源化抗体包含 SEQ ID NO:35 所示的轻链可变区序列。

在本发明的某些实施方案中, 所述人源化抗体包含 SEQ ID NO:29 所示的重链可变区序列, 所述人源化抗体包含 SEQ ID NO:35 所示的轻链可变区序列。

为了提高全人源抗体与人 ADM 的亲和力, 本发明还设计和构建了全人源抗体的亲和力成熟文库。通过对全人源抗体亲和力成熟文库的筛选和单克隆的鉴定, 本发明获得了不同的全人源抗 ADM 抗体, 它们均展现出对 ADM 的 KD 值小于 10^{-10} M 的亲和力。

因此, 在本发明优选的实施方案中, 在所述的抗肾上腺髓质素单克隆抗体或其片段中:

(a)所述单克隆抗体的重链可变区包含以下 CDR 序列:

(i) GYTFTX₁Y, 其中 X₁ 选自 S、Q 或 H,

(ii) SX₂YX₃GX₄, 其中 X₂ 选自 A 或 P, X₃ 选自 N、Q、S 或 T, X₄ 选择 N 或 K,

(iii) EGRX₅GGSF₆I, 其中 X₅ 选自 S 或 W, X₆ 选自 D 或 N, 以及

(b)所述单克隆抗体的轻链可变区包含以下 CDR 序列:

(i) RAX₇X₈GIX₉X₁₀YLA, 其中 X₇ 选自 S 或 A, X₈ 选自 Q 或 E, X₉ 选自 S 或 G, X₁₀ 选自 S 或 E,

(ii) DX₁₁SX₁₂X₁₃X₁₄X₁₅, 其中 X₁₁ 选择 A、V 或 T, X₁₂ 选自 N、I 或 D, X₁₃

选自 L 或 V, X_{14} 选自 E 或 D, X_{15} 选自 T 或 A,

(iii) QQYDX₁₆LX₁₇LX₁₈, 其中 X_{16} 选自 N 或 D, X_{17} 选自 P 或 D, X_{18} 选自 T 或 S。

在本发明进一步优选的实施方案中, 在所述的抗肾上腺髓质素单克隆抗体或其片段中,

(a) 所述单克隆抗体的重链可变区包含以下 CDR 序列:

(i) GYTFTSY (如 SEQ ID NO:43 所示),

(ii) SAYQGN (如 SEQ ID NO:49 所示),

(iii) EGRWGGSFNI (如 SEQ ID NO:50 所示), 以及

(b) 所述单克隆抗体的轻链可变区包含以下 CDR 序列:

(i) RASQGISSYLA (如 SEQ ID NO:46 所示),

(ii) DASNLET (如 SEQ ID NO:47 所示),

(iii) QQYDNLPLT (如 SEQ ID NO:48 所示)。

在本发明进一步优选的实施方案中, 在所述的抗肾上腺髓质素单克隆抗体或其片段中,

(a) 所述单克隆抗体的重链可变区包含以下 CDR 序列:

(i) GYTFTQY (如 SEQ ID NO:51 所示),

(ii) SAYQGN (如 SEQ ID NO:49 所示),

(iii) EGRWGGSFNI (如 SEQ ID NO:50 所示), 以及

(b) 所述单克隆抗体的轻链可变区包含以下 CDR 序列:

(i) RASEGISEYLA (如 SEQ ID NO:52 所示),

(ii) DASNLET (如 SEQ ID NO:47 所示),

(iii) QQYDNLPLT (如 SEQ ID NO:48 所示)。

在本发明进一步优选的实施方案中, 在所述的抗肾上腺髓质素单克隆抗体或其片段中,

(a) 所述单克隆抗体的重链可变区包含以下 CDR 序列:

- (i) GYTFTQY (如 SEQ ID NO:51 所示),
 - (ii) SAYQGN (如 SEQ ID NO:49 所示),
 - (iii) EGRWGGSFNI (如 SEQ ID NO:50 所示), 以及
- (b)所述单克隆抗体的轻链可变区包含以下 CDR 序列:
- (i) RAAEGIGSYLA (如 SEQ ID NO:53 所示),
 - (ii) DASNLET (如 SEQ ID NO:47 所示),
 - (iii) QQYDNLPLT (如 SEQ ID NO:48 所示)。

在本发明进一步优选的实施方案中, 在所述的抗肾上腺髓质素单克隆抗体或其片段中,

- (a)所述单克隆抗体的重链可变区包含以下 CDR 序列:
- (i) GYTFTSY (如 SEQ ID NO:43 所示),
 - (ii) SPYSGN (如 SEQ ID NO:54 所示),
 - (iii) EGRWGGSFNI (如 SEQ ID NO:50 所示), 以及
- (b)所述单克隆抗体的轻链可变区包含以下 CDR 序列:
- (i) RASEGISEYLA (如 SEQ ID NO:52 所示),
 - (ii) DASNLET (如 SEQ ID NO:47 所示),
 - (iii) QQYDNLPLT (如 SEQ ID NO:48 所示)。

在本发明进一步优选的实施方案中, 在所述的抗肾上腺髓质素单克隆抗体或其片段中,

- (a)所述单克隆抗体的重链可变区包含以下 CDR 序列:
- (i) GYTFTHY (如 SEQ ID NO:55 所示),
 - (ii) SAYQGN (如 SEQ ID NO:49 所示),
 - (iii) EGRWGGSFNI (如 SEQ ID NO:50 所示), 以及
- (b)所述单克隆抗体的轻链可变区包含以下 CDR 序列:
- (i) RASQGISSYLA (如 SEQ ID NO:46 所示),
 - (ii) DVSILDA (如 SEQ ID NO:56 所示),

(iii) QQYDNLPLT (如 SEQ ID NO:48 所示)。

在本发明进一步优选的实施方案中，在所述的抗肾上腺髓质素单克隆抗体或其片段中，

(a)所述单克隆抗体的重链可变区包含以下 CDR 序列：

(i) GYTFTQY (如 SEQ ID NO:51 所示)，

(ii) SAYQGN (如 SEQ ID NO:49 所示)，

(iii) EGRWGGSFNI (如 SEQ ID NO:50 所示)，以及

(b)所述单克隆抗体的轻链可变区包含以下 CDR 序列：

(i) RASQGISSYLA (如 SEQ ID NO:46 所示)，

(ii) DVSILDA (如 SEQ ID NO:56 所示)，

(iii) QQYDNLPLT (如 SEQ ID NO:48 所示)。

在本发明进一步优选的实施方案中，在所述的抗肾上腺髓质素单克隆抗体或其片段中，

(a)所述单克隆抗体的重链可变区包含以下 CDR 序列：

(i) GYTFTQY (如 SEQ ID NO:51 所示)，

(ii) SAYQGN (如 SEQ ID NO:49 所示)，

(iii) EGRWGGSFNI (如 SEQ ID NO:50 所示)，以及

(b)所述单克隆抗体的轻链可变区包含以下 CDR 序列：

(i) RASQGISSYLA (如 SEQ ID NO:46 所示)，

(ii) DASNVDT (如 SEQ ID NO:57 所示)，

(iii) QQYDNLPLT (如 SEQ ID NO:48 所示)。

在本发明进一步优选的实施方案中，在所述的抗肾上腺髓质素单克隆抗体或其片段中，

(a)所述单克隆抗体的重链可变区包含以下 CDR 序列：

(i) GYTFTSY (如 SEQ ID NO:43 所示)，

(ii) SPYTGK (如 SEQ ID NO:58 所示)，

- (iii) EGRWGGSFNI (如 SEQ ID NO:50 所示), 以及
- (b)所述单克隆抗体的轻链可变区包含以下 CDR 序列:
 - (i) RASQGISSYLA (如 SEQ ID NO:46 所示),
 - (ii) DVSILDA (如 SEQ ID NO:56 所示),
 - (iii) QQYDNLPLT (如 SEQ ID NO:48 所示)。

在本发明进一步优选的实施方案中, 在所述的抗肾上腺髓质素单克隆抗体或其片段中,

- (a)所述单克隆抗体的重链可变区包含以下 CDR 序列:
 - (i) GYTFTSY (如 SEQ ID NO:43 所示),
 - (ii) SPYTGK (如 SEQ ID NO:58 所示),
 - (iii) EGRWGGSFNI (如 SEQ ID NO:50 所示), 以及
- (b)所述单克隆抗体的轻链可变区包含以下 CDR 序列:
 - (i) RASQGISSYLA (如 SEQ ID NO:46 所示),
 - (ii) DTSDLDT (如 SEQ ID NO:59 所示),
 - (iii) QQYDNLPLT (如 SEQ ID NO:48 所示)。

在本发明进一步优选的实施方案中, 在所述的抗肾上腺髓质素单克隆抗体或其片段中,

- (a)所述单克隆抗体的重链可变区包含以下 CDR 序列:
 - (i) GYTFTHY(如 SEQ ID NO:55 所示),
 - (ii) SAYQGN (如 SEQ ID NO:49 所示),
 - (iii) EGRWGGSFNI (如 SEQ ID NO:50 所示), 以及
- (b)所述单克隆抗体的轻链可变区包含以下 CDR 序列:
 - (i) RASQGISSYLA (如 SEQ ID NO:46 所示),
 - (ii) DASNLET (如 SEQ ID NO:47 所示),
 - (iii) QQYDDLDT (如 SEQ ID NO:60 所示)。

在本发明进一步优选的实施方案中, 在所述的抗肾上腺髓质素单克隆抗体

或其片段中，

(a)所述单克隆抗体的重链可变区包含以下 CDR 序列：

(i) GYTFTQY (如 SEQ ID NO:51 所示)，

(ii) SAYQGN (如 SEQ ID NO:49 所示)，

(iii) EGRWGGSFNI (如 SEQ ID NO:50 所示)，以及

(b)所述单克隆抗体的轻链可变区包含以下 CDR 序列：

(i) RASQGISSYLA (如 SEQ ID NO:46 所示)，

(ii) DASNLET (如 SEQ ID NO:47 所示)，

(iii) QQYDDLPLS (如 SEQ ID NO:61 所示)。

此外，本发明还获得了亲和力提高后的抗体的重链可变区序列和轻链可变区序列。

由此，在本发明优选的实施方案中，在所述的抗肾上腺髓质素单克隆抗体或其片段中，所述的单克隆抗体包含 SEQ ID NO: 30 至 34 任一所示的重链可变区序列，所述的单克隆抗体包含 SEQ ID NO: 35 至 42 任一所示的轻链可变区序列。

