

抗 PCSK9 抗体及其应用

技术领域

本申请属于医药技术领域,涉及可用于高胆固醇血症的治疗。具体的,本申请涉及抗 PCSK9 抗体的治疗高胆固醇血症的用途。

背景技术

PCSK9 是一种分泌型丝氨酸蛋白酶,可与细胞表面低密度脂蛋白受体 (Low-density lipoprotein receptor, LDLR) 结合并内吞降解,从而导致细胞膜表面 LDLR 数目减少,PCSK9 主要由肝脏合成并分泌释放至血液。LDLR 广泛分布于肝脏细胞膜表面以及肝脏细胞系如 HepG2、Hep3B 表面。抑制 PCSK9 与 LDLR 的结合,可以保持细胞膜表面 LDLR 数目,进而介导血浆胆固醇的 LDL 进入细胞,维持血浆胆固醇水平。

高胆固醇血症是一种以脂质代谢缺陷为特征的疾病,其中某些患者携带有常染色体显性遗传突变称为家族性高胆固醇血症 (Familial Hypercholesterolemia, FH),主要表现为血浆低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 水平显著升高。FH 可分为杂合子 (型) (Heterozygote)、纯合子 (型) (Homozygote)、复合杂合子和双重杂合子 4 种类型,以前两类居多。纯合子家族性高胆固醇血症 (Homozygote Familial Hypercholesterolemia, HoFH) 罕见,患病率为 1/100 万~3/100 万。HoFH 的疾病特点是 LDL-C 水平升高和早发动脉粥样硬化性心血管疾病风险升高。欧洲动脉粥样硬化学会 (EAS) 指出,若不加以干预,HoFH 患者通常于 20 岁左右发生动脉粥样硬化性心血管疾病,30 岁左右死亡。HoFH 的主要治疗方式包括治疗性生活方式改变、药物治疗和其他治疗方式,比如血浆脂蛋白置换。药物治疗仍以他汀类为主,但是对于 HoFH 患者,血脂水平较高,常常需要他汀类与依折麦布联合治疗。

杂合子 (型) 家族性高胆固醇血症 (HeFH) 的患病率约为 1:500~1:200,全球范围内约有 1400~3400 万的 HeFH 患者。HeFH 的主要治疗方式包括治疗性生活方式改变、药物治疗和其他治疗方式,比如血浆脂蛋白置换。

药物治疗仍以他汀类为主，但是对于 HeFH 患者，血脂水平较高，常常需要他汀类与依折麦布联合治疗。

PCSK9 抑制剂能直接阻止循环中 PCSK9 与 LDLR 相结合，减少 PCSK9 介导的 LDLR 的分解，加强其对 LDL-C 的清除能力，在基础降脂药物基础上，能进一步降低患者血脂水平。目前已经上市的靶向于 PCSK9 单克隆抗体有两个：Alirocumab 和 Evolocumab。Alirocumab（曾用名 REGN727/SAR236553）由美国公司 Regeneron Pharmaceuticals 发现的全人源 PCSK9 单克隆抗体，2015 年 FDA 批准 Alirocumab 作为二线药物用于降低 LDL-C，适用人群为遗传性高胆固醇血症成年患者以及饮食干预和他汀类药物无效而需要降低 LDL-C 的动脉粥样硬化成年患者。在 2015 年 08 月 27 日，美国食品药品监督管理局（FDA）批准依洛尤单抗（Evolocumab）注射剂用于 HoFH 患者、及临床动脉粥样硬化心血管疾病的成人患者，在饮食控制和最大耐受剂量他汀类药物治疗的基础上，联合使用 Evolocumab 来进行治疗。2018 年 07 月 31 日，中国国家药品监督管理局（NMPA）批准 Evolocumab 注射液用于治疗成人或 12 岁以上青少年 HoFH（即纯合子家族性高胆固醇血症）。

心血管疾病是高血脂患者的主要死亡风险因素之一，目前研究结果提示有效的降血脂治疗，如他汀类，可显著降低高血脂患者的心血管疾病发作及死亡风险。抗 PCSK9 抗体作为一种有效的降血脂药物，其在预防高血脂患者心血管疾病发作和降低死亡风险中的有效性亦得到了证实。抗 PCSK9 抗体药物 Evolocumab 的临床研究结果显示证实，罹患高血脂的患者接受 Evolocumab 治疗可显著降低高血脂患者心血管疾病发作的风险，相较于安慰剂对照组患者，接受 Evolocumab 治疗患者的心肌梗死、卒中及接受冠状动脉血运重建术的发生率显著降低。另一已上市抗 PCSK9 抗体 Alirocumab 的大规模临床研究亦证实其对心血管的保护作用，相较于安慰剂对照抗 PCSK9 抗体可使主要不良心血管事件，包括急性心肌梗死、缺血性卒中、冠心病（CHD）死亡或需要住院治疗的不稳定型心绞痛，总体发生风险降低 15%。基于此类临床研究结果，两个抗 PCSK9 抗体分别于 2017 年及 2019 年获得 FDA 批准用于预防心血管疾病成年患者的心脏病、中风。

发明内容

本申请的一个方面提供 PCSK9 与 LDLR 之间的相互作用的抑制剂，其优选为抗 PCSK9 的抗体或其抗原结合片段，用于治疗高胆固醇血症（更优选纯合型家族性高胆固醇血症，也表示为“HoFH”，或者杂合型家族性高胆固醇血症，也表示为“HeFH”，或者具有心血管极高危或高危风险患者的高胆固醇血症）。

在一些具体实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段是单克隆抗体或其抗原结合片段，其特异地结合人 PCSK9 且阻断人 PCSK9 与 LDLR 的结合。

在一些实施方案中，所述抗 PCSK9 抗体为人源化抗体。

在一些实施方案中，所述抗 PCSK9 抗体包含：

重链可变区，所述重链可变区含有 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列或者与其具有至少 80% 同源性、优选至少 85% 同源性、更优选至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同源性的氨基酸序列；以及

轻链可变区，所述轻链可变区含有 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列或者与其具有至少 80% 同源性、优选至少 85% 同源性、更优选至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同源性的氨基酸序列。

在一些实施方案中，所述抗体的 CDR 序列如下：

HCDR1 : GFTFSSYS (SEQ ID NO : 5);

HCDR2 : ISSSSSYI (SEQ ID NO : 6);

HCDR3 : EYDFWSAYYDAFDV (SEQ ID NO : 7);

LCDR1 : SRNIGGGND (SEQ ID NO : 8);

