

中图分类号: R965; R979.1 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2024)23-0045-07  
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.23.011



# 抗前蛋白转化酶枯草溶菌素 9 单克隆抗体的体外活性表征\*

朱馨婷, 韩 冷, 郭 澄, 杨全军<sup>△</sup>

(上海交通大学医学院附属第六人民医院, 上海 200233)

**摘要:**目的 探讨托莱西单抗、依洛尤单抗和阿利西尤单抗与前蛋白转化酶枯草溶菌素 9(PCSK9)的亲和力。方法 采用表面等离子共振法和生物膜层干涉法检测托莱西单抗、依洛尤单抗、阿利西尤单抗 3 种 PCSK9 抑制剂对 PCSK9 的亲和力;采用免疫印迹法(Western blot)法检测 HepG2 细胞中低密度脂蛋白受体(LDLR)的表达水平,考察不同质量浓度(0, 6, 60, 180  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )托莱西单抗阻断重组人 PCSK9(D374Y)与 LDLR 的结合能力。结果 表面等离子共振法和生物膜层干涉法测得托莱西单抗与 PCSK9 的平衡解离常数分别为  $2.90 \times 10^{-10} \text{ mmol}/\text{L}$  和  $5.05 \times 10^{-10} \text{ mmol}/\text{L}$ ;托莱西单抗与重组人 PCSK9(D374Y)的亲和力是依洛尤单抗的 1.85 倍、2.57 倍,是阿利西单抗的 5.38 倍、4.71 倍。托莱西单抗阻断重组人 PCSK9(D374Y)与 LDLR 结合的半数抑制浓度( $IC_{50}$ )为  $64.42 \text{ nmol}/\text{L}$ ,与重组人 PCSK9(D374Y)结合恢复低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)内吞作用的半数最大效应浓度( $EC_{50}$ )分别为  $(15.03 \pm 0.63) \mu\text{g}/\text{mL}$  和  $(7.22 \pm 0.16) \mu\text{g}/\text{mL}$ ;Western blot 法试验结果显示,不同质量浓度(0, 6, 60, 180  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )托莱西单抗中 HepG2 细胞灰度值分别为 0.76, 0.83, 3.21, 3.28。结论 托莱西单抗与 PCSK9 的亲和力强于阿利西尤单抗和依洛尤单抗,能阻止 LDLR 的降解,从而浓度依赖性增加肝细胞表面 LDLR 的表达。

**关键词:**前蛋白转化酶枯草溶菌素 9;托莱西单抗;依洛尤单抗;阿利西尤单抗;抗体亲和力;体外活性

## Characterization of *in Vitro* Activity of PCSK9 Monoclonal Antibodies

ZHU Xinting, HAN Leng, GUO Cheng, YANG Quanjun

(Shanghai Sixth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, China 200233)

**Abstract: Objective** To investigate the affinity of tafocicimab, evolocumab and alirocumab to proprotein convertase subtilisin / kexin type 9 (PCSK9). **Methods** The affinity of three PCSK9 monoclonal antibodies (tafocicimab, evolocumab and alirocumab) for PCSK9 was examined by the surface plasmon resonance and bilayer interferometry methods. The expression level of low-density lipoprotein receptor (LDLR) in HepG2 cells was detected by the Western blot, and the ability of different mass concentrations (0, 6, 60, 180  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) of tafocicimab to block recombinant human PCSK9 (D374Y) binding to LDLR was investigated. **Results** The equilibrium dissociation constants of tafocicimab with PCSK9 determined by the surface plasmon resonance and bilayer interferometry methods were  $2.90 \times 10^{-10} \text{ mmol}/\text{L}$  and  $5.05 \times 10^{-10} \text{ mmol}/\text{L}$ , respectively. The affinity of tafocicimab to recombinant human PCSK9 (D374Y) was 1.85 times and 2.57 times higher than that of evolocumab, and 5.38 times and 4.71 times higher than that of alirocumab. The half maximal inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) of tafocicimab for blocking the binding of recombinant human PCSK9 (D374Y) to LDLR was  $64.42 \text{ nmol}/\text{L}$ . The concentration for 50% of maximal effect ( $EC_{50}$ ) of tafocicimab for restoring low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) endocytosis by binding human PCSK9 and recombinant human PCSK9 (D374Y) was  $(15.03 \pm 0.63) \mu\text{g}/\text{mL}$  and  $(7.22 \pm 0.63) \mu\text{g}/\text{mL}$ , respectively. Western blot test results showed that the grayscale values of HepG2 cells in different concentrations (0, 6, 60, 180  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) of tafocicimab were 0.76, 0.83, 3.21, and 3.28, respectively. **Conclusion** Tafocicimab, which has a stronger affinity for PCSK9 than alirocumab and