在本发明的某些实施方案中，所述人源化抗体包含 SEQ ID NO:30 所示的重链可变区序列，所述人源化抗体包含 SEQ ID NO:35 所示的轻链可变区序列。

在本发明的某些实施方案中，所述人源化抗体包含 SEQ ID NO:31 所示的重链可变区序列，所述人源化抗体包含 SEQ ID NO:36 所示的轻链可变区序列。

在本发明的某些实施方案中，所述人源化抗体包含 SEQ ID NO:31 所示的重链可变区序列，所述人源化抗体包含 SEQ ID NO:37 所示的轻链可变区序列。

在本发明的某些实施方案中，所述人源化抗体包含 SEQ ID NO:32 所示的重链可变区序列，所述人源化抗体包含 SEQ ID NO:36 所示的轻链可变区序列。

列。

在本发明的某些实施方案中，所述人源化抗体包含 SEQ ID NO:33 所示的重链可变区序列，所述人源化抗体包含 SEQ ID NO:38 所示的轻链可变区序列。

在本发明的某些实施方案中，所述人源化抗体包含 SEQ ID NO:31 所示的重链可变区序列，所述人源化抗体包含 SEQ ID NO:38 所示的轻链可变区序列。

在本发明的某些实施方案中，所述人源化抗体包含 SEQ ID NO:31 所示的重链可变区序列，所述人源化抗体包含 SEQ ID NO:39 所示的轻链可变区序列。

在本发明的某些实施方案中，所述人源化抗体包含 SEQ ID NO:34 所示的重链可变区序列，所述人源化抗体包含 SEQ ID NO:38 所示的轻链可变区序列。

在本发明的某些实施方案中，所述人源化抗体包含 SEQ ID NO:34 所示的重链可变区序列，所述人源化抗体包含 SEQ ID NO:40 所示的轻链可变区序列。

在本发明的某些实施方案中，所述人源化抗体包含 SEQ ID NO:33 所示的重链可变区序列，所述人源化抗体包含 SEQ ID NO:41 所示的轻链可变区序列。

在本发明的某些实施方案中，所述人源化抗体包含 SEQ ID NO:31 所示的重链可变区序列，所述人源化抗体包含 SEQ ID NO:42 所示的轻链可变区序列。

在本发明的某些实施方案中，所述单克隆抗体还包含抗体轻链恒定区，所述轻链恒定区为人 Kappa 链恒定区。在本发明中，所述人 Kappa 链恒定区包含 SEQ ID NO: 20 所示的氨基酸序列。

在本发明的某些实施方案中，所述单克隆抗体还包含抗体重链恒定区，所

述重链恒定区为人 IgG1 恒定区。在本发明中，所述人 IgG1 恒定区包含 SEQ ID NO: 21 所示的氨基酸序列。

将所述的单克隆抗体的轻链可变区序列与人 Kappa 链恒定区组合成抗体轻链，将所述的单克隆抗体的重链可变区序列与人 IgG1 恒定区组合成抗体重链。

密码子优化后进行基因合成，克隆合成后基因片段到表达载体 pcDNA3.4 中，在 CHO 细胞表达、纯化，可以得到亲和力成熟的单克隆抗体。经亲和力和测定，所述抗 ADM 抗体展现出对 ADM 的 KD 值小于 10^{-10} M 的亲和力。

本发明再一方面提供了编码本发明所述的抗肾上腺髓质素单克隆抗体或其片段的核苷酸序列。

本发明再一方面提供了包含本发明所述的核苷酸序列的表达载体，其中优选为载体 pcDNA3.4。

本发明再一方面提供了包含本发明所述的核苷酸序列或表达载体的宿主细胞，其中优选为 CHO 细胞。

本发明再一方面提供了一种包含本发明所述的抗肾上腺髓质素单克隆抗体或其片段的药物组合物、检测试剂或套装药盒。

本发明再一方面提供了本发明所述的抗肾上腺髓质素单克隆抗体或其片段在制备用于维持内皮细胞完整性、增强屏障作用的药物中的应用。

本发明再一方面提供了本发明所述的抗肾上腺髓质素单克隆抗体或其片段在制备用于控制血管舒张、降低血压的药物中的应用。

本发明再一方面提供了本发明所述的抗肾上腺髓质素单克隆抗体或其片段在制备用于治疗或预防脓毒性休克或创伤性损伤，尤其是脓毒症晚期的药物中的应用。

本发明再一方面提供了本发明所述的抗肾上腺髓质素单克隆抗体或其片段在制备用于降低患者的慢性或者急性病或急性病症的死亡风险的药物中的应用，所述慢性或者急性病或急性病症选自重度感染，如脑膜炎、全身炎症反应

综合征(SIRS)、败血症；其它疾病如糖尿病、癌症、急性和慢性血管疾病如心力衰竭、心肌梗死、卒中、动脉粥样硬化，水肿；休克如败血性休克和器官功能障碍如肾功能障碍、肝功能障碍、烧伤、手术、外伤、中毒。

本发明再一方面提供了本发明所述的抗肾上腺髓质素单克隆抗体或其片段在制备用于稳定患者循环尤其是全身循环的药物中的应用，所述患者患有慢性或者急性病或急性病症，所述慢性或者急性病或急性病症选自重度感染，如脑膜炎、全身炎症反应综合征(SIRS)、败血症；其它疾病如糖尿病、癌症、急性和慢性血管疾病如心力衰竭、心肌梗死、卒中、动脉粥样硬化，水肿；休克如败血性休克和器官功能障碍如肾功能障碍、肝功能障碍、烧伤、手术、外伤、中毒。

在本发明优选的实施方案中，所述的抗肾上腺髓质素单克隆抗体或其片段与另一种药剂联合使用。

在本发明进一步优选的实施方案中，所述的药剂选自血管加压药，静脉注射液，TNF- α -抗体和抗生素。

技术效果

本发明通过杂交瘤技术筛选出抗 ADM 单克隆抗体，并通过抗体的人源化表达、全人源单链噬菌体抗体库淘选，获得了全人源抗 ADM 单克隆抗体。在此基础上，本发明通过筛选亲和力成熟文库，最终获得了具有较高的与人 ADM 的 N 端相结合的活性。与现有技术中存在的抗 ADM 非中和抗体相比，本发明的抗 ADM 非中和抗体展现出对 ADM 的 KD 值小于 10^{-10} M 的亲和力。

动物试验表明，使用本发明的抗 ADM 非中和性抗体进行治疗，可以显著改善脓毒症症状，提高动物的存活率。

附图说明

图 1 是抗 ADM 抗体阻断 hADM 诱导 CHOK1/CRLR/RAMP3 细胞产生

cAMP 示意图。

图 2 是抗 ADM 抗体对 LPS 诱导的小鼠脓毒症存活率结果图。

具体实施方式

为了更好的说明本方法的目的和优点，结合附图及具体实施例对本发明具体实施内容做进一步详细说明。

实施例 1：杂交瘤技术筛选抗 ADM 单克隆

1.1 小鼠免疫

分别将合成的人 ADM 的 N 端 16 个氨基酸多肽（简称 YY-16，SEQ ID NO: 1）、人 ADM 的 N 端 21 个氨基酸多肽（简称 YY-21，SEQ ID NO: 2）或鼠 ADM 的 N 端 19 个氨基酸多肽（简称 YY-19，SEQ ID NO: 3）与 KLH（Sigma，H8283）的偶联物作为免疫原免疫小鼠。初次免疫时，将免疫原与弗氏完全佐剂以 1:1 的比例进行乳化，腹腔注射至 6~8 周龄雌性 Balb/c 小鼠、SJL 小鼠或 SD 大鼠，100 μ g/只；之后每间隔 2~3 周进行加强免疫，每只动物 50 μ g 免疫原加弗氏不完全佐剂，免疫 3~4 次后采血测效价。最后一次免疫一周后取血，ELISA 测定血清抗 YY-21 的滴度。血清效价高的鼠经腹腔注射 50 μ g 免疫原冲击免疫后，第三天取动物的脾脏细胞进行融合。

1.2 脾细胞融合

鼠安乐死后，解剖、取脾、研磨并收集细胞，用 5 mL 红细胞裂解液悬浮细胞，4°C 放置 5 min，用 DMEM+10%FBS 终止反应。离心后用 40 mL DMEM 重悬脾细胞，静置 2~3min 后转移上清到另外一个 50 mL 离心管中。按 SP2/0: 脾细胞=1:2 的比例混合，离心，充分吸取上清后，混合细胞沉淀，用 DMEM 洗涤混合细胞两次，用电融合缓冲液重悬细胞，加入电融合槽中。待电融合程序结束后，将融合后的细胞先静置 5 min，再加入到 DMEM+10%FBS+1 $\times$ HAT 筛选培养基中。将上述细胞悬液加入 96 孔细胞培养板内，置 37°C、湿度

75%、5%CO₂培养箱内培养 7~9 天。

1.3 杂交瘤克隆的筛选

用 PBS 分别稀释 YY-21 或 YY-19 至 1.0 µg/mL，加至 96 孔板（Corning，9018）内，100 µL/孔，置 4°C 包被过夜。第二天将 ELISA 板在自动洗板机上用洗涤缓冲液（PBS+0.05%吐温 20）洗涤 3 次。每孔加入 300 µL 封闭缓冲液（PBS+0.05%吐温 20+1%BSA），置室温封闭 1 h。然后在自动洗板机上用洗涤缓冲液洗涤 3 次，加杂交瘤上清至 ELISA 板各孔内，置室温孵育 1 h，然后依照上述方法洗板 3 次。用封闭缓冲液中 1:5000 稀释 Goat Anti-mouse IgG Fc-HRP (Sigma, A0168)或 Goat Anti-rat-IgG-HRP (Sigma, A5795)，每孔加入 100 µL，置室温孵育 1 h。然后依照上述方法洗板 3 次。加入 100 µL/孔 TMB 底物液室温孵育 10 min，然后每孔加入 50 µL 1.0 M 盐酸终止反应，通过酶标仪在 OD_{450nm} 读板。挑取阳性细胞进行亚克隆及亚克隆筛选，直至得到稳定的可分泌结合 YY-21 和 YY-19 的单克隆抗体的杂交瘤细胞株。通过结合实验，筛选到杂交瘤克隆 40E12，冻存细胞株，并采用无血清培养基进行 50 mL 小规模生产，protein A 柱纯化后做后续鉴定。