LCDR2 : GVI (SEQ ID NO : 9) ; 以及

LCDR3 : QSF DGSLSGSV (SEQ ID NO : 10)。

本申请的另一方面提供一种药物组合物，优选用于治疗高胆固醇血症（更优选 HoFH、HeFH 或具有心血管极高危或高危风险患者的高胆固醇血症），其包含 PCSK9 与 LDLR 之间的相互作用的抑制剂（和他汀类）和药学上可接受的载体。

在一些实施方案中，所述 PCSK9 与 LDLR 之间的相互作用的抑制剂为适于胃肠外施用途或非胃肠外施用途的形式。

在本申请的另一个方面，提供试剂盒，其优选用于治疗高胆固醇血症（更优选 HoFH，HeFH，或者具有心血管极高危或高危风险患者的高胆固醇血症），其包含本发明所述的抗 PCSK9 抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中，所述试剂盒还包含他汀类药物，和/或依折麦布。

本申请的目的至少还在于提供一种治疗高胆固醇血症（更优选 HoFH，HeFH，或者具有心血管极高危或高危风险患者的高胆固醇血症）的方法，包括向有需要的受试者施用（例如胃肠外或非胃肠外施用）治疗有效量的本发明所述的 PCSK9 与 LDLR 之间的相互作用的抑制剂（优选为抗 PCSK9 的抗体或其抗原结合片段）。优选地，所述受试者被联合施用他汀类药物。更优选地，所述受试者被联合施用他汀类药物和依折麦布。在一些实施方案中，所述抑制剂、他汀类药物和/或依折麦布被同时施用或分开施用。

在一些具体实施方案中，所述他汀类药物为 3-羟基-3 甲基戊二酰辅酶 A（HMG-CoA）还原酶抑制剂。

在一些具体实施方案中，所述他汀类药物，即 3-羟基-3 甲基戊二酰辅酶 A（HMG-CoA）还原酶抑制剂，包括洛伐他汀、普伐他汀、辛伐他汀、氟伐他汀、阿托伐他汀、瑞舒伐他汀和匹伐他汀，或其任意组合等。

在某些实施方案中，所述的高胆固醇血症（更优选 HoFH，HeFH，或者具有心血管极高危或高危风险患者的高胆固醇血症）是由 LDLR、载脂蛋白 B（ApoB）、PCSK9 或低密度脂蛋白受体衔接蛋白 1（Low Density Lipoprotein Receptor Adaptor Protein 1 (LDLRAP1)）等的基因中的 1 个（对）或者更多个（对）等位或非等位基因突变所导致的；其中，所述等位基因突变包括 LDLR 功能缺陷型突变、影响 LDL 与 LDLR 的结合的 ApoB 基因突变、导致 PCSK9 对 LDLR 亲和力增强的功能性突变以及导致 LDL 内化活性降低的 LDLRAP1 失功能型突变等。LDLR、APOB 或 PCSK9 基因中已知导致 FH 的变体参见例如 Canadian Journal of Cardiology, 34, (2018), 1553-1563, Canadian Cardiovascular Society Position Statement on Familial Hypercholesterolemia: Update 2018。

在某些实施方案中，所述的高胆固醇血症（更优选 HoFH，HeFH，或者具有心血管极高危或高危风险患者的高胆固醇血症）在既往未经治疗时 LDL-C > 13 mmol/L (500 mg/dL) 或（使用大剂量/最大耐受剂量的他汀类药物联合依折麦布）治疗后 LDL-C $\geq$ 8 mmol/L (300 mg/dL)，同时，合并 10 岁前出现皮肤或肌腱黄色瘤或父母双亲均携带有 LDLR、ApoB、PCSK9 或 LDLRAP1 等基因中的 1 个（对）或者更多个（对）等位基因突变。

在某些实施方案中，所述的高胆固醇血症（更优选 HeFH）满足以下 a) 和 b)：a) 所述的高胆固醇血症是如上所述由 LDLR、载脂蛋白 B (ApoB)、PCSK9 或低密度脂蛋白受体衔接蛋白 1 (Low Density Lipoprotein Receptor Adaptor Protein 1 (LDLRAP1)) 等的基因中的 1 个（对）或者更多（对）非成对等位基因突变所导致的，b) 在既往未经治疗时未接受调脂药物治疗的患者血清 LDL-C 水平 $\geq$ 4.7 mmol/L (180 mg/dL)，或者同时满足下述 c) 和 d) 的至少 1 条：c) 有皮肤/腱黄色瘤或 < 45 岁的人存在脂性角膜弓，和 d) 一级亲属中有 FH 或早发成人动脉粥样硬化性心血管疾病 (ASCVD)，特别是冠心病患者。

本申请的目的至少还在于提供一种本发明所述的 PCSK9 与 LDLR 之间的相互作用的抑制剂（优选为抗 PCSK9 的抗体或其抗原结合片段）在制备治疗高胆固醇血症（更优选 HoFH，HeFH，或者具有心血管极高危或高危风险患者的高胆固醇血症）的药物中的用途。

本申请也提供了一种治疗患有高胆固醇血症（更优选 HoFH，HeFH，或者具有心血管极高危或高危风险患者的高胆固醇血症）的患者的方法，所述方法包括：(i) 对所述患者进行基因型检测，(ii) 测量所述患者的样品中的 LDL-C 水平，和 (iii) 当所述患者被鉴定为纯合型（或杂合型）家族性高胆固醇血症时，给所述患者施用治疗有效量的本发明所述的抗 PCSK9 抗体或其抗原结合部分，优选联合施用他汀类药物，更优选联合施用他汀类药物和依折麦布。

在一些实施方案中，所述样品为血清，血浆或全血。

在本发明的某些实施方案中，所述的具有心血管极高危或高危风险患者的高胆固醇血症是指同时符合以下条件 1 和条件 2，其中条件 1 为符合

a)-h)中的任一条(参考《中国成人血脂异常防治指南(2016年修订版)》):

a) 冠状动脉疾病史(如急性冠状动脉综合征、稳定性冠心病、血运重建术后、缺血性心肌病等), b) 缺血性卒中史(腔梗除外), c) 短暂性脑缺血发作, d) 外周动脉粥样硬化病(如颈动脉粥样硬化病、颈动脉内膜切除术后、颈动脉支架置入术后、血运重建术后、下肢动脉粥样硬化病、下肢动脉血运重建术后等), e) $\text{LDL-C} \geq 4.9 \text{ mmol/L}$ (190 mg/dl) 或 $\text{TC} \geq 7.2 \text{ mmol/L}$, f) 1.8 mmol/L (70 mg/dl) $\leq \text{LDL-C} < 4.9 \text{ mmol/L}$ (190 mg/dl) 且年龄在 40 岁及以上的 2 型糖尿病患者, g) 患有慢性肾脏疾病, 分期为 3 期(即经检测计算的肾小球滤过率 $30 \text{ mL/min/1.73m}^2 \leq \text{eGFR} < 60 \text{ mL/min/1.73m}^2$), h) 存在下列至少 3 项危险因素: 男性 ≥ 45 岁, 女性 ≥ 55 岁; 高血压; 吸烟; 有 CVD 家族史(一级亲属: 男性 < 55 岁, 女性 < 65 岁); HDL 胆固醇 $< 40 \text{ mg/dL}$; 肥胖($\text{BMI} \geq 28 \text{ kg/m}^2$); 并且, 同时满足条件 2 中的 a) 或 b) 中的任意一条: 存在稳定 4 周基础降脂药物治疗后患者的血脂水平满足以下条件之一: a) 极高危患者 LDL-C 水平 $> 1.8 \text{ mmol/L}$ (70 mg/dL) 或 b) 高危患者 LDL-C 水平 $> 2.6 \text{ mmol/L}$ (100 mg/dL) 的患者。