\*基金项目:国家自然科学基金[81872494]。

第一作者:朱馨婷,女,硕士研究生,研究方向为药理学,(电子信箱)shanliang89@sjtu.edu.cn。

<sup>△</sup>通信作者:杨全军,男,博士研究生,主任药师,研究方向为药理学,(电子信箱)myotime@sjtu.edu.cn。

- 作用研究概况[J]. 中药材,2017,40(10):2483-2487.
- [8] 钟春琳,何嘉莹,邱韵静,等. 蜡梅花药材 UPLC 特征图谱及黄酮类成分含量测定研究[J]. 广东药科大学学报,2023,39(6):65-69.
- [9] 董鹏鹏,梅全喜,张帆. 龙葵果 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中药材,2016,39(6):1333-1336.
- [10] 刘晓霞,位翠杰,冯涌微,等. 南五味子药材 UPLC 指纹图谱及一测多评法研究[J]. 天然产物研究与开发,2024,36(1):1-12.
- [11] 叶彬,闫小巧,林敏生,等. 南五味子药材的指纹图谱研究[J]. 中药材,2023,46(12):3063-3067.
- [12] 高微,陈明生,韦广辉,等. 尖尾凤药材的 HPLC 指纹图谱建立及聚类分析和主成分分析[J]. 中国药房,2018,29(16):2215-2219.
- [13] 张帆,董鹏鹏,梅全喜. 不同产地的龙葵果中澳洲茄碱、澳洲茄边碱的含量测定比较研究[J]. 时珍国医国药,2017,28(12):2986-2987.

(收稿日期:2024-04-10;修回日期:2024-06-21)

evolocumab, can prevent the degradation of LDLR and increase the expression of LDLR on the surface of hepatocytes in a concentration - dependent manner.