1.4 杂交瘤克隆 40E12 的亲合力测定

采用 Octet RED96e (Fortebio) 测定候选抗体与生物素标记的人 ADM（简称人 ADM-C-biotin，人 ADM 序列如 SEQ ID NO: 4 所示）和鼠 ADM（简称鼠 ADM-C-biotin，鼠 ADM 序列如 SEQ ID NO: 5 所示）的亲合力。抗原及抗体均用 1×PBST 稀释，抗原使用浓度为 2 µg/ml，抗体使用工作浓度为 100 nM。

首先，将样品加入 96 孔板（Greiner bio-one，655209），体系为 200 µL/well。然后设置软件参数，板温设定为 30°C，收集标准动力学信号的频率为 5.0 HZ。接着，用 1×PBST 预湿链霉亲和素传感器（Fortebio，货号：18-5020）10 min，然后上机检测。每个循环包含以下步骤：1）浸入缓冲液 180 s，使基线平稳；2）抗原固化 10 s，使抗原结合到传感器上，抗原结合量控制在 0.5-1.0 nm 之间；3）传感器浸入缓冲液 180 s；4）抗原与抗体结合，结合时

间 180 s；5) 抗原抗体的解离，时间 10 min。

采用 Fortebio 的 Data Analysis 12.0 软件，对抗原-抗体以 1:1 的结合方式，测定结合速率 (Kon) 和解离速率 (Koff)，以此计算抗体的平衡解离常数 (KD) 结果如表 1 所示。

表 1 候选抗体 40E12 的平衡解离常数 (KD)			
抗原	KD (M)	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)
人 ADM-C-biotin	3.14E-10	3.47E+05	1.09E-04
鼠 ADM-C-biotin	2.36E-10	3.77E+05	8.90E-05

1.5 杂交瘤克隆 40E12 的测序

培养杂交瘤单克隆细胞株，离心收集 5×10^6 个杂交瘤细胞，Trizol 法提取总 RNA，逆转录反应后得到的 cDNA，通过末端转移酶进行加 G 反应，后用 VH 引物（序列如 SEQ ID NO: 6 所示）、VK 引物（序列如 SEQ ID NO: 7 所示）和 polyC 引物（序列如 SEQ ID NO: 8 所示）扩增含可变区序列的 DNA，做 TA 克隆，测序后得鼠源杂交瘤克隆 40E12 重链可变区（40E12VH）和 40E12 轻链可变区（40E12VK）序列分别如 SEQ ID NO: 9 和 SEQ ID NO: 10 所示。对轻重链可变区进行 Chothia 编号，采用 Chothia 定义的克隆 40E12 的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 的氨基酸序列分别示于 SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12 和 SEQ ID NO: 13，LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 的氨基酸序列分别示于 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15 和 SEQ ID NO: 16。

实施例 2：抗 ADM 抗体的人源化和表达

2.1 抗 ADM 抗体的人源化

通过序列比对，挑选同源性最高的人抗体胚系基因作为人源化设计框架。

重链可变区以人抗体胚系基因序列 IGHV7-4-1*02 和 IGHJ6*01 为框架，将 40E12VH（又简称为 2004hzVH0）进行 CDR 移植和回复突变获得人源化重链可变区序列 2004hzVH9（氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17）。轻链可变区以人抗体胚系基因序列 IGKV2-30*02 和 IGKJ2*01 为框架，将 40E12VK（又简称为

2004hzVK0) 进行 CDR 移植和回复突变的人源化轻链可变区序列 2004hzVK7 (氨基酸序列如 SEQ ID NO: 18) 和 2004hzVK9 (氨基酸序列如 SEQ ID NO: 19)。

2.2 抗 ADM 抗体的表达

将 2004hzVK7、2004hzVK9 序列与人 Kappa 链恒定区 (CL, 氨基酸序列 SEQ ID NO: 20) 组合成抗体轻链, 将 2004hzVH9 序列与人 IgG1 恒定区 (CH, 氨基酸序列 SEQ ID NO: 21) 组合成抗体重链。2004hzVH0 和 2004hzVK0 分别与人重链恒定区和人轻链恒定区组合后配对组成嵌合抗体 2004hz00 (序列如 SEQ ID NO: 22 和 23 所示); 2004hzVH9 和 2004hzVK7 分别与人重链恒定区和人轻链恒定区组合后配对组成人源化抗体 2004hz97 (序列如 SEQ ID NO: 24 和 25 所示); 2004hzVH9 和 2004hzVK9 分别与人重链恒定区和人轻链恒定区组合后配对组成人源化抗体 2004hz99 (序列如 SEQ ID NO: 26 和 27 所示)。

密码子优化后进行基因合成, 克隆合成后基因片段到表达载体 pcDNA3.4 (Life Technologies)。表达质粒扩增和质粒抽提 (Qiagen, EndoFree® Plasmid Maxi Kit, Cat. No. 12362) 后双质粒共转 Expi293F (ThermoFisher Scientific, A14527) 或 CHO-K1 细胞 (ECACC catalogue no. 85051005), 根据供应商 Expi293F 或 CHO-K1 表达系统方法进行抗体瞬转表达, 表达后通过 Protein A 亲和层析柱纯化, 柠檬酸缓冲液 (PH3.4) 洗脱, 使用 NanoDrop 仪器读取 280 nm 吸光度值; 透析收集抗体备用。

抗体表达结果如表 2 所示, 表明利用上述方法能表达出抗 ADM 抗体。

表 2 候选抗体的表达量

抗体名称	表达量 (mg/L)
2004hz00	71.7
2004hz97	260.0
2004hz99	215.0

实施例 3：抗 ADM 抗体的亲和力测定

采用 Octet RED96e（ForteBio）测定抗体 2004hz00、2004hz97、2004hz99 与生物素标记的人、小鼠 ADM（人 ADM 货号：894757，小鼠 ADM 货号：894758，GLBiochem 合成）的亲和力，抗原及抗体均用 1×PBST（1×PBS：生工，B548117-0500；0.02%吐温 20：sigma，P1379）稀释，抗体使用浓度为 100 nM，抗原使用浓度为 2 μg/mL。将候选抗体样品按 200 μL/孔加入 96 孔板（Greiner bio-one，655209），设置软件参数，温度 30 °C、收集标准动力学信号的频率为 5.0 Hz；用 1×PBST 预湿 SA 传感器（ForteBio，货号：18-5020）10 min，然后上机检测。

每个循环包含以下步骤：1）浸入缓冲液 60 s；2）检测抗原是否与传感器有非特异性结合；3）10 mM pH1.7 的甘氨酸溶液再生；4）浸入缓冲液 60 s；5）抗原固化在传感器上，时间为 10 s；6）传感器浸入缓冲液 180 s；7）抗原与抗体结合，时间 180 s；8）抗原抗体的解离，时间 600 s；9）传感器再生。

采用 ForteBio 的 Data Analysis 12.0 软件，对抗原-抗体以 1:1 的结合方式，测定结合速率（Kon）和解离速率（Koff），以此计算抗体的平衡解离常数（KD），结果分别如表 3 和表 4 所示。由表 3 和表 4 可知，人源化抗体 2004hz97、2004hz99 与人、小鼠 ADM 的亲和力与嵌合抗体 2004hz00 亲和力相当。

表 3 候选抗体与人 ADM 的亲和力

抗体名称	响应值	KD (M)	kon(1/Ms)	Koff (1/s)
2004hz00	2.69	4.57E-10	4.41E+05	2.01E-04
2004hz97	2.39	5.46E-10	4.61E+05	2.52E-04
2004hz99	2.58	4.29E-10	4.68E+05	2.01E-04

表 4 候选抗体与小鼠 ADM 的亲和力

抗体名称	响应值	KD (M)	kon(1/Ms)	Koff (1/s)
2004hz00	3.19	4.54E-10	4.32E+05	1.96E-04
2004hz97	3.00	4.89E-10	4.72E+05	2.31E-04
2004hz99	3.06	4.18E-10	4.65E+05	1.94E-04

实施例 4：人源化抗体理化性质评估

抗体 2004hz97 和 2004hz99 的表达量及亲和力较为理想，作为候选分子继续进行理化成药性评估，具体如下。

4.1 SEC-HPLC 纯度分析

将样品浓度调整至 1 mg/mL，离心取上清转至样品瓶，放入 HPLC 样品盘。设置色谱条件如下：色谱柱，TSK G3000SWxl；检测波长，280 nm；柱温，25 °C；样品室温度，5 °C；流速，0.5 mL/min。色谱柱采用流动相（200 mM 磷酸盐缓冲液，pH6.8）平衡后，进样分析，用色谱软件进行数据分析，峰面积归一化法计算各个峰的峰面积百分比，百分比越高说明抗体纯度越高。

4.2 HIC-HPLC 分析

将样品浓度调整至 1 mg/mL，离心取上清待测。设置色谱条件如下：色谱柱，MAbPacTMHIC-10；检测波长，214 nm；柱温，30 °C；样品室温度，5 °C；流速，0.8 mL/min。用流动相 A（50 mM 磷酸盐缓冲液/1 M 硫酸铵，pH 7.0）和流动相 B（50 mM 磷酸盐缓冲液，pH 7.0）进行梯度洗脱，记录主峰保留时间，出峰时间短则抗体亲水性强。

4.3 熔解温度（T_m）值分析

按照 Protein Thermal ShiftTM Starter Kit 说明书，取供试品溶液 13 μL 加入至 PCR 管内，加入 5 μL Protein Thermal shift TM Buffer，加入 2 μL10×染色液，使反应体积为 20 μL，混匀后，12000 rpm 离心 5 min 以去除气泡。将检测样品置于 PCR 仪内，进行样品分析，记录样品的 T_m 值，T_m 值越高表示抗体的热稳定性越好。

4.4 等电聚焦（iCIEF）分析

取样品溶液加入到已经充分混匀的以下体系中：1%的甲基纤维素（MC）70 μL，尿素 5 M 80 μL，两性电解质 Pharmalyte pH 3-10 8 μL，pI marker 5.5 和 9.5 各 2 μL。补加适当体积超纯水至 200 μL，混匀。离心取上清进样分析。分

析结束后，将结果文件导入 ChromPerfect 软件进行图谱积分处理并计算各峰的等电点以及各峰百分比，分析候选抗体的电荷异构体分布情况。

4.5 nrCE-SDS

用超纯水将样品稀释到 4 mg/mL，取 25 μL，加入 SDS 样品缓冲液 75 μL，0.25 mol. L-1 碘乙酰胺（IAM）5 μL，混匀后，70℃加热 10 min，取 90 μL 上清放入样品瓶中上机分析。采用 Beckman PA800 Plus 毛细管电泳系统，无涂层毛细管（总长度 31cm，有效长度 21cm）检测；检测条件：分离电压为 15KV，毛细管温度 25℃，样品室温度 15℃，检测波长 220 nm。计算主峰校正峰面积百分比。