本申请的目的至少还在于提供一种制备用于治疗高胆固醇血症(优选 HoFH, HeFH, 或者具有心血管极高危或高危风险患者的高胆固醇血症)的 PCSK9 与 LDLR 之间的相互作用的抑制剂(优选抗 PCSK9 抗体或其抗原结合片段)的药物制剂(药物组合物)的方法。

在一些实施方案中, 抗 PCSK9 抗体的施用治疗以 2 周(14 天)或 4 周(28 天)为一个周期, 优选在每个周期第一天(D1)皮下给予抗 PCSK9 抗体。即, 所述抗 PCSK9 抗体以每两周一次(q2w)或者每四周一次(q4w)的频率施用。

在一些实施方案中, 涉及单次药物剂量单元, 其包含 0.1-60mg 按照本发明所述的抗 PCSK9 抗体或其抗原结合片段, 优选用于治疗家族性高胆固醇血症(更优选 HoFH, HeFH, 或者具有心血管极高危或高危风险患者的高胆固醇血症)。

在本发明的另一个方面, 涉及 0.1-60mg 按照本发明所述的抗 PCSK9 抗体或其抗原结合片段在制备用于治疗家族性高胆固醇血症(更优选

HoFH, HeFH, 或者具有心血管极高危或高危风险患者的高胆固醇血症) 的单次药物剂量单元中的应用。

MAB1

如本申请所用, MAB1 是抗 PCSK9 单克隆抗体, 其序列和结构可以参见文献 (WO 2016/127912 A1)。在所述 MAB1 单克隆抗体中, HCDR1 包含序列 GFTFSSYS (SEQ ID NO: 5), HCDR2 包含序列 ISSSSSYI (SEQ ID NO: 6), HCDR3 包含序列 EYDFWSAYYDAFDV (SEQ ID NO: 7), LCDR1 包含序列 SRNIGGGND (SEQ ID NO: 8), LCDR2 包含序列 GVI (SEQ ID NO: 9), LCDR3 包含序列 QSF DGSLSGSV (SEQ ID NO: 10)。

定义和说明

除非另有说明, 本申请中所用的下列术语具有下列含义。一个特定的术语在没有特别定义的情况下不应该被认为是不确定的或不清楚的, 而应该按照本领域普通的含义去理解。当本申请中出现商品名时, 意在指代其对应的商品、组合物或其活性成分。

如本文所用, 术语“抗体”是指具有至少一个抗原结合结构域的抗原结合蛋白。本申请的抗体和其片段可以是整个抗体或其任何片段。因此, 本申请的抗体和其片段包括单克隆抗体或其片段和抗体变体或其片段, 以及免疫缀合物。抗体和其片段还可以包括重组多肽、融合蛋白和双特异性抗体。本文公开的抗 PCSK9 抗体和其片段可以是 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 同种型。

术语“同种型”是指由重链恒定区基因编码的抗体种类。在一个实施方案中, 本文公开的抗 PCSK9 抗体和其片段是 IgG1 或 IgG4 同种型。本申请的抗 PCSK9 抗体和其片段可以衍生自任何物种, 其包括但不限于小鼠、大鼠、兔、灵长类动物、美洲驼和人。PCSK9 抗体和其片段可以是嵌合抗体、人源化抗体或完整的人抗体。

术语“人源化抗体”是指其中抗原结合位点来源于非人物种且可变区框架来源于人免疫球蛋白序列的抗体。人源化抗体在框架区中可包含置换, 使得该框架可能不是所表达的人免疫球蛋白或种系基因序列的精确拷贝。

术语“基因突变”是指基因组 DNA 分子发生的突然的、可遗传的变异

现象。从分子水平上看，基因突变是指基因在结构上发生碱基对组成或排列顺序的改变。其包括碱基置换突变、移码突变、缺失突变和插入突变。

“分离的抗体”表示这样的抗体：其基本上不含有具有不同抗原特异性的其它抗体（例如，分离的特异性地结合 PCSK9 的抗体基本上不含有特异性地结合除 PCSK9 以外的抗原的抗体）。但是，分离的特异性地结合 PCSK9 的抗体可以具有与其它抗原（诸如来自不同物种的 PCSK9 分子）的交叉反应性。此外，分离的抗体可以基本上不含有其它细胞材料和/或化学物质。

术语“单克隆抗体”（“mAb”）是指单分子组合物的抗体分子。单克隆抗体组合物显示出对于特定表位的单一结合特异性和亲和力，或就双特异性单克隆抗体而言，显示出对于两种不同表位的双重结合特异性。mAb 是分离的抗体的一个例子。通过本领域技术人员已知的杂交瘤技术、重组技术、转基因技术或其它技术，可以生产 mAb。

抗体的“抗原结合部分”（也称为“抗原结合片段”）表示抗体的一个或多个片段，其保留特异性地结合被完整抗体结合的抗原的能力。抗原结合片段的实例包括 Fab 片段、Fab'片段、F(ab)'片段、Fv 片段、分离的 CDR 区、单链 Fv 分子（scFv），F(ab')₂、Fd、dAb、Fab/c、双价抗体和结构域抗体。

如本文所用，术语“衍生的”当用于指相对于参考抗体或其它结合蛋白的分子或多肽时，意指能够与参考抗体或其它结合蛋白特异性地结合相同表位的分子或多肽。

如本文所用，术语“EC50”是指有效浓度，抗体的 50%最大应答。如本文所用，术语“IC50”是指抑制浓度，抗体的 50%最大应答。EC50 和 IC50 两者均可以通过 ELISA 或 FACS 分析或本领域已知的任何其它方法进行测量。