**Key words:** PCSK9; tafocicimab; evolocumab; alirocumab; antibody affinity; *in vitro* activity

血脂异常为动脉硬化性心血管疾病(ASCVD)的重要危险因素。预计到2030年,血脂异常将导致我国新增920万例心血管事件<sup>[1]</sup>,其中低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)水平升高( $\geq 3.4$  mmol / L)是我国心血管疾病死亡的第三大危险因素,仅次于高血压和高钠饮食<sup>[2-3]</sup>。降低LDL-C水平可显著减少ASCVD的发病及死亡风险。他汀类药物是治疗血脂异常的基石<sup>[4]</sup>,但部分患者在其治疗下的LDL-C并不能达标<sup>[5]</sup>。研究表明,高强度他汀类药物治疗伴随着更高的肌病及肝酶上升风险,在中国人群中更突出<sup>[6]</sup>。前蛋白转化酶枯草溶菌素9(PCSK9)是一种丝氨酸蛋白酶,可与肝细胞质膜表面的低密度脂蛋白受体(LDLR)结合形成LDLR/PCSK9复合物,内吞进入肝细胞被溶酶体降解,导致LDLR不能再循环至肝细胞表面,减少肝细胞表面的LDLR<sup>[7-8]</sup>,从而导致通过肝细胞重摄取的LDL-C减少,使LDL-C清除率降低,循环中的LDL-C水平持续升高。对于仅用他汀类药物无法达到调血脂目标的人群,如家族性高胆固醇血症患者或有高危/极高危心血管疾病风险的非家族性高胆固醇血症人群,《中国血脂管理指南》建议联用他汀类药物与依折麦布或PCSK9抑制剂<sup>[9]</sup>。2015年,美国食品和药物管理局(FDA)批准PCSK9抑制剂依洛尤单抗(商品名Repatha)和阿利西尤单抗(商品名Praluent)上市。依洛尤单抗除能显著降低ASCVD患者的LDL-C水平外,还能显著降低心血管事件的风险<sup>[10]</sup>。阿利西尤单抗不仅可显著降低急性冠状动脉综合征患者的LDL-C水平,还可降低复发性缺血性心血管事件<sup>[11]</sup>的风险。2023年,我国国家药品监督管理局(NMPA)批准托莱西单抗上市。托莱西单抗可显著降低中国非家族性高胆固醇血症和杂合子家族性高胆固醇血症患者的LDL-C水平,且安全性良好<sup>[12-14]</sup>。本研究中通过体外试验定量分析3种已上市抗PCSK9单克隆抗体与PCSK9结合的程度,为其临床应用提供参考。现报道如下。

## 1 仪器、试剂与细胞

### 1.1 仪器

Biacore® T200 SPR系统(美国GE Healthcare公司);Fortebio® Octet RED96e系统,AHC传感器(Cat#18-5060),均购自德国Sartorius公司;96孔黑色微孔板(美国Corning公司,Cat#7007);CytoFLEX型流式细胞仪(美国Beckman Coulter公司);聚-D-赖氨酸涂层的96孔板(美国Agilent公司,Cat#204626);SpectraMAX®

i3型酶标仪(美国Molecular Devices公司)。

### 1.2 试剂

pcDNA3.1(美国Addgene公司,Cat#V790-20);聚乙烯亚胺(美国Polysciences公司,Cat#23966);HBS-EP+缓冲液(美国GE Healthcare公司,Cat#BR100354);抗人Fc抗体(英国Abcam公司,Cat#ab97221);重组人PCSK9(D374Y)蛋白(北京百普赛斯生物科技有限公司,Cat#PCY-H5225);甘氨酸(Cat#15527013),磷酸盐缓冲液(PBS,Cat#10010023),DMEM低糖培养基(Cat#11885-084),BODIPY-LDL-C(Cat#L3483),均购自美国Gibco公司;牛血清白蛋白(BSA,上海生工生物工程技术有限公司,Cat#A600332);吐温20(Tween-20,上海碧云天生物技术有限公司,Cat#ST825);His-PCSK9(北京百普赛斯生物科技有限公司,Cat#PCY-H5223);Anti-His tag-PE抗体(美国Biolegend公司,Cat#362603);托莱西单抗(信达生物制药<苏州>有限公司,Cat#DP03-306001BB,LOT#DP2110007)。

### 1.3 细胞株

Expi293F细胞(Cat#A14527),ExpiCHO-S细胞(Cat#A29127),均购自美国Gibco公司;LDLR-ExpiCHO-S细胞(ExpiCHO-S细胞过表达LDLR,内部构建);HepG2细胞(中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心,Cat#TCHU72)。

## 2 方法与结果

### 2.1 单克隆抗体制备

按表1中的抗体序列(苏州金唯智生物科技有限公司)进行基因合成,然后装载至pcDNA3.1载体上,将同一抗体的轻链质粒与重链质粒按1:1的摩尔比混合,经聚乙烯亚胺转染到Expi293F细胞,培养5~7d,细胞活力低于60%时收集上清液,并用Protein A亲和柱纯化出单克隆抗体。