由表 5 可知，人源化抗体 2004hz97、2004hz99 经过一步 protein A 纯化，已具有良好的理化特性。

表 5 候选抗体理化性质分析结果

样品名称	SEC-HPLC			cIEFIEF				nrCE-SDS	T _m (°C)	HIC-HPLC (min)
	HMW S%	Main Peak%	LMWS %	pI	酸性 峰%	主峰%	碱性 峰%	主峰%		
2004hz99	0.6	99.4	0	9	11.4	41.1	47.5	96.2	69.44	16.44
2004hz97	0.5	99.5	0	9	12.7	42.2	45.1	95.2	70.21	16.44

实施例 5: 全人源单链噬菌体抗体库淘选

取 150 μL Streptavidin Magnetic Beads（Thermo fisher，货号：88817）与 2 mL 全人源单链噬菌体抗体库预结合，室温孵育 90 min，去除非特异性结合。将去除背景后的文库噬菌体加入 10 μg 人 ADM (货号 NT-H-2，金斯瑞合成)，150 μL Streptavidin Magnetic Beads，室温孵育 15 min，PBST（PBS 中含有 0.05% Tween-20）洗 14 遍，洗去不结合的噬菌体。用 450 μL 100 mM 盐酸洗脱抗原特异性结合的噬菌体，加入 50 μL pH11 的 1M Tris-HCl 中和并感染处于对数生长期的大肠杆菌 SS320，产生并纯化噬菌体用于下一轮的筛选。筛选方法与第一轮相同，仅将抗原用量减为 4 μg。取两轮筛选后富集的噬菌体用酶联免疫（ELISA）鉴定富集情况，结果表明，经过两轮淘选后噬菌体富集明显。

取 10 μL 两轮淘选后洗脱的噬菌体梯度稀释 10000 倍，加入 90 μL 对数生

长期的大肠杆菌 SS320，静置侵染 30 min 后涂布抗性平板，37°C 过夜培养。次日从抗性平板上挑取单克隆菌斑放入已加入氨苄青霉素/IPTG/2YT 的 96 深孔板中，37°C 过夜培养。次日 4000 g 离心 10 min 取上清，通过酶联免疫（ELISA）鉴定单克隆结合能力筛选出单克隆 1F12（可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO: 28 和 35 所示）。

实施例 6：抗 ADM 抗体对 ADM 生物活性的影响

在人重组肾上腺髓质素受体 cAMP 功能测定（肾上腺髓质素生物测定）中检测所选的抗 ADM 抗体对 ADM 生物活性的影响。

用 Stimulation Buffer 1（Cisbio, 64SB1FDD）将抗 ADM 抗体稀释到 1600 $\mu\text{g/mL}$ ，工作浓度为 400 $\mu\text{g/mL}$ ，随后用 Stimulation Buffer 1 进行 3 倍梯度稀释（8 μL +16 μL Stimulation Buffer 1），其中拮抗剂人 ADM(22-52)（Alfa Aesar，货号：159899-65-7）稀释到 12000 $\mu\text{g/mL}$ ，工作浓度为 3000 $\mu\text{g/mL}$ ，随后实验板中相应孔加入 2.5 μL 抗 ADM 抗体。将人 ADM JMB2004 YY-52 蛋白（吉尔生化，货号：196191）用 Stimulation Buffer 1 稀释到 0.6 $\mu\text{g/mL}$ ，相应孔加入 2.5 μL ，即人 ADM JMB2004 YY-52 蛋白工作浓度为 0.15 $\mu\text{g/mL}$ ，随后实验板于室温孵育 60 min。用 TrypLE Express（gibco，货号：12604-021）消化分离表达人重组肾上腺髓质素受体的 CHO-K1 细胞（以下简称 CHO-K1/CRLR/RAMP3，其中 CRLR 的基因登录号为 U17473，RAMP3 的基因登录号为 AJ001016），通过离心收集并重悬于 Stimulation Buffer 1 中，调整细胞密度至 $4 \times 10^6/\text{mL}$ ，每孔加入 5 μL CHO-K1/CRLR/RAMP3 细胞（ 2×10^4 细胞/孔）。随后实验板于 37°C 细胞培养箱孵育 90 min 后，用 HTRF 试剂盒（Cisbio, 62AM4PEB）检测 cAMP 的含量，即实验孔加入 5 μL cAMP-d2 reagent 工作液，然后加入 5 μL cAMP Eu-Cryptate antibody working solution，室温孵育 1 h 后，酶标仪检测 HTRF 值。

实验结果如图 1 所示，从图 1 可以看出，抗体 1F12 无阻断活性。

实施例 7：全人源抗体 1F12 的亲和力成熟文库设计与构建

对筛选获得的全人源抗体 1F12 进行亲和力成熟，提高其与人 ADM 的亲和力。同时，由于 1F12 的重链抗原结合决定簇 2 (CDR_H2) 含有 NG 的翻译后修饰 (PTM) 位点，定点突变成 QG 去除脱酰胺异构作用，突变的抗体命名为 1F12 PTMA (可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO: 29 和 35 所示)。以突变体 1F12 PTMA 为亲本，按 Chothia 规则进行编码，按 Chothia 定义 CDR 区，对其 HCDR-3、LCDR-3 位点的氨基酸进行随机突变，构建突变文库。设计 NNK 突变引物进行聚合酶链式反应 (PCR) 扩增 HCDR-3、LCDR-3 突变文库基因片段，扩增的 VH、VL 基因片段回收后与酵母展示质粒共同电转入酿酒酵母菌株 EBY100 (购自 ATCC)，通过酿酒酵母的同源重组使 VH、VL 基因插入至酵母展示质粒中，进而实现在酵母细胞壁表面展示抗体的 Fab 突变文库，文库命名为 JYYDL196-197。电转后文库 JYYDL196-197 在 250 mL 的 SD-Trp-Leu 液体培养基 (Clontech, 货号: 630316)，30 °C 培养过夜；各取 1.0×10^9 菌量，重悬于 200 mL YPGP 诱导培养基 (2% 半乳糖，2% 蛋白胨，1% 酵母提取物，0.54% Na_2HPO_4 ，0.86% $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)，20 °C 培养 24 h，置于 4 °C 待用。同时将亲本 1F12 PTMA 的序列展示于酵母表面，作为亲本对照使用。

实施例 8：全人源抗体 1F12 亲和力成熟文库筛选与单克隆鉴定

JYYDL196-197 文库诱导后菌液，测定菌液的 OD_{600} ，按 1OD 为 1.0×10^7 细胞数计算，取 1.0×10^9 细胞，用磁珠分选系统进行第一轮富集：用 50 mL 1×PBSA (1×PBS+1%BSA) 洗涤一次，离心弃上清；与 5 mL 含 100 nM 生物素标记的人 ADM (简称 hADM-Biotin, 货号 NT-H-2, 金斯瑞合成) 的 1×PBSA，室温孵育 30 min；洗涤后加入抗生物素的磁珠 (miltenty, 货号: 130-090-485) 混匀孵育 10 min，过磁力柱 (Quadro MACS Starting Kit) 收集阳性细胞。阳性细胞经过再次培养、诱导后，取 3.0×10^7 细胞进行第二轮流式分

选：用 1 mL 1×PBSA，离心弃上清；与 1 mL 含 10 nM hADM-Biotin 及鼠抗 V5 抗体（Invitrogen，货号 2156578，1:1000 稀释）的 1×PBSA 冰上孵育 30 min；离心弃上清，加入 1 mL 1×PBSA 洗涤一次；加入 500 μL 含荧光抗体的 1×PBSA（SA-PE 厂家 eBioscience，货号：12-4317-8，按 1:200 稀释；羊抗鼠-647 厂家 Invitrogen，货号：A21235，按 1:400 稀释），避光冰上孵育 20 min；洗涤后加入 2 mL 1×PBSA 重悬细胞，通过流式分选仪器收集 647 荧光信号与 PE 荧光信号均强的细胞群。第二轮流式分选后细胞经过再次培养、诱导后，同第二轮方法，取 3.0×10^7 细胞在 3 nM hADM-Biotin 孵育后进行第三轮流式分选，分选后取部分细胞涂布于 SD-Trp-Leu 固体培养基（Clontech，货号：630317）平板，30 °C 静置培养 3 天。

JYYDL196-197 第三轮筛选产物，各挑取 92 个单克隆进行测序分析，最终获得独一序列的酵母单克隆菌落进行流式染色分析，各取 1×10^6 个细胞进行染色评估，根据各克隆的染色结果，综合各克隆序列的相似性，最终挑取全人源抗体 Ab2004.Am01（可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO: 30 和 35 所示）进行表达。

实施例 9：Ab2004.Am01 亲和力成熟文库设计与构建

对 Ab2004.Am01 继续进行亲和力成熟，提高其与人、小鼠 ADM 的亲和力。参考实施例 7，选择 Ab2004.Am01 的 HCDR-1、HCDR-2、LCDRL-1、LCDR-2、LCDR-3 的氨基酸进行突变文库构建，文库编号 JYYDL208-212。文库 JYYDL208-212 培养、诱导后待用。同时将 Ab2004.Am01 的 Fab 序列展示于酵母表面，作为本轮亲和成熟的亲本对照使用。

实施例 10：Ab2004.Am01 亲和力成熟文库筛选

JYYDL208-212 文库诱导后菌液，取 1.0×10^9 细胞用磁珠分选系统进行第一轮富集，磁珠筛选后阳性细胞经过再次培养、诱导，取 3.0×10^7 细胞进行第二

轮流式分选，通过流式分选仪器收集 647 荧光信号与 PE 荧光信号均强的细胞群，细胞群培养、诱导后进行第三轮流式筛选。JYYDL208-209 的第二轮筛选产物，取 3.0×10^7 细胞在 10 nM mADM-Biotin 条件下进行第三轮流式分选；JYYDL210-212 取 3.0×10^7 细胞在 100 nM mADM-Biotin 条件下进行第三轮流式分选。第二轮、第三轮分选后细胞涂布于 SD-Trp-Leu 固体培养基平板，30°C 静置培养 3 天。