术语“治疗”一般是指获得需要的药理和/或生理效应的操作。该效应根据完全或部分地预防疾病或其症状，可以是预防性的；和/或根据部分或完全稳定或治愈疾病和/或由于疾病产生的副作用，可以是治疗性的。本文使用的“治疗”涵盖了对患者疾病的任何治疗，包括：（a）预防易感染疾病或症状但还没诊断出患病的患者所发生的疾病或症状；（b）抑制疾病

的症状，即阻止其发展；或（c）缓解疾病的症状，即，导致疾病或症状退化。

如本文所用，术语“全身治疗”是指药物物质通过血流传送，到达并影响全身细胞的治疗。

如本文所用，术语“受试者”表示哺乳动物，诸如啮齿动物、猫科动物、犬科动物和灵长类动物。优选地，根据本申请的受试者是人。

“施用”表示使用本领域技术人员已知的多种方法和递送系统中的任一种，向受试者物理引入包含治疗剂的组合物。免疫检查点抑制剂（例如，抗 PCSK9 抗体）的施用途径包括静脉内、肌肉内、皮下、腹膜内、脊柱或其它胃肠外施用途径，例如通过注射或输注。本文中使用的短语“胃肠外施用”是指，通常通过注射进行的除了肠内和局部施用以外的施用模式，且包括但不限于，静脉内、肌肉内、动脉内、鞘内、淋巴管内、病灶内、囊内、眶内、心内、真皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、硬膜外和胸骨内注射和输注、以及体内电穿孔。在某些实施方案中，所述免疫检查点抑制剂（例如，抗 PCSK9 抗体）通过非胃肠外途径施用，在某些实施方案中，口服施用。其它非胃肠外途径包括局部、表皮或粘膜施用途径，例如，鼻内地、阴道地、直肠地、舌下地或局部地。还可以执行施用，例如，一次、多次，和/或在一个或多个延长的时间段中。

本文中使用的“不良事件”（AE）是与医学治疗的应用有关的任何不利的和通常非故意的或不希望的迹象（包括异常的实验室发现）、征状或疾病。例如，不利事件可以与响应于治疗的分泌 PCSK9 的肝脏相关。医学治疗可以具有一种或多种相关的 AE，并且每种 AE 可以具有相同或不同的严重性水平。对能够“改变不利事件”的方法的提及是指降低与不同治疗方案的应用相关的一种或多种 AE 的发生率和/或严重性的治疗方案。

本文中使用的“给药间隔”是指在施用给受试者的本文公开的制剂的多个剂量之间逝去的时间的量。因而可以将给药间隔指示为范围。

本文中使用的术语“给药频率”表示在给定时间中本文公开的制剂的施用剂量的频率。可以将给药频率指示为每个给定时间的给药次数，例如，每周 1 次或 2 周 1 次。

术语“统一剂量（flat dose）”的应用是指，不考虑患者的重量或体表面积（BSA）施用给患者的剂量。因此将统一剂量规定为药剂（例如，抗 PCSK9 抗体）的绝对量，而不是规定为 mg/kg 剂量。例如，60 kg 人和 100 kg 人将接受相同剂量的抗体（例如，240 mg 抗 PCSK9 抗体）。

关于本申请的组合物的术语“固定剂量”的应用是指，单一组合物中的两种或更多种不同抗体彼此以特定（固定）比率存在于所述组合物中。在某些实施方案中，所述固定剂量是基于所述抗体的重量（例如，mg）。在某些实施方案中，所述固定剂量是基于所述抗体的浓度（例如，mg/ml）。在某些实施方案中，所述第一抗体（mg）:第二抗体（mg）的比率是至少约 1:1、约 1:2、约 1:3、约 1:4、约 1:5、约 1:6、约 1:7、约 1:8、约 1:9、约 1:10、约 1:15、约 1:20、约 1:30、约 1:40、约 1:50、约 1:60、约 1:70、约 1:80、约 1:90、约 1:100、约 1:120、约 1:140、约 1:160、约 1:180、约 1:200、约 200:1、约 180:1、约 160:1、约 140:1、约 120:1、约 100:1、约 90:1、约 80:1、约 70:1、约 60:1、约 50:1、约 40:1、约 30:1、约 20:1、约 15:1、约 10:1、约 9:1、约 8:1、约 7:1、约 6:1、约 5:1、约 4:1、约 3:1 或约 2:1。例如，第一抗体和第二抗体的 3:1 比率可以是指，瓶中可以含有约 240 mg 第一抗体和 80 mg 第二抗体，或约 3 mg/ml 的第一抗体和 1 mg/ml 的第二抗体。

“患者”（有时表示为“受试者”）包括任何人或非人动物。术语“非人动物”包括但不限于脊椎动物诸如非人灵长类动物、绵羊、狗，和啮齿类动物诸如小鼠、大鼠和豚鼠。在某些实施方案中，所述患者是人。术语“受试者”和“患者”在本文中的某些语境下可互换地使用。

药物或治疗剂的“治疗有效量”或“治疗上有效的剂量”是当单独使用或与另一种治疗剂联合使用时保护患者免于疾病发作或促进疾病消退的药物的任何量，所述疾病消退通过疾病症状的严重程度的降低、无疾病症状阶段的频率和持续时间的增加、或由疾病折磨引起的损伤或失能的预防来证明。使用熟练的从业人员已知的多种方法可以评价治疗剂的促进疾病消退的能力，诸如在临床试验期间在人患者中，在预测对于人类的效力的动物模型系统中，或通过在体外测定法中测定所述药剂的活性。

术语“约”、“大约”或“基本上包含”表示在本领域普通技术人员确定的

特定值或组成的可接受误差范围内的值或组成，其将部分地取决于如何测量或测定值或组成，即，测量系统的限制。例如，“约”、“大约”或“基本上包含”可以是指按本领域中的实践，在 1 个或超过 1 个标准差内。可替换地，“约”或“基本上包含”可以是指与由其修饰的参数或数值相差至多 10% 或 20%（即， $\pm 10\%$ 或 $\pm 20\%$ ）的范围。例如，约 3 mg 可以包括 2.7 mg 至 3.3 mg 之间（对于 10%）或 2.4 mg 至 3.6 mg（对于 20%）之间的任何数字。此外，特别是关于生物学系统或过程，该术语可以是指直到一个数量级或直到数值的至多 5 倍。当在本申请和权利要求中提供特定值或组成时，除非另有说明，否则“约”或“基本上包含”的含义应当假定在该特定值或组成的可接受误差范围内。