### 2.2 抗PCSK9单克隆抗体亲和力测定

表面等离子共振(SPR)法:采用Biacore® T200 SPR系统进行检测,试验温度为25℃,缓冲液为pH 7.4的HBS-EP溶液。首先将抗人Fc抗体偶联至芯片表面,偶联密度约为8000RU;将抗体稀释至质量浓度为1μg/mL,以10μL/min的流速捕获至芯片表面,捕获时间为30s;然后将重组人PCSK9(D374Y)蛋白按2倍浓度梯度稀释,由低浓度到高浓度(0,12.5,25,50,100,200,400 mmol / L)依次注入,结合时间为180s,解离时间为1200s;最后用10 mmol / L甘氨酸(pH 1.5)注射30s,对芯片进行再

表1 抗体序列  
Tab. 1 Antibody sequences

抗体	重链	轻链
托莱西单抗	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLCTVSGGSSASYYWSWIRQPPGKGLWIGSINYRGSTYYNPSLKSRTVTSVDTSKNQFSLKLS SVTAADTAVYYCARENSGVVPAAGPNWFGPWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVECPAPPVAGPSVF LFPPKPKDLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQNFSTRVSVLTVVHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPK GQAPRLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLLEP EDFAVYYCQRRNWFTEGGGTKEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKSTYLSLSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
依洛尤单抗	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTLTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWVSFYNGNTNYAQLKQGRGCTMTDPTSTTA YMEISSLRSDDTAVYYCARGYGMDFVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVECPAPPVAGPSVFLFPP KPKDLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQNFSTRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ESALTQPASVSGSPGQITISCTGTSSDVGGSYNSVSWYQQH PGKAPKLMIEYVSNRPSGVSNRFGSGKSGNTASLTISGL QAEDEADYYCNSYTSMTSMVFGGGTKLTVLQPKAAPS VTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADS SPVKAGVETTTQSKSNKYAASSYLSTPEQWQKSHR SYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
阿利西尤单抗	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNFYAMNWRVQAPGKGLDWWVSTISGSGGTTNYADSVKGRFIIIRDSSKHTLYL QMNSLRADTAVYYCAKDSNWNDFDLWGRGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCCPCPELGGPSVF LFPPKPKDLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQNFSTRVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	DIVMTQSPDLSAVSLGERATINCKSSQSVLYRNSNRNRLG WYQQKPGQPNNLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFT LTISSLQAEADVAVYYCQYYTTPYTFGQGTKEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

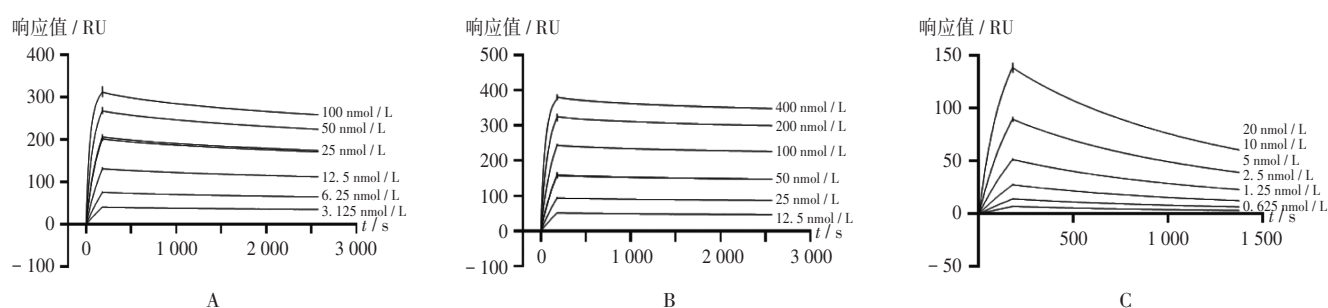


图1 表面等离子共振法检测托莱西单抗、依洛尤单抗和阿利西尤单抗的响应值  
A. Tafolecimab B. Evolocumab C. Alirocumab

Fig. 1 The response values of tafolecimab, evolocumab and alirocumab detected by the surface plasmon resonance method