实施例 11：轻、重链突变组合文库构建与筛选

JYYDL208-209, JYYDL211 第二轮、第三轮筛选产物，各挑取若干单克隆构建轻、重链突变组合文库 JYYDL227。

JYYDL227 取 2.0×10^7 细胞，分别用 3 nM hADM-Biotin 和 1.2 nM mADM-Biotin 进行流式第一轮分选；分选后取细胞涂布于 SD-Trp-Leu 固体培养基，30 °C 静置培养 3 天。

JYYDL227 第一轮筛选产物，各挑取 46 个单克隆进行测序，最终获得独一序列的酵母单克隆菌落进行流式染色 EC_{50} 鉴定。各取 1×10^5 个细胞进行染色评估：1、评估各克隆在不同抗原浓度下与人 ADM 的结合水平，计算出各克隆与人 ADM 的 EC_{50} 值，值越小说明亲和力越强；2、评估各克隆在不同抗原浓度下与小鼠 ADM 的结合水平，同理可得到各克隆与小鼠 ADM 的亲和力强弱。

根据各克隆的染色结果（如表 6 所示），综合各克隆序列的相似性，最终挑取了表达抗体 Ab2004.Am31（可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO: 31 和 36 所示）、Ab2004.Am32（可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO: 31 和 37 所示）、Ab2004.Am33（可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO: 32 和 36 所示）、Ab2004.Am34（可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO: 33 和 38 所示）、Ab2004.Am35（可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO: 31 和 38 所示）、Ab2004.Am36（可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO: 31 和 39 所示）、Ab2004.Am37（可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO: 34 和 38 所示）、

Ab2004.Am38（可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO: 34 和 40 所示）、Ab2004.Am39（可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO: 33 和 41 所示）和 Ab2004.Am40（可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO: 31 和 42 所示）的单克隆。候选抗体的 Chothia 编号的 CDR 区氨基酸序列见表 7，候选抗体的轻重链可变区氨基酸序列见表 8。

表 6 酵母单克隆菌落流式染色结果

抗体名称	人 ADM EC ₅₀ (nM)	小鼠 ADM EC ₅₀ (nM)
Ab2004.Am01	4.00	88.22
Ab2004.Am31	0.45	1.66
Ab2004.Am32	0.41	2.20
Ab2004.Am33	0.79	15.04
Ab2004.Am34	1.06	4.43
Ab2004.Am35	1.47	2.26
Ab2004.Am36	1.73	2.67
Ab2004.Am37	0.88	6.74
Ab2004.Am38	0.74	14.3
Ab2004.Am39	0.86	4.23
Ab2004.Am40	0.50	2.50

表 7 候选抗体的 Chothia 编号的 CDR 序列

	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
1F12	GYTFTSY (SEQ ID NO: 43)	SAYNGN (SEQ ID NO: 44)	EGRSGGSFDI (SEQ ID NO: 45)	RASQGISSYLA (SEQ ID NO:46)	DASNLET (SEQ ID NO:47)	QQYDNLPLT (SEQ ID NO:48)
1F12-PTMΔ	GYTFTSY (SEQ ID NO: 43)	SAYQGN (SEQ ID NO: 49)	EGRSGGSFDI (SEQ ID NO: 45)	RASQGISSYLA (SEQ ID NO:46)	DASNLET (SEQ ID NO:47)	QQYDNLPLT (SEQ ID NO:48)
Ab2004.Am01	GYTFTSY (SEQ ID NO: 43)	SAYQGN (SEQ ID NO: 49)	EGRWGGSFNI (SEQ ID NO:50)	RASQGISSYLA (SEQ ID NO:46)	DASNLET (SEQ ID NO:47)	QQYDNLPLT (SEQ ID NO:48)
Ab2004.Am31	GYTFTQY (SEQ ID NO: 51)	SAYQGN (SEQ ID NO: 49)	EGRWGGSFNI (SEQ ID NO:50)	RASEGISEYLA (SEQ ID NO:52)	DASNLET (SEQ ID NO:47)	QQYDNLPLT (SEQ ID NO:48)
Ab2004.Am32	GYTFTQY (SEQ ID NO: 51)	SAYQGN (SEQ ID NO: 49)	EGRWGGSFNI (SEQ ID NO:50)	RAAEGIGSYLA (SEQ ID NO:53)	DASNLET (SEQ ID NO:47)	QQYDNLPLT (SEQ ID NO:48)
Ab2004.Am33	GYTFTSY (SEQ ID NO: 43)	SPYSGN (SEQ ID NO: 54)	EGRWGGSFNI (SEQ ID NO:50)	RASEGISEYLA (SEQ ID NO:52)	DASNLET (SEQ ID NO:47)	QQYDNLPLT (SEQ ID NO:48)
Ab2004.Am34	GYTFTHY	SAYQGN	EGRWGGSFNI	RASQGISSYLA	DVSILDA	QQYDNLPLT

	(SEQ ID NO: 55)	(SEQ ID NO: 49)	(SEQ ID NO: 50)	(SEQ ID NO: 46)	(SEQ ID NO: 56)	(SEQ ID NO: 48)
Ab2004.Am35	GYTFTQY (SEQ ID NO: 51)	SAYQGN (SEQ ID NO: 49)	EGRWGGSFNI (SEQ ID NO: 50)	RASQGISSYLA (SEQ ID NO: 46)	DVSILDA (SEQ ID NO: 56)	QQYDNLPLT (SEQ ID NO: 48)
Ab2004.Am36	GYTFTQY (SEQ ID NO: 51)	SAYQGN (SEQ ID NO: 49)	EGRWGGSFNI (SEQ ID NO: 50)	RASQGISSYLA (SEQ ID NO: 46)	DASNVDI (SEQ ID NO: 57)	QQYDNLPLT (SEQ ID NO: 48)
Ab2004.Am37	GYTFTSY (SEQ ID NO: 43)	SPYTGK (SEQ ID NO: 58)	EGRWGGSFNI (SEQ ID NO: 50)	RASQGISSYLA (SEQ ID NO: 46)	DVSILDA (SEQ ID NO: 56)	QQYDNLPLT (SEQ ID NO: 48)
Ab2004.Am38	GYTFTSY (SEQ ID NO: 43)	SPYTGK (SEQ ID NO: 58)	EGRWGGSFNI (SEQ ID NO: 50)	RASQGISSYLA (SEQ ID NO: 46)	DTSDLDI (SEQ ID NO: 59)	QQYDNLPLT (SEQ ID NO: 48)
Ab2004.Am39	GYTFTHY (SEQ ID NO: 55)	SAYQGN (SEQ ID NO: 49)	EGRWGGSFNI (SEQ ID NO: 50)	RASQGISSYLA (SEQ ID NO: 46)	DASNLET (SEQ ID NO: 47)	QQYDDLPLT (SEQ ID NO: 60)
Ab2004.Am40	GYTFTQY (SEQ ID NO: 51)	SAYQGN (SEQ ID NO: 49)	EGRWGGSFNI (SEQ ID NO: 50)	RASQGISSYLA (SEQ ID NO: 46)	DASNLET (SEQ ID NO: 47)	QQYDDLPLS (SEQ ID NO: 61)

表 8 候选抗体的可变区序列

抗体名称	VH	VL
1F12	SEQ ID NO: 28	SEQ ID NO: 35
1F12-PTMA	SEQ ID NO: 29	SEQ ID NO: 35
Ab2004.Am01	SEQ ID NO: 30	SEQ ID NO: 35
Ab2004.Am31	SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 36
Ab2004.Am32	SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 37
Ab2004.Am33	SEQ ID NO: 32	SEQ ID NO: 36
Ab2004.Am34	SEQ ID NO: 33	SEQ ID NO: 38
Ab2004.Am35	SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 38
Ab2004.Am36	SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 39
Ab2004.Am37	SEQ ID NO: 34	SEQ ID NO: 38
Ab2004.Am38	SEQ ID NO: 34	SEQ ID NO: 40
Ab2004.Am39	SEQ ID NO: 33	SEQ ID NO: 41
Ab2004.Am40	SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 42

实施例 12：候选抗体的表达

同实施例 2.2，将各克隆的 VH 与 VK 序列分别与人 Kappa 链恒定区（CL，氨基酸序列 SEQ ID NO: 20）和人 IgG1 恒定区（CH，氨基酸序列 SEQ ID NO: 21）组合成抗体轻链和重链，装入表达载体 pcDNA3.4（Life

Technologies)，委托南京金斯瑞生物科技有限公司进行瞬转 CHO 细胞表达、纯化，最终得到亲和力成熟候选抗体见表 9。

表 9 亲和力成熟候选抗体表达、纯化数据

抗体名称	理论等电点	消光系数	表达量 (mg/L)
Ab2004.Am31	8.0	1.46	307
Ab2004.Am32	8.1	1.46	227
Ab2004.Am33	8.0	1.46	235
Ab2004.Am34	8.2	1.46	298
Ab2004.Am35	8.2	1.46	318
Ab2004.Am36	8.2	1.46	221
Ab2004.Am37	8.3	1.46	305
Ab2004.Am38	8.2	1.46	343
Ab2004.Am39	8	1.46	275
Ab2004.Am40	8.1	1.46	226

实施例 13：候选抗体亲和力测定

同实施例 3，继续测定亲和力成熟抗体 Ab2004.Am31-Ab2004.Am40 及亲本抗体 Ab2004.Am01 分别与人、小鼠 ADM 的亲和力，结果如表 10。由表 10 可知，Ab2004.Am31、Ab2004.Am34、Ab2004.Am39 与人 ADM 的亲和力相对于亲本抗体 Ab2004.Am01 提高最大，且与小鼠 ADM 的亲和力与阳性对照抗体 Enibarcimab 相当。