本文中使用的术语“约每周一次”、“约每两周一次”或任意其它类似的给药间隔术语是指近似值。“约每周一次”可以包括每 7 天 ± 1 天，即，每 6 天至每 8 天。“约每两周一次”可以包括每 14 天 ± 3 天，即，每 11 天至每 17 天。类似的近似值适用于，例如，约每 3 周一次，约每 4 周一次，约每 5 周一次，约每 6 周一次，和约每 12 周一次。在某些实施方案中，约每 6 周一次或约每 12 周一次的给药间隔是指可以在第一周的任意天施用第一剂，然后可以分别在第六周或第十二周的任意天施用第二剂。在其它实施方案中，约每 6 周一次或约每 12 周一次的给药间隔是指在第一周的特定天（例如，星期一）施用第一剂，并然后分别在第六周或第十二周的相同天（即，星期一）施用第二剂。类似的原则适用于包括、但不限于“约每 2 周 1 次”，“约每月 1 次”等.....的短语。

如本文中所述的，任何浓度范围、百分比范围、比率范围或整数范围应当理解为包括在列举的范围内的任意整数的值，且当适当时，包括其分数（诸如整数的十分之一和百分之一），除非另外指出。

除特别声明外，本申请中的“约”或“大约”是指在所给定的具体数值范围 $\pm 5\%$ 范围内波动，优选在 $\pm 2\%$ 范围内波动，更优选在 $\pm 1\%$ 范围内波动。例如 pH 值为约 5.5 表示 pH 为 $5.5 \pm 5\%$ ，优选 pH 为 $5.5 \pm 2\%$ ，更优选 pH 为 $5.5 \pm 1\%$ 。

术语“药学上可接受的”是针对那些化合物、材料、组合物和/或剂型而言，它们在可靠的医学判断的范围之内，适用于与人类和动物的组织接

触使用，而没有过多的毒性、刺激性、过敏性反应或其它问题或并发症，与合理的利益/风险比相称。

术语“药物的制剂”、“药物组合物”是指一种本申请的活性成分（例如抗 PCSK9 抗体）与药学上可接受的辅料组成的混合物。药物组合物的目的是有利于对受试者给予本申请的活性成分。

术语“单次药物剂量单元”表示在给药方案时刻，（优选按照受试者每 kg 体重）待给药于受试者的包含本发明所述的抗 PCSK9 抗体或其抗原结合片段的单次药物剂型，如安瓿瓶。

施用方式

下述内容并非限制本申请药物的施用方式。

在一个实施方案中，本申请的药物可以配制成适合于单次或多次施用的药物组合物。

本申请的药物以适合的各种途径施用，包括但不限于，口服或肠胃外（通过静脉内、肌内、局部或皮下途径）。在一些实施方案中，本申请的药物口服施用或注射施用，例如静脉注射或腹腔注射。

本申请的药物适合的剂型，包括但不限于，片剂、含片、丸剂、胶囊剂（例如硬胶囊、软胶囊、肠溶胶囊、微囊剂）、酏剂、颗粒剂、糖浆剂、注射剂（肌肉内、静脉内、腹腔内）、颗粒剂、乳剂、悬浮液、溶液、分散剂和用于口服或非口服给药的缓释制剂的剂型。

本申请的药物组合物含有药学上可接受的载体和/或赋形剂。

附图说明

图 1. MAB1 对小鼠血清 LDL-C 的影响。

图 2. MAB1 对食蟹猴血清 LDL-C 的影响，s.c: 皮下注射；i.v: 静脉注射；male: 雄性；female: 雌性。

图 3. MAB1 对 HepG2 细胞的 LDL 的内吞作用的影响。

图 4. MAB1 解除野生型 PCSK9 对 LDL 内吞的抑制。

图 5. MAB1 解除功能增强突变型 PCSK9（PCSK9-D374Y）对 LDL 内吞的抑制。

具体实施方式

下面结合具体实施例对本申请进行进一步的描述,然而,本申请中这些实施例仅用于阐明而不限本申请的范围。同样,本申请不限于本文描述的任何具体优选的实施方案。本领域技术人员应该理解,对本申请技术特征所作的等同替换、或相应的改进仍属于本申请的保护范围之内。除特别说明的以外,以下实施例采用的试剂均为市售产品,溶液的配制可以采用本领域常规技术。

在本发明的下述实施例中,同型对照抗体为人抗鸡蛋溶酶体(human anti-Hen Egg Lysozyme IgG, anti-HEL, 即human IgG, 简称hIgG),其序列来自于Acierno等人发表的Affinity maturation increases the stability and plasticity of the Fv domain of anti-protein antibodies (Acierno等人. J Mol Biol. 2007; 374(1): 130-46., 其中重链的氨基酸序列为SEQ ID NO:11所示,轻链的氨基酸序列为SEQ ID NO:12所示),设计为本研究的同型对照抗体,在中山康方生物医药有限公司实验室制备而成。

在本发明的下述实施例中,使用的C57BL/6小鼠购自广东省医学实验动物中心。

实施例 1. 人源化抗 PCSK9 抗体的制备

1. 抗体的设计

为制备单克隆抗体 MAB1, 本发明人根据已有的 PCSK9 蛋白序列 (NP_777596.2) 及其蛋白三维晶体结构等, 人工设计了一系列的抗体序列。通过大量的筛选和检测, 最终得到了一种与 PCSK9 特异性结合的 MAB1。该单克隆抗体重链和轻链可变区的氨基酸序列及其编码序列如下面的 SEQ ID NO:1-4。

设计的 MAB1 重链 VH 的 DNA 序列如下(369bp) :

```
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCCTGGTGCAGCCC  
GGAAGATCTCTGAGACTGAGTTGCGCCGCTTCAGGATTCACCTTTA  
GCTCCTACAGCATGAACTGGGTGCGGCAGGCTCCTGGCAAGGGGCT  
GGAGTGGGTCTCCGGAATCTCTAGTTCAAGCTCCTACATTAGCTATG
```

CAGACTCCGTCCAGGGAAGGTTACCATCTCTCGCGATAACGGCAA
GAACAGCCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCAGAGGACAC
AGCCCTGTACTTCTGTGCCAGAGAATATGACTTCTGGTCCGCCTATT
ACGACGCCTTCGATGTCTGGGGACAGGGGACTATGGTCACTGTCTC
AAGC(SEQ IDNO:1)

其编码的 VH 蛋白序列如下(123aa) :

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKG
LEWVSGISSSSYISYADSVQGRFTISRDNKGKNSLYLQMNSLRAEDTAL
YFCAREYDFWSAYYDAFDVWGQGTMTVTVSS(SEQ ID NO:2)

MAB1 轻链 VL 的 DNA 序列如下(333bp) :