生。用 Biacore® T200 SPR 系统自带分析软件(3.1版)分析采集的试验数据,采用 1:1 结合模型对数据进行拟合。结果托莱西单抗与重组人 PCSK9 的亲合力是依洛尤单抗的 1.85 倍,是阿利西尤单抗的 5.38 倍。详见图 1 和表 2。

生物膜层干涉 (BLI) 法:采用 Fortebio® Octet RED96e 系统进行检测,试验温度为 25 °C。用配制好的试验缓冲液(1 × PBS, 0.1% BSA, 0.05% Tween - 20)提前将 AHC 传感器预湿 20 min;将待测抗体和重组人 PCSK9 蛋白样品稀释至 100 nmol / L,按排布加入 96 孔黑色微孔板中;设置试验采集顺序,平衡时间为 120 s,固化时间为 120 s,结合时间为 100 s,解离时间为 120 s。用 Fortebio® octer RED96e 系统自带分析软件(10.0 版)

表2 表面等离子共振法检测托莱西单抗、依洛尤单抗和阿利西尤单抗与重组人 PCSK9 的亲合力

Tab. 2 Affinities of tafolecimab, evolocumab and alirocumab to recombinant human PCSK9 detected by the surface plasmon resonance method

抗体	$K_a$ [mmol / (L·s)]	$K_d$ (s <sup>-1</sup> )	$K_D$ (mmol / L)
托莱西单抗	$2.47 \times 10^5$	$7.15 \times 10^{-5}$	$2.90 \times 10^{-10}$
依洛尤单抗	$5.81 \times 10^4$	$3.12 \times 10^{-5}$	$5.37 \times 10^{-10}$
阿利西尤单抗	$5.23 \times 10^5$	$8.16 \times 10^{-4}$	$1.56 \times 10^{-9}$

注: $K_a$ 为结合速率常数, $K_d$ 为解离速率常数, $K_D$ 为解离常数, $K_D = K_d / K_a$ 。表3同。

Note: $K_a$  refers to the binding rate constant,  $K_d$  refers to the dissociation rate constant,  $K_D$  refers to the dissociation constant, and  $K_D = K_d / K_a$  (for Tab. 2 - 3).

分析采集的试验数据,采用1:1结合模型对数据进行拟合,得动力学及亲和力参数。结果托莱西单抗与重组人PCSK9的亲和力是依洛尤单抗的2.57倍,是阿利西尤单抗的4.71倍。详见图2和表3。

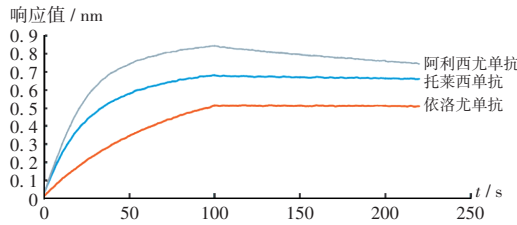


图2 生物膜层干涉法检测托莱西单抗、依洛尤单抗和阿利西尤单抗的响应值

Fig. 2 The response values of tofacimab, evolocumab and alirocumab detected by the biolayer interferometry method

表3 生物膜层干涉法检测托莱西单抗、依洛尤单抗和阿利西尤单抗与重组人PCSK9(D374Y)的亲和力

Tab. 3 Affinities of tofacimab, evolocumab and alirocumab for recombinant human PCSK9 (D374Y) detected by the biolayer interferometry method

抗体	响应值(nm)	$K_a$ [mol / (L·s)]	$K_d$ (s <sup>-1</sup> )	$K_D$ (mol / L)
托莱西单抗	0.676	$3.96 \times 10^5$	$2.00 \times 10^{-4}$	$5.05 \times 10^{-10}$
依洛尤单抗	0.493	$1.54 \times 10^5$	$2.00 \times 10^{-4}$	$1.30 \times 10^{-9}$
阿利西尤单抗	0.835	$4.14 \times 10^5$	$9.83 \times 10^{-4}$	$2.38 \times 10^{-9}$