表 10 候选抗体与人、小鼠 ADM 的亲和力测定

抗原	抗体编号	响应值	K_D (M)	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)
人 ADM	Enibarcimab	2.07	5.67E-10	6.73E+05	3.82E-04
	Ab2004.Am01	2.34	7.66E-10	3.05E+05	2.33E-04
	Ab2004.Am31	2.64	2.88E-10	4.91E+05	1.41E-04
	Ab2004.Am32	2.53	3.40E-10	4.30E+05	1.46E-04
	Ab2004.Am33	2.63	3.16E-10	6.76E+05	2.14E-04
	Ab2004.Am34	2.61	1.54E-10	4.44E+05	6.81E-05
	Ab2004.Am35	1.96	2.81E-10	4.23E+05	1.19E-04
	Ab2004.Am36	2.70	2.91E-10	3.72E+05	1.08E-04
	Ab2004.Am37	2.88	2.56E-10	5.87E+05	1.50E-04
	Ab2004.Am38	2.83	2.55E-10	6.26E+05	1.60E-04
	Ab2004.Am39	2.57	1.78E-10	4.68E+05	8.33E-05
小鼠 ADM	Ab2004.Am40	2.66	3.52E-10	4.49E+05	1.58E-04
	Enibarcimab	2.75	4.97E-10	5.97E+05	2.97E-04
	Ab2004.Am01	2.35	2.21E-09	4.34E+05	9.56E-04
	Ab2004.Am31	2.81	4.12E-10	5.37E+05	2.21E-04
	Ab2004.Am32	2.76	4.74E-10	4.61E+05	2.19E-04
	Ab2004.Am33	2.80	4.74E-10	7.69E+05	3.65E-04
	Ab2004.Am34	2.78	4.51E-10	4.92E+05	2.22E-04
	Ab2004.Am35	2.74	4.52E-10	4.56E+05	2.06E-04

	Ab2004.Am36	2.75	5.18E-10	4.27E+05	2.21E-04
	Ab2004.Am37	2.85	4.69E-10	7.03E+05	3.30E-04
	Ab2004.Am38	2.88	4.67E-10	7.33E+05	3.42E-04
	Ab2004.Am39	2.70	4.89E-10	5.43E+05	2.66E-04
	Ab2004.Am40	2.65	4.92E-10	5.13E+05	2.53E-04

实施例 14：候选抗体理化性质评估

候选抗体 Ab2004.Am31、Ab2004.Am34、Ab2004.Am39 的表达量及亲和力较为理想，继续进行理化成药性评估，结果汇总如表 11。由表 11 可知，Ab2004.Am31、Ab2004.Am34、Ab2004.Am39 在纯度、热稳定性、亲水性、电荷异构体等方面均符合成药性标准，方法参考实施例 4。

表 11 亲和力成熟抗体理化性质分析结果

抗体名称	SEC-HPLC (%)	Tm (°C)	出峰时间 (min)	iCIEF				NR-CE-SDS (%)	
				等电点 (pI)	酸峰 (%)	主峰 (%)	碱峰 (%)	碎片	主峰
Ab2004.Am31	99.6	86.9	13.3	8.4	18.1	71.2	10.7	7.5	92.5
Ab2004.Am34	99.6	84.9	14.5	8.8	20.2	69.2	10.6	5.7	94.3
Ab2004.Am39	99.2	84.0	13.3	8.4	16.3	72.3	11.5	6.5	93.5

实施例 15：ADM 抗体在 LPS 诱导的 C57BL/6J 小鼠脓毒症模型中的药效学研究

C57BL/6J 小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司，10-11 周龄，雄性，共 50 只。按照体重将动物随机分成以下五组 (n=10)：G1 组为模型组给予同型对照 RSV-IgG1 (2 mg/kg, IV, Single)，G2 组为阳性对照组给予 Enibarcimab (2 mg/kg, IV, Single)，G3、G4、G5 组则分别给予本发明抗体 2004hz97 (2 mg/kg, IV, Single)、2004hz99 (2 mg/kg, IV, Single) 和 Ab2004.Am34 (2 mg/kg, IV, Single)。LPS 诱导脓毒症前 5 min 单次 IV 给予相应抗体治疗，5 min 后单次 IP 给予 20 mg/kg 的 LPS (E.coli 055:B5; Sigma) 诱导小鼠脓毒症，造模后每天 2 次、连续 7 天观察动物死亡情况。数据采用 GraphPad Prism 8 软件作图，并用 Log-rank (Mantel-Cox) test 方法对数据进行统计学分析。

LPS 处理 7 天后各组动物存活率分别为：RSV-IgG1 (40%)、Enibarcimab

(50%，P=0.6713 vs RSV-IgG1)、2004hz97 (90%，P<0.05 vs RSV-IgG1)、2004hz99 (80%，P=0.1001 vs RSV-IgG1)、Am34 (80%，P<0.05 vs RSV-IgG1) 结果显示使用本发明抗体治疗后可显著提高动物存活率，改善脓毒症症状 (参见表 12，附图 2)。

表 12 候选抗体对 LPS 诱导的小鼠脓毒症存活率

药物	动物数	药物剂量 (mg/kg)	7 天后存活率 (%)
RSV-IgG1	10	2	40
Enibarcimab	10	2	50
2004hz97	10	2	90
2004hz99	10	2	80
Ab2004.Am34	10	2	80

以上所述为本发明的较佳实施例而已，本发明不应该局限于该实施例和附图所公开的内容。凡是不脱离本发明所公开的精神下完成的等效或修改，都落入本发明保护的范围。

序列表

SEQ ID NO:	序列描述	序列
1	hADM 1-16AA	YRQSMNNFQGLRSFGC
2	hADM 1-21AA	YRQSMNNFQGLRSFGCRFGTC
3	mADM 1-19AA	YRQSMNQGSRSNGCRFGTC
4	人 ADM	YRQSMNNFQGLRSFGCRFGTCTVQKLAHQIYQFTDKDKDNVAPRSKISPQGY
5	鼠 ADM	YRQSMNQGSRSNGCRFGTCTFQKLAHQIYQLTDKDKDGMAPRNKISPQGY
6	VH 引物	GGACAGGGMTCCAAGTTCC
7	VK 引物	GCACACGACTGAGGCACCTCCAGATGTT
8	polyC 引物	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTCATCCCCCCCCCCCCCCCC
9	40E12 VH	QIQLVQSGPELRKPGETVKISCKASGYAFTTFGMSWIKQAPGQGLKWMGWINTYSRVPKYTDDFKGRFAFSLEISATTAYLLINNLKNGDTATYFCARGYGGEGLGFSGQGTTTLTVSS
10	40E12VK	DVLMTQTPFSLPVS LGDQASISCRSSQSIIDSDGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVS NRFSGV PDRFSGSGSGTDFTLRISRVEAEDLG VYYCFQGSHPYTFAGG TKLELK
11	40E12 HCDR1	GYAFTTF

12	40E12 HCDR2	NTYSRV
13	40E12 HCDR3	GYGEGGLGF
14	40E12 LCDR1	RSSQSIIDSDGNTYLE
15	40E12 LCDR2	KVSNRFS
16	40E12 LCDR3	FQGSHPYT
17	2004hzVH9	QIQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYAFTTFGMSWIRQAPGQG LEWMGWINTYSRVPKYTQGTGRFVFSLDISVTAYLQISSLKAE DTAVYFCARGYGEGGLGFSGQGTLTVSS
18	2004hzVK7	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSIIDSDGNTYLEWYQQR GQSPRLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDFVY YCFQGSHPYTFGQGTKLEIK
19	2004hzVK9	DVLMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSIIDSDGNTYLEWYQQRPG QSPRLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDFVY YCFQGSHPYTFAGQGTKLEIK
20	人轻链恒定区 CL	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC
21	人重链恒定区 CH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
22	2004hz00 LC	DVLMTQTPFSLPVS LGDQASISCRSSQSIIDSDGNTYLEWYLQKPG QSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEAEDLGYY CFQGSHPYTFAGGTLKELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
23	2004hz00 HC	QIQLVQSGPELRKPGETVKISCKASGYAFTTFGMSWIKAPGQGL KWMGWINTYSRVPKYTDDFKGRFAFSLEISATTAYLLINNLKNG DTATYFCARGYGEGGLGFSGQGTTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK
24	2004hz97 LC	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSIIDSDGNTYLEWYQQR GQSPRLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDFVY YCFQGSHPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL

		SSTLTLSKADYEHKVKYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
25	2004hz97 HC	QIQLVQSGSELKKPGASVKVSKKASGYAFTTFGMSWIRQAPGQG LEWMGWINTYSRVPKYTQGFTGRFVFSLDISVTTAYLQISSLKAE DTAIFYFCARGYGGEGGLGFSGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK
26	2004hz99 LC	DVLMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSIHSDGNTYLEWYQQRPG QSPRLLIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDFQVYY CFQGSHPYTFQAQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKIDSTYSLSS TLTLTKADYEHKVKYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
27	2004hz99 HC	QIQLVQSGSELKKPGASVKVSKKASGYAFTTFGMSWIRQAPGQG LEWMGWINTYSRVPKYTQGFTGRFVFSLDISVTTAYLQISSLKAE DTAIFYFCARGYGGEGGLGFSGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK
28	1F12 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKKASGYTFTSYGISWVRQAPGQ GLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTRDTSTSTAYMELRS LRSDDTAIVYYCAREGRSGGSFDIWGQGTMTVTVSS
29	1F12-PTMA VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKKASGYTFTSYGISWVRQAPGQ GLEWMGWISAYQGNTNYAQKLQGRVTMTRDTSTSTAYMELRS LRSDDTAIVYYCAREGRSGGSFDIWGQGTMTVTVSS
30	Ab2004.Am01 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKKASGYTFTSYGISWVRQAPGQ GLEWMGWISAYQGNTNYAQKLQGRVTMTRDTSTSTAYMELRS LRSDDTAIVYYCAREGRWGGSFNIWGQGTMTVTVSS
31	Ab2004.Am31 VH Ab2004.Am32 VH Ab2004.Am35 VH Ab2004.Am36 VH Ab2004.Am40 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKKASGYTFTQYGIWVRQAPGQ GLEWMGWISAYQGNTNYAQKLQGRVTMTRDTSTSTAYMELRS LRSDDTAIVYYCAREGRWGGSFNIWGQGTMTVTVSS
32	Ab2004.Am33 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKKASGYTFTSYGISWVRQAPGQ GLEWMGWISPYSGNTNYAQKLQGRVTMTRDTSTSTAYMELRSL RSDDTAIVYYCAREGRWGGSFNIWGQGTMTVTVSS
33	Ab2004.Am34 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKKASGYTFTHYGIWVRQAPGQ