CAGAGCGAACTGACTCAGCCAAGAAGCGTCAGTGGATCACCT
GGCCAGAGCGTGACAATCTCCTGCACCGGCACAAGCAGGAACATT
GGCGGGGGAAATGACGTCCACTGGTACCAGCAGCATCCAGGGAAG
GCCCCAAACTGCTGATCTCCGGAGTGATTGAGCGGAGCTCCGGCG
TCCCCGATAGATTCAGCGGGTCCAAGTCTGGAAACACAGCTTCTCT
GACTATCAGTGGCCTGCAGGCAGAGGACGAAGCCGATTACTATTGC
CAGTCTTTCGACGGCAGTCTGTCAGGGAGCGTGTTTGGCACTGGGA
CCGATGTGACCGTCCTG (SEQ ID NO:3)

其编码的 VL 蛋白序列如下(111aa) :

QSELTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSRNIGGGNDVHWYQQHPGKA
PKLLISGVIERSSGVPDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCQSF
DGLSGSVFGTGTDTVTL (SEQ ID NO:4)

所述抗体的 CDR 序列如下:

HCDR1 : GFTFSSYS (SEQ ID NO : 5);

HCDR2 : ISSSSSYI (SEQ ID NO : 6);

HCDR3 : EYDFWSAYYDAFDV (SEQ ID NO : 7);

LCDR1 : SRNIGGGND (SEQ ID NO : 8);

LCDR2 : GVI (SEQ ID NO : 9) ; 以及

LCDR3 : QSF DGLSGSV (SEQ ID NO : 10)。

2. 抗体的表达和纯化

将 MAB1 的重链 cDNA 序列(编码序列如 SEQ ID NO : 1 所示;恒定区是 Ig gamma-1 chain C region, ACCESSION: P01857) 和轻链的 cDNA 序列(编码序列如 SEQ ID NO : 3 所示; 恒定区为 Ig lambda-2 chain C regions; ACCESSION:P0CG05.1) 分别克隆到 pUC57simple(金斯瑞公司提供) 载体中, 分别获得 pUC57simple-MAB1H 和 pUC57simple-MAB1L 质粒。分别将质粒 pUC57simple-MAB1H 和 pUC57simple-MAB1L 进行酶切(HindIII&EcoRI), 电泳回收得到的重链轻链分别亚克隆到 pcDNA3.1 载体中, 提取重组质粒共转染 293F 细胞。细胞培养 7 天后, 将培养液通过高速离心、上清浓缩后上样至 HiTrap MabSelect SuRe 柱, 用 Elution Buffer 一步洗脱蛋白并回收目标样品并换液至 PBS。

实施例 2. MAB1 对动物血清低密度脂蛋白胆固醇 LDL-C 的影响

(1) MAB1 对小鼠血清低密度脂蛋白胆固醇 LDL-C 的影响

32只C57BL/6小鼠给药前通过眼眶采血分离血清, 使用全自动生化分析仪(迈瑞, 型号BS-180)检测小鼠低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)。如表1所示, 将小鼠分为4组, 即正常组、模型组、MAB1低剂量组和MAB1高剂量组, 每组8只, 并按表1给药方案给药。并在给药前D0、给药后D3、D7、D10、D14、D18采血分离血清, 进行血脂低密度脂蛋白胆固醇检测。

实验结果如图1所示。实验结论, 与模型组相比, MAB1低剂量60mg/kg组和MAB1高剂量120mg/kg组均能够明显降低小鼠血清中LDL-C含量(P<0.05或P<0.01)。

表 1: MAB1 对小鼠的给药剂量和给药方案

组别	动物数量	采血方案	给药方案 (包括给药名称、剂量、部位、频率等)
正常组	8	给药前 D0、给药后 D3、 D7、D10、D14、D18 采血分离血清, 进行血脂低密度脂蛋白胆固醇	生理盐水, 皮下, D0
模型组	8		hIgG, 60mg/kg, 皮下, D0
MAB1 60mg/kg	8		MAB1, 60mg/kg, 皮下, D0

MAB1 120mg/kg	8	醇检测	MAB1, 120mg/kg, 皮下, D0
------------------	---	-----	---------------------------

注：第一次给药时间为 D0，即第 0 天；皮下：即皮下注射；

(2) MAB1 对食蟹猴血清低密度脂蛋白胆固醇 LDL-C 的影响

选用从南宁市德恒生物科技有限公司（动物生产许可证：SCXK（桂）2011-0007，实验动物合格证编号：0005869）购买的12 只雄性和12 只雌性食蟹猴（普通级）进行本实验。所有涉及动物使用和福利的操作和活动都要在操作前经机构动物伦理委员会（IACUC）批准。IACUC 批准编号为：ACU16-467。

如表2所示，根据给药前测定的动物体重，使用计算机系统将动物按性别随机分配到MAB1低剂量组、MAB1中剂量组、MAB1高剂量组和MAB1静脉给药组，并按表2给药方案给药。并在所有动物于药前D0、药后4h，D2、D4、D6、D8、D11、D15、D18、D22，空腹采集血样约0.5ml。血样采集后转移至离心管中，于2-8℃、3000 g条件下离心10分钟。测定低密度脂蛋白（LDL-C）。

实验结果，如图2所示。实验结论，MAB1以3、10 及30mg/kg 剂量单次皮下注射给予食蟹猴，以10mg/kg 单次静脉注射给予食蟹猴。食蟹猴体内的低密度脂蛋白，在给药后均显著下降。至药后约15 天，3mg/kg剂量组动物血脂水平基本回复至药前水平，至药后22天，10mg/kg 的皮下注射及静脉注射剂量组动物血脂水平也基本回复，而30mg/kg 剂量组部分动物血脂水平仍明显低于药前。

表 2：MAB1 对食蟹猴的给药剂量和给药方案

组别	动物数量	采血方案	给药方案
低剂量组	6	所有动物于药前 D0、药后 4h, D2、D4、D6、D8、D11、	MAB1, 3mg/kg, 皮下, D0
中剂量组	6	D15、D18、	MAB1, 10mg/kg, 皮下,

		D22, 空腹采集血样约	D0
高剂量组	6	0.5ml。采血分离血清, 进行	MAB1, 30mg/kg, 皮下,
		血脂低密度脂蛋白胆固醇	D0
静脉给药组	6	检测	MAB1, 10mg/kg, 静脉,
			D0

注: 第一次给药时间为D0, 即第0天; 皮下: 即皮下注射; 静脉: 即静脉注射; 根据给药前测定的动物体重, 使用计算机系统将动物按性别随机分配到4组中。每组雌性3只, 雄性3只;