### 2.3 托莱西单抗在CHO细胞中阻断重组人PCSK9与LDLR结合试验

用PBS将配体蛋白His-PCSK9稀释至终浓度为200 nmol/L,再将待测抗体稀释至终浓度为300 nmol/L,并依次2倍梯度稀释,加入新的96孔板,每孔50 μL,置4 °C冰箱中孵育30 min。收集LDLR-CHO-S细胞,离心,去上清液,用PBS重悬,并调整靶细胞密度至 $4 \times 10^6$ 个/mL,接种至96孔板,每孔100 μL。取预先稀释好抗体的96孔板,加入50 μL靶细胞,吹打,混匀,置4 °C冰箱中孵育30 min。处理后的细胞在400 g条件下离心5 min,轻弃上清液,加200 μL PBS,400 g条件下离心5 min,轻弃上清液,重复3次。加入1:200稀释好的anti-His tag-PE抗体溶液100 μL重悬细胞,置4 °C冰箱中避光孵育30 min。400 g条件下离心5 min,轻弃上清液;加200 μL PBS,400 g条件下离心5 min,轻弃上清液,重复3次。加80 μL PBS重悬细胞。用CytoFLEX型流式细胞仪检测细胞的荧光信号值。结果非线性拟合后托莱西单抗和依洛尤单抗阻断重组人PCSK9与CHO-LDLR细胞结合的半数抑制浓度( $IC_{50}$ )分别为64.42, 90.89 nmol/L。详见图3。可见,在浓度最高点时,免疫球蛋白G2(IgG2)对阻断重组人PCSK9与LDLR结合无作用,托莱西单抗阻断重组人PCSK9与LDLR的结合能力比依洛尤单抗强。

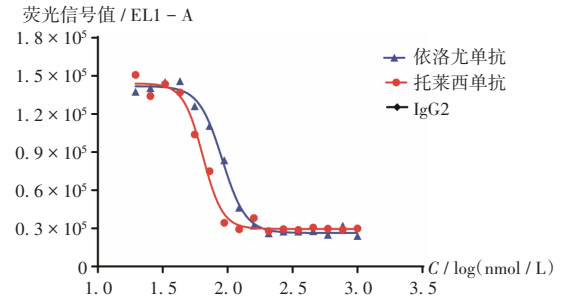


图3 非线性拟合后托莱西单抗和依洛尤单抗阻断重组人PCSK9与CHO-LDLR细胞结合的 $IC_{50}$

Fig. 3  $IC_{50}$  values of tofacimab and evolocumab for blocking of PCSK9 binding to CHO-LDLR cells by non-linear fit

### 2.4 托莱西单抗阻断野生型PCSK9与LDLR结合促进LDL-C内吞试验

收集HepG2细胞,离心,去上清液,用分析培养基(1%非必需氨基酸+DMEM低糖培养基)重悬,并调整细胞密度至 $2 \times 10^5$ 个/mL,接种于黑色底部透明的聚-D-赖氨酸涂层的96孔板中,每孔100 μL,置37 °C培养箱中孵育过夜。将待测抗体稀释为终浓度为1 000 nmol/L,并依次2倍梯度稀释,与稀释至终浓度为1 200 nmol/L的配体蛋白His-PCSK9等体积混匀,置室温孵育1 h。取孵育好的抗体,加入接种好靶细胞的96孔板中,每孔50 μL,轻柔吹打,混匀,置37 °C培养箱中孵育6 h。同时设置阳性对照和阴性对照,每孔加入25 μL质量浓度为30 μg/mL的BODIPY-LDL-C,继续孵育22 h,轻弃上清液,每孔加入200 μL PBS,轻弃上清液,重复3次。每孔再加入100 μL PBS。用SpectraMAX® i3型酶标仪检测,以488 nm为激发光波长,以540 nm为发射光波长,读取荧光值,计算托莱西单抗和依洛尤单抗的LDL恢复率。LDL恢复率(%) = (样本荧光值 - 阴性对照荧光值) / (阳性对照荧光值 - 阴性对照荧光值) × 100%。结果托莱西单抗和依洛尤单抗与野生型PCSK9结合恢复LDL-C内吞作用的半数最大效应浓度( $EC_{50}$ )分别为 $(15.03 \pm 0.63) \mu\text{g} / \text{mL}$ 和 $(16.47 \pm 0.23) \mu\text{g} / \text{mL}$ ,二者的作用效果相当。详见图4。