	Ab2004.Am39 VH	GLEWMGWISAYQGNTNYAQKLQGRVTMTRDTSTSTAYMELRS LRSDDTAVYYCAREGRWGGSFNIWGQGTMTVTVSS
34	Ab2004.Am37 VH Ab2004.Am38 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQ GLEWMGWISPYTGKNTNYAQKLQGRVTMTRDTSTSTAYMELRSL RSDDTAVYYCAREGRWGGSFNIWGQGTMTVTVSS
35	1F12 VL 1F12-PTMA VL Ab2004.Am01 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISSYLAWYQQKPGKAPK LLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQY DNLPLTFGGGGTKVEIK
36	Ab2004.Am31 VL Ab2004.Am33 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASEGISEYLAWYQQKPGKAPK LLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQY DNLPLTFGGGGTKVEIK
37	Ab2004.Am32 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRAAEGIGSYLAWYQQKPGKAP KLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQ YDNLPLTFGGGGTKVEIK
38	Ab2004.Am34 VL Ab2004.Am35 VL Ab2004.Am37 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISSYLAWYQQKPGKAPK LLIYDVSLDAGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQYD NLPLTFGGGGTKVEIK
39	Ab2004.Am36 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISSYLAWYQQKPGKAPK LLIYDASNVDTGVP SRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQY DNLPLTFGGGGTKVEIK
40	Ab2004.Am38 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISSYLAWYQQKPGKAPK LLIYDTSDLDTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQY DNLPLTFGGGGTKVEIK
41	Ab2004.Am39 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISSYLAWYQQKPGKAPK LLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQY DDLPLTFGGGGTKVEIK
42	Ab2004.Am40 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISSYLAWYQQKPGKAPK LLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQY DDLPLSFGGGGTKVEIK
43	1F12 HCDR1	GYTFTSY
44	1F12 HCDR2	SAYNGN
45	1F12 HCDR3	EGRSGGSFDI
46	1F12 LCDR1	RASQGISSYLA
47	1F12 LCDR2	DASNLET
48	1F12 LCDR3	QQYDNLPLT
49	1F12-PTMA HCDR2	SAYQGN
50	Ab2004.Am01 HCDR3	EGRWGGSFNI
51	Ab2004.Am31 HCDR1	GYTFTQY
52	Ab2004.Am31 LCDR1	RASEGISEYLA
53	Ab2004.Am32	RAAEGIGSYLA

	LCDR1	
54	Ab2004.Am33 HCDR2	SPYSGN
55	Ab2004.Am34 HCDR1	GYTFTHY
56	Ab2004.Am34 LCDR2	DVSILDA
57	Ab2004.Am36 LCDR2	DASNVDI
58	Ab2004.Am37 HCDR2	SPYTGK
59	Ab2004.Am38 LCDR2	DTSDLDT
60	Ab2004.Am39 LCDR3	QQYDDLDT
61	Ab2004.Am40 LCDR3	QQYDDLPLS

权利要求

1、一种抗肾上腺髓质素（抗 ADM）单克隆抗体或其片段，其中所述单克隆抗体或片段特异性结合人肾上腺髓质素（ADM）的 N 端第 1-21 个氨基酸序列，所述人 ADM 的 N 端第 1-21 位氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示，并且所述单克隆抗体或片段展现出对 ADM 的 KD 值小于 10^{-10} M 的亲合力。

2、根据权利要求 1 所述的抗肾上腺髓质素单克隆抗体或其片段，其中所述片段包括 Fab, Fab' , F(ab)₂、Fv 片段、F(ab')₂、scFv、di-scFv、VHH 和/或 dAb。

3、根据权利要求 1 或 2 所述的抗肾上腺髓质素单克隆抗体或其片段，其中：

(a)所述单克隆抗体的重链可变区包含以下 CDR 序列：

(i) GYAFTTF (如 SEQ ID NO:11 所示)，

(ii) NTYSRV(如 SEQ ID NO:12 所示)

(iii) GYGGEGLGF(如 SEQ ID NO:13 所示)，以及

(b)所述单克隆抗体的轻链可变区包含以下 CDR 序列：

(i) RSSQSIIDSDGNTYLE(如 SEQ ID NO:14 所示)，

(ii) KVSNRFS(如 SEQ ID NO:15 所示)，

(iii) FQGSHFPYT(如 SEQ ID NO:16 所示)。

4、根据权利要求 3 所述的抗肾上腺髓质素单克隆抗体或其片段，其中所述单克隆抗体包含 SEQ ID NO:9 和 17 任一所示的重链可变区序列，所述单克隆抗体包含 SEQ ID NO:10、18 和 19 任一所示的轻链可变区序列，其中所述单克隆抗体优选包含 SEQ ID NO:9 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:10 所示的轻链可变区序列，所述单克隆抗体优选包含 SEQ ID NO:17 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:18 所示的轻链可变区序列，所述单克隆抗体优选包含 SEQ ID NO:17 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:19 所示的轻链可变区序列。

5、根据权利要求 4 所述的抗肾上腺髓质素单克隆抗体或其片段，其中所述单克隆抗体包含 SEQ ID NO:23 所示的重链序列和 SEQ ID NO:22 所示的轻链序列。

6、根据权利要求 4 所述的抗肾上腺髓质素单克隆抗体或其片段，其中所述单克隆抗体包含 SEQ ID NO:25 所示的重链序列和 SEQ ID NO:24 所示的轻链序列。

7、根据权利要求 4 所述的抗肾上腺髓质素单克隆抗体或其片段，其中所述单克隆抗体包含 SEQ ID NO:27 所示的重链序列和 SEQ ID NO:26 所示的轻链序列。

8、根据权利要求 1 或 2 所述的抗肾上腺髓质素单克隆抗体或其片段，其中：

(a)所述单克隆抗体的重链可变区包含以下 CDR 序列：

(i) GYTFTX₁Y，其中 X₁ 选自 S、Q 或 H，

(ii) SX₂YX₃GX₄，其中 X₂ 选自 A 或 P，X₃ 选自 N、Q、S 或 T，X₄ 选择 N 或 K

(iii) EGRX₅GGSF₆I，其中 X₅ 选自 S 或 W，X₆ 选自 D 或 N，以及

(b)所述单克隆抗体的轻链可变区包含以下 CDR 序列：

(i) RAX₇X₈GIX₉X₁₀YLA，其中 X₇ 选自 S 或 A，X₈ 选自 Q 或 E，X₉ 选自 S 或 G，X₁₀ 选自 S 或 E，

(ii) DX₁₁SX₁₂X₁₃X₁₄X₁₅，其中 X₁₁ 选择 A、V 或 T，X₁₂ 选自 N、I 或 D，X₁₃ 选自 L 或 V，X₁₄ 选自 E 或 D，X₁₅ 选自 T 或 A，

(iii) QQYDX₁₆LX₁₇LX₁₈，其中 X₁₆ 选自 N 或 D，X₁₇ 选自 P 或 D，X₁₈ 选自 T 或 S。

9、根据权利要求 8 所述的抗肾上腺髓质素单克隆抗体或其片段，其中：

(a)所述单克隆抗体的重链可变区包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 序列，其中所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO:43、51 和 55 任一所示的氨基酸序列，所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO:44、49、54 和 58 任一所示的氨基酸序列，所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO:45 和 50 任一所示的氨基酸序列，以及

(b)所述单克隆抗体的轻链可变区包含 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 序列，其中所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO:46、52 和 53 任一所示的氨基酸序列，所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO:47、56、57 和 59 任一所示的氨基酸序列，所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO:48、60 和 61 任一所示的氨基酸序列。

10、根据权利要求 9 所述的抗肾上腺髓质素单克隆抗体或其片段，其中：

(a)所述单克隆抗体的重链可变区包含以下 CDR 序列：

(i) GYTFTSY (如 SEQ ID NO:43 所示)，

(ii) SAYNGN (如 SEQ ID NO:44 所示)，

(iii) EGRSGGSFDI (如 SEQ ID NO:45 所示)，以及

(b)所述单克隆抗体的轻链可变区包含以下 CDR 序列：

(i) RASQGISSYLA (如 SEQ ID NO:46 所示)，

(ii) DASNLET (如 SEQ ID NO:47 所示)，

(iii) QQYDNLPLT (如 SEQ ID NO:48 所示)。

11、根据权利要求 9 所述的抗肾上腺髓质素单克隆抗体或其片段，其中：

(a)所述单克隆抗体的重链可变区包含以下 CDR 序列：

(i) GYTFTSY (如 SEQ ID NO:43 所示)，

(ii) SAYQGN (如 SEQ ID NO:49 所示)，

(iii) EGRSGGSFDI (如 SEQ ID NO:45 所示)，以及

(b)所述单克隆抗体的轻链可变区包含以下 CDR 序列：

(i) RASQGISSYLA (如 SEQ ID NO:46 所示)，

(ii) DASNLET (如 SEQ ID NO:47 所示)，

(iii) QQYDNLPLT (如 SEQ ID NO:48 所示)。

12、根据权利要求 8 至 11 中任一项所述的抗肾上腺髓质素单克隆抗体或其片段，其中所述单克隆抗体包含 SEQ ID NO:28 或 29 所示的重链可变区序列，所述单克隆抗体包含 SEQ ID NO: 35 所示的轻链可变区序列，其中所述单克隆抗体优选包含 SEQ ID NO:28 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:35 所示的轻链可变区序列，所述单克隆单体优选包含 SEQ ID NO:29 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:35 所示的轻链可变区序列。

13、根据权利要求 9 所述的抗肾上腺髓质素单克隆抗体或其片段，其中：

(a) 所述单克隆抗体的重链可变区包含以下 CDR 序列：

(i) GYTFTSY (如 SEQ ID NO:43 所示)，

(ii) SAYQGN (如 SEQ ID NO:49 所示)，

(iii) EGRWGGSFNI (如 SEQ ID NO:50 所示)，以及

(b) 所述单克隆抗体的轻链可变区包含以下 CDR 序列：

(i) RASQGISSYLA (如 SEQ ID NO:46 所示)，

(ii) DASNLET (如 SEQ ID NO:47 所示)，

(iii) QQYDNLPLT (如 SEQ ID NO:48 所示)。

14、根据权利要求 9 所述的抗肾上腺髓质素单克隆抗体或其片段，其中：

(a) 所述单克隆抗体的重链可变区包含以下 CDR 序列：

(i) GYTFTQY (如 SEQ ID NO:51 所示)，

(ii) SAYQGN (如 SEQ ID NO:49 所示)，

(iii) EGRWGGSFNI (如 SEQ ID NO:50 所示)，以及

(b) 所述单克隆抗体的轻链可变区包含以下 CDR 序列：

(i) RASEGISEYLA (如 SEQ ID NO:52 所示)，

- (ii) DASNLET (如 SEQ ID NO:47 所示),
- (iii) QQYDNLPLT (如 SEQ ID NO:48 所示)。

15、根据权利要求 9 所述的抗肾上腺髓质素单克隆抗体或其片段，其中：

(a) 所述单克隆抗体的重链可变区包含以下 CDR 序列：

- (i) GYTFTQY (如 SEQ ID NO:51 所示),
- (ii) SAYQGN (如 SEQ ID NO:49 所示),
- (iii) EGRWGGSFNI (如 SEQ ID NO:50 所示), 以及