实施例 3. MAB1 对 HepG2 细胞的 LDL 的内吞作用的影响

PCSK9 可以通过介导 LDLR 的内吞分解进而抑制 HepG2 细胞表面 LDLR 的表达。LDL 可以结合 LDLR 进而被内吞入细胞, BODIPY 荧光标记 LDL (BODIPY-LDL, Life, 货号: L3483)可作为标记物与 LDLR 结合并被内吞入细胞, 通过检测细胞内 BODIPY-LDL 的荧光值, 进而反映 LDLR 介导的 LDL 的内吞。如 PCSK9 存在并结合于 LDLR, 则会导致细胞表面的 LDLR 减少进而结合于 LDLR 的 BODIPY-LDL 减少, 即抑制了 LDL 的内吞; 反之, 如抑制 PCSK9 则可以增强 HepG2 细胞对 LDL 内吞。因此, 该实验体系可以通过检测 HepG2 细胞对 BODIPY-LDL 的内吞活性而衡量抗 PCSK9 抗体的药理学活性。

实验方法: 每孔加入 50 μ l 多聚赖氨酸 (Poly-l-lysine) 溶液包被 96 孔黑底细胞培养板, 置于 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 培养箱中 2 小时, 弃包被液, 100 μ l PBS 洗涤一次, 晾干待用。HepG2 细胞常规消化, 以分析培养基 (1%NEAA 的 DMEM) 重悬细胞, 计数 2×10^4 /孔接种于 96 孔黑底细胞培养板中, 每孔加入 80 μ l, 置于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱中培养 18 小时。用分析培养基 (1%NEAA 的 DMEM) 预稀释 PCSK9 至 6000nM, 每孔加入 10 μ l; 抗体稀释成 10 $\times$, 每孔加入 10 μ l, 置于 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 培养箱中培养 6 小时。之后, 每孔加入 10 μ l 0.1mg/ml 的 BODIPY-LDL 溶液, 置于 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 培养箱中培养 22 小时。取出培养板, 弃去培养基, 每孔加入 200 μ l PBS 洗涤后弃去。加入甲醛溶液以固定细胞, 室温放置 20min。弃去甲醛, 加入 PBS 洗涤。最后弃去 PBS, 每孔加入 100 μ l PBS 用多标记微孔板检测

仪设置激发光波长 490nm, 发射波长 520nm, cutoff 为 515nm 读取 BODIPY 的相对荧光单位数值。

结果如表 3 和图 3 所示, MAB1 解除 PCSK9 抑制 HepG2 细胞内吞 LDL 活性的 EC₅₀ 值为 12.99 μ g/ml。

实验结论, MAB1 能抑制 PCSK9 的活性, 从而使 HepG2 细胞内吞 LDL 的量增加, MAB1 的 EC₅₀ 为 12.99 μ g/ml。

表 3 MAB1 检测 HepG2 细胞的 LDL 的内吞作用结果

MAB1 浓度 (μ g/ml)	RFU	平均值		SEM
120	1432819	1501195	1467007	34188
40	1421783	1233042	1327413	94370.5
28	1294536	1179255	1236896	57640.5
16	1145831	1002411	1074121	71710
6.4	267495	227003	247249	20246
2.56	412355	282301	347328	65027
1.024	341749	236159	288954	52795
0.4096	222579	229323	225951	3372
0.16384	203970	192901	198435.5	5534.5

实施例 4. MAB1 解除野生型和功能增强突变型 PCSK9 对的 LDL 内吞的抑制

PCSK9 存在多种突变形式, 根据突变对 PCSK9 调节 LDL-C 水平影响不同分为两类, 功能获得型和功能缺失型。功能获得型突变可增强 PCSK9 上调 LDL-C 的能力, 导致高胆固醇血症, 主要形式有 S127R、D129G、F216L、R218S、D374Y、N425S、R496W、H553R 和 E670G 等。

其中, D374Y (Asp374Tyr) 突变改变 PCSK9、LDLR 亲和力, 使得 PCSK9、LDLR 亲和力增加 5 至 30 倍 (Lagace TA et al. J Clin Invest. 2006, 116(11): 2995-3005; Cunningham D et al. Nat Struct Mol Biol, 2007, 14(5): 413-419; Fisher TS et al. J Biol Chem, 2007, 282(28): 20502-20512)。

本实验以 D374Y (Asp374Tyr) 突变蛋白为例, 研究了 MAB1 对于抑制功能增强型 PCSK9 突变蛋白介导的 LDLR 的内吞的活性。实验结果提

示, MAB1 可有效解除功能获得型 PCSK9 蛋白对 LDL 的内吞的抑制。

实验材料: HepG2 (购自中国科学院, P14); DMEM (Gibco, 货号: 11995040); FBS (Excell bio, 货号: FSP500); MEM NEAA(100X)(Gibco, 货号: 11140-050); POLY-L-LYSINE (SIGMA, 货号: P4832); BODIPY-LDL (Life, 货号: L3483); PCSK9-his (康方生物自产); PCSK9 (D374Y)-his (Acrobio, 货号: PCY-H5225)。Evolocumab (购自 AMGEN)。

实验方法: 50 μ L 0.01%的多聚赖氨酸包被黑色 96 孔细胞培养板, 置于 37°C, 5%CO₂ 培养箱 2h, 弃包被液, 100 μ L PBS 洗涤一次, 晾干待用。处于对数期的 HepG2 细胞, 弃去培养皿中的生长培养基(12%FBS, 1% NEAA 的 DMEM), 胰蛋白酶消化后以分析培养基(1% NEAA 的 DMEM) 重悬细胞, 计数后, 20000/well 接种于黑色的 96 孔细胞培养板中, 每孔 80 μ L, 37°C, 5%CO₂ 条件下培养过夜。次日, 以分析培养基稀释 PCSK9 和抗体 (终浓度如图所示), 加入到 96 孔板中, 体系终体积为 100 μ L。将细胞培养板放置到 37°C, 5% CO₂ 条件下培养 21h。取出培养板, 每孔加入 10 μ L 0.1 mg/mL BODIPY 标记的 LDL 溶液, 将培养板置于 37 °C, 5 % CO₂ 条件下培养 9 h。从培养箱取出培养板, 弃去培养基, 每孔加入 200 μ L PBS 洗涤培养板后弃去。每孔加入 100 μ L PBS 用多标记微孔板检测仪, 以 485nm 为激发光波长, 以 535nm 为发射光波长, 在细胞培养板上读取相对荧光单位(Relative Fluorescence units, RFU) 数值。

实验结果: 实验结果如表 4, 图 4, 图 5 所示, MAB1 可有效的与野生型 PCSK9 及功能增强突变型 PCSK9 (PCSK9-D374Y) 结合, 有效阻断 PCSK9 对 LDL 内吞的抑制, 其与同靶点已上市药物 Evolocumab 活性相当。

表 4.MAB1 抑制野生型和功能增强突变型 PCSK9 对 LDLR 内吞的 EC₅₀

	EC ₅₀ (μ g/mL)	
	MAB1	Evolocumab
野生型 PCSK9	32.87	30.79
功能增强突变型 PCSK9 (PCSK9-D374Y)	1.102	1.259

实施例 4. MAB1 解除野生型 PCSK9 蛋白对突变型 LDLR 介导的 LDL 内吞的抑制

PCSK9 蛋白结合于 LDLR 发挥调控 LDL-C 代谢的功能。LDLR 基因突变的众多，以 LDLR 蛋白合成与功能为基础突变可划分为 1) LDLR 不表达型突变，包括 LDLR 等位基因不表达即细胞不表达 LDLR，具体的有启动子序列突变、无义突变、移码突变、剪接突变等，以及 LDLR 转运缺陷即有缺陷的 LDLR 合成后无法从内质网向高尔基体的转运进而堆积胞内被分解；2) 为结合缺陷型基因突变，即突变基因编码的异常 LDLR 可转运并在细胞表面表达，但是结合 LDL-C 的活性下降或者消失；3) 内移缺陷型基因突变，即由于编码 NPVY 序列的密码子发生突变，受体能与 LDL 结合但不能被内吞从而聚集于被覆陷窝；4) 再循环缺陷型基因突变，即受体能够结合 LDL-C 并介导内吞但是将会在溶酶体内与 LDL-C 同时降解，导致 LDLR 不能够再循环到细胞表面。本实验以野生型 LDLR（即对应下面突变型 LDLR(D227E)的第 227 位氨基酸为 D），突变型 LDLR(D227E)(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/3690/>)作为对照，评价不同突变型 LDLR 内吞 LDL 活性、PCSK9 对不同突变型 LDLR 内吞 LDL 的抑制以及 MAB1 是否有效解除 PCSK9 介导的 LDL 内吞的抑制作用。

实验方法：293T 细胞常规消化铺板， 5×10^5 /孔接种至 6 孔板中，2mL DMEM+10%FBS+1% 双抗（Penicillin Streptomycin，Gibco，货号：15140-122），置于培养箱孵育过夜；转染前 2h 换液，换成 1mL 的 Opti-MEM 无血清培养基；Opti-MEM 分别稀释目的质粒 DNA（中山康方生物医药有限公司构建，见表 5，以野生型 LDLR 为基础，以起始密码子编码的氨基酸为位置 1，按照表 5 进行相应位置的定点突变后，插入到购自 YouBio 公司的慢病毒质粒 pCDH-CMV-MCS-EF1-puro，获得表 5 中的各个质粒）和 PEI（Polyscience，货号：23966），目的质粒与对照质粒（中山康方生物医药有限公司构建，见表 5）（各 2 μ g，PEI 10 μ g（单转的 PEI 用量 5 μ g），稀释好的 DNA 和 PEI 混匀孵育 15min 后缓慢滴加到 6 孔板内，轻轻摇匀，置于培养箱孵育过夜；将 6 孔板内培养基换成 2mL DMEM+10%FBS，置于培养箱继续培养；转染 48h 后，0.05%胰酶-EDTA

消化离心收集细胞，计数；取部分细胞做 reporter assay 实验， 2×10^5 /孔，100 μ L DMEM+10%FBS，PBS 和 IL-6（康方生物，批号：20150421）（50ng/mL）组，孵育过夜后加 50 μ L 底物（Bright-GloTM luciferase assay system, Promega, 货号：E2620）读取 RLU 值；取部分细胞做 LDL 内吞（FACS）实验，200 μ L Opti-MEM+1%NEAA， 2×10^5 /孔，PCSK-9、hIgG1（康方生物，批号：20170424）、MAB1 终浓度分别为 600nM、50 μ g/mL、50 μ g/mL，PCSK-9 与抗体预孵育后给药，与细胞孵育过夜。

按实验设计加入对应的 LDL(BODIPY-LDL, Life, 货号：L3483)（终浓度为 0.001mg/mL），混匀孵育 4h；

收集细胞转移至尖底 96 孔板中，350xg 离心 5min，弃上清；加 200 μ L 1%PBSA 重悬细胞沉淀，350xg 离心 5min，弃上清，重复洗涤一次；加 200 μ L 1%PBSA 重悬细胞沉淀，转移至流式管中，上机检测。

实验结果如表 5，以野生型 LDLR 为例，LDL 内吞率为 11.50%，加入 PCSK9 后内吞率为 7.23%，表明 PCSK9 阻断了 LDLR 对 LDL 的内吞，在 LDL 和 PCSK9 的基础上加入 MAB1，内吞率为 8.53%，表明 MAB1 可有效解除 PCSK9 介导的 LDL 内吞的抑制作用。表中突变序列信息均来源于文献及相关在线数据库（Liang L et al., Scientific Reports. 2015; 5(1):17272.; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>）。

表 5 野生型 LDLR 和不同突变型 LDLR 对 BODIPY-LDL 的内吞率%

突变位点	质粒	LDL 内吞率%				PCSK9 抑制率%
		LDL	LDL+ PCSK9	LDL+PCSK9 +hlgG1	LDL+PCSK9 + MAB1	
hLDLRFL (野生型)	pCDH-hLDLRFL-puro	11.50	7.23	6.27	8.53	37.13
Asp227Glu (hLDLR(D227E))	pCDH-hLDLR(D227E) -puro	11.30	6.72	7.63	11.60	40.53
Glu179Lys	pCDH-hLDLRmt2-puro	9.30	2.04	2.21	7.11	78.06
His583Asp	pCDH-hLDLRmt3-puro	7.56	2.88	2.96	6.06	61.90
Asp172Asn	pCDH-hLDLRmt4.1-puro	11.30	4.71	4.22	10.90	58.32
Leu575Phe	pCDH-hLDLRmt4.2-puro	7.18	5.01	5.08	5.93	30.22
Cys255Arg	pCDH-hLDLRmt6.2-puro	11.90	7.08	6.75	9.77	40.50
Gly636Val	pCDH-hLDLR020-puro	9.79	4.72	4.83	8.24	51.79
Gly98Ser	pCDH-hLDLR059.1-puro	11.60	7.11	7.47	9.96	38.71
Asp94Asn	pCDH-hLDLR0123.1-puro	11.60	3.98	3.34	7.42	65.69
Ala459Thr	pCDH-hLDLR0123.2-puro	9.69	6.74	7.40	8.90	30.44
His583Tyr	pCDH-hLDLR0160-puro	9.04	6.36	6.96	8.17	29.65

研究结果显示，当突变型 LDLR 具有内吞 LDL 活性，且 PCSK9 能抑制其对 LDL 的内吞时，加入 MAB1 可显著增加 LDL 的内吞，即 MAB1 可有效解除 PCSK9 介导的 LDL 内吞的抑制作用。