(b) 所述单克隆抗体的轻链可变区包含以下 CDR 序列：

- (i) RAAEGIGSYLA (如 SEQ ID NO:53 所示),
- (ii) DASNLET (如 SEQ ID NO:47 所示),
- (iii) QQYDNLPLT (如 SEQ ID NO:48 所示)。

16、根据权利要求 9 所述的抗肾上腺髓质素单克隆抗体或其片段，其中：

(a) 所述单克隆抗体的重链可变区包含以下 CDR 序列：

- (i) GYTFTSY (如 SEQ ID NO:43 所示),
- (ii) SPYSGN (如 SEQ ID NO:54 所示),
- (iii) EGRWGGSFNI (如 SEQ ID NO:50 所示), 以及

(b) 所述单克隆抗体的轻链可变区包含以下 CDR 序列：

- (i) RASEGISEYLA (如 SEQ ID NO:52 所示),
- (ii) DASNLET (如 SEQ ID NO:47 所示),
- (iii) QQYDNLPLT (如 SEQ ID NO:48 所示)。

17、根据权利要求 9 所述的抗肾上腺髓质素单克隆抗体或其片段，其中：

(a) 所述单克隆抗体的重链可变区包含以下 CDR 序列：

- (i) GYTFTHY (如 SEQ ID NO:55 所示),

- (ii) SAYQGN (如 SEQ ID NO:49 所示),
- (iii) EGRWGGSFNI (如 SEQ ID NO:50 所示), 以及
- (b)所述单克隆抗体的轻链可变区包含以下 CDR 序列:
 - (i) RASQGISSYLA (如 SEQ ID NO:46 所示),
 - (ii) DVSILDA (如 SEQ ID NO:56 所示),
 - (iii) QQYDNLPLT (如 SEQ ID NO:48 所示)。

18、根据权利要求 9 所述的抗肾上腺髓质素单克隆抗体或其片段, 其中:

- (a)所述单克隆抗体的重链可变区包含以下 CDR 序列:
 - (i) GYTFTQY (如 SEQ ID NO:51 所示),
 - (ii) SAYQGN (如 SEQ ID NO:49 所示),
 - (iii) EGRWGGSFNI (如 SEQ ID NO:50 所示), 以及
- (b)所述单克隆抗体的轻链可变区包含以下 CDR 序列:
 - (i) RASQGISSYLA (如 SEQ ID NO:46 所示),
 - (ii) DVSILDA (如 SEQ ID NO:56 所示),
 - (iii) QQYDNLPLT (如 SEQ ID NO:48 所示)。

19、根据权利要求 9 所述的抗肾上腺髓质素单克隆抗体或其片段, 其中:

- (a)所述单克隆抗体的重链可变区包含以下 CDR 序列:
 - (i) GYTFTQY (如 SEQ ID NO:51 所示),
 - (ii) SAYQGN (如 SEQ ID NO:49 所示),
 - (iii) EGRWGGSFNI (如 SEQ ID NO:50 所示), 以及
- (b)所述单克隆抗体的轻链可变区包含以下 CDR 序列:
 - (i) RASQGISSYLA (如 SEQ ID NO:46 所示),
 - (ii) DASNVDT (如 SEQ ID NO:57 所示),
 - (iii) QQYDNLPLT (如 SEQ ID NO:48 所示)。

20、根据权利要求 9 所述的抗肾上腺髓质素单克隆抗体或其片段，其中：

(a)所述单克隆抗体的重链可变区包含以下 CDR 序列：

(i) GYTFTSY (如 SEQ ID NO:43 所示)，

(ii) SPYTGK (如 SEQ ID NO:58 所示)，

(iii) EGRWGGSFNI (如 SEQ ID NO:50 所示)，以及

(b)所述单克隆抗体的轻链可变区包含以下 CDR 序列：

(i) RASQGISSYLA (如 SEQ ID NO:46 所示)，

(ii) DVSILDA (如 SEQ ID NO:56 所示)，

(iii) QQYDNLPLT (如 SEQ ID NO:48 所示)。

21、根据权利要求 9 所述的抗肾上腺髓质素单克隆抗体或其片段，其中：

(a)所述单克隆抗体的重链可变区包含以下 CDR 序列：

(i) GYTFTSY (如 SEQ ID NO:43 所示)，

(ii) SPYTGK (如 SEQ ID NO:58 所示)，

(iii) EGRWGGSFNI (如 SEQ ID NO:50 所示)，以及

(b)所述单克隆抗体的轻链可变区包含以下 CDR 序列：

(i) RASQGISSYLA (如 SEQ ID NO:46 所示)，

(ii) DTSDLDT (如 SEQ ID NO:59 所示)，

(iii) QQYDNLPLT (如 SEQ ID NO:48 所示)。

22、根据权利要求 9 所述的抗肾上腺髓质素单克隆抗体或其片段，其中：

(a)所述单克隆抗体的重链可变区包含以下 CDR 序列：

(i) GYTFTHY(如 SEQ ID NO:55 所示)，

(ii) SAYQGN (如 SEQ ID NO:49 所示)，

(iii) EGRWGGSFNI (如 SEQ ID NO:50 所示)，以及

(b)所述单克隆抗体的轻链可变区包含以下 CDR 序列:

- (i) RASQGISSYLA (如 SEQ ID NO:46 所示),
- (ii) DASNLET (如 SEQ ID NO:47 所示),
- (iii) QQYDDLDT (如 SEQ ID NO:60 所示)。

23、根据权利要求 9 所述的抗肾上腺髓质素单克隆抗体或其片段, 其中:

(a)所述单克隆抗体的重链可变区包含以下 CDR 序列:

- (i) GYTFTQY (如 SEQ ID NO:51 所示),
- (ii) SAYQGN (如 SEQ ID NO:49 所示),
- (iii) EGRWGGSFNI (如 SEQ ID NO:50 所示), 以及

(b)所述单克隆抗体的轻链可变区包含以下 CDR 序列:

- (i) RASQGISSYLA (如 SEQ ID NO:46 所示),
- (ii) DASNLET (如 SEQ ID NO:47 所示),
- (iii) QQYDDLPLS (如 SEQ ID NO:61 所示)。

24、根据权利要求 8 至 9、13 至 23 中任一项所述的抗肾上腺髓质素单克隆抗体或其片段, 其中所述单克隆抗体包含 SEQ ID NO:30 至 34 任一所示的重链可变区序列, 所述单克隆抗体包含 SEQ ID NO: 35 至 42 任一所示的轻链可变区序列, 其中所述单克隆抗体优选包含 SEQ ID NO:30 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:35 所示的轻链可变区序列, 所述单克隆抗体优选包含 SEQ ID NO:31 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:36 所示的轻链可变区序列, 所述单克隆抗体优选包含 SEQ ID NO:31 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:37 所示的轻链可变区序列, 所述单克隆抗体优选包含 SEQ ID NO:32 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:36 所示的轻链可变区序列, 所述单克隆抗体优选包含 SEQ ID NO:33 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:38 所示的轻链可变区序列, 所述单克隆抗体优选包含 SEQ ID NO:31 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:38 所示的轻链可变区序列, 所述单克隆抗体优选包含 SEQ ID NO:31 所示

的重链可变区序列和 SEQ ID NO:39 所示的轻链可变区序列，所述单克隆单体优选包含 SEQ ID NO:34 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:38 所示的轻链可变区序列，所述单克隆单体优选包含 SEQ ID NO:34 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:40 所示的轻链可变区序列，所述单克隆抗体优选包含 SEQ ID NO:33 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:41 所示的轻链可变区序列，所述单克隆单体优选包含 SEQ ID NO:31 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:42 所示的轻链可变区序列。

25、编码权利要求 1 至 24 中任一项所述的抗肾上腺髓质素单克隆抗体或其片段的核苷酸序列。

26、包含权利要求 25 所述的核苷酸序列的表达载体，其优选为 pcDNA3.4。

27、包含权利要求 25 所述的核苷酸序列或权利要求 26 所述的表达载体的宿主细胞，其优选为 CHO 细胞。

28、包含权利要求 1 至 24 中任一项所述的抗肾上腺髓质素单克隆抗体或其片段的药物组合物、检测试剂或套装药盒。

29、权利要求 1 至 24 中任一项所述的抗肾上腺髓质素单克隆抗体或其片段在制备用于维持内皮细胞完整性、增强屏障作用的药物中的应用。

30、权利要求 1 至 24 中任一项所述的抗肾上腺髓质素单克隆抗体或其片段在制备用于控制血管舒张、降低血压的药物中的应用。

31、权利要求 1 至 24 中任一项所述的抗肾上腺髓质素单克隆抗体或其片段在制备用于治疗或预防脓毒性休克或创伤性损伤，尤其是脓毒症晚期的药物中的应用。

32、权利要求 1 至 24 中任一项所述的抗肾上腺髓质素单克隆抗体或其片段在制备用于降低患者的慢性或者急性病或急性病症的死亡风险的药物中的应用，所述慢性或者急性病或急性病症选自重度感染，如脑膜炎、全身炎症反应综合征(SIRS)、败血症；其它疾病如糖尿病、癌症、急性和慢性血管疾病如心力衰竭、心肌梗死、卒中、动脉粥样硬化，水肿；休克如败血性休克和器官功能障碍如肾功能障碍、肝功能障碍、烧伤、手术、外伤、中毒。

33、权利要求 1 至 24 中任一项所述的抗肾上腺髓质素单克隆抗体或其片段在制备用于稳定患者循环尤其是全身循环的药物中的应用，所述患者患有慢性或者急性病或急性病症，所述慢性或者急性病或急性病症选自重度感染，如脑膜炎、全身炎症反应综合征(SIRS)、败血症；其它疾病如糖尿病、癌症、急性和慢性血管疾病如心力衰竭、心肌梗死、卒中、动脉粥样硬化，水肿；休克如败血性休克和器官功能障碍如肾功能障碍、肝功能障碍、烧伤、手术、外伤、中毒。

34、权利要求 29 至 33 所述的应用，其中所述抗肾上腺髓质素单克隆抗体或其片段与另一种药剂联合使用。

35、权利要求 34 所述的应用，其中所述药剂选自血管加压药，静脉注射液，TNF- α -抗体和抗生素。