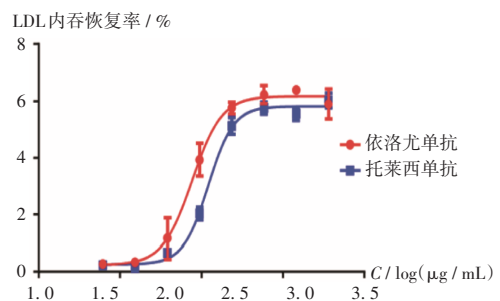


图4 托莱西单抗和依洛尤单抗与野生型PCSK9结合恢复LDL-C内吞作用的 $EC_{50}$

Fig. 4  $EC_{50}$  values of tofacimab and evolocumab for restoring LDL-C endocytosis by binding wild PCSK9

## 2.5 托莱西单抗阻断重组人 PCSK9(D374Y)与 LDLR 结合促进 LDL - C 内吞试验

收集 HepG2 细胞,离心,去上清液,用分析培养基(1% 非必需氨基酸 + DMEM 培养基)重悬,并调整细胞密度至  $2 \times 10^5$  个 / mL,接种于黑色底部透明的聚 - D - 赖氨酸涂层的 96 孔板中,每孔 100  $\mu$ L,置 37  $^{\circ}$ C 培养箱中孵育过夜。将待测抗体稀释至终浓度为 1 000 nmol / L,并依次 2 倍梯度稀释,与稀释至终浓度为 1 200 nmol / L 的配体蛋白 His - PCSK9(D374Y)等体积混匀,置室温孵育 1 h。取孵育好的抗体,每孔 50  $\mu$ L 加入接种好靶细胞的 96 孔板中,轻柔吹打,混匀,置 37  $^{\circ}$ C 培养箱中孵育 6 h。同时设置阳性对照和阴性对照,每孔加入 25  $\mu$ L 质量浓度为 30  $\mu$ g / mL 的 BODIPY - LDL - C,继续孵育 22 h。轻弃上清液,每孔加入 200  $\mu$ L PBS,轻弃上清液,重复 3 次。每孔再加入 100  $\mu$ L PBS。用 SpectraMAX<sup>®</sup> i3 型酶标仪检测,以 488 nm 为激发光波长,以 540 nm 为发射光波长,读取荧光值,计算托莱西单抗和依洛尤单抗的 LDL 恢复率。结果托莱西单抗和依洛尤单抗与重组人 PCSK9(D374Y) 结合恢复 LDL - C 内吞作用的  $EC_{50}$  分别为  $(7.22 \pm 0.16) \mu$ g / mL 和  $(5.54 \pm 0.12) \mu$ g / mL,二者的作用效果相当。详见图 5。

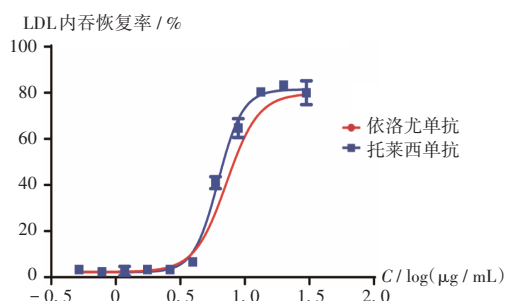


图 5 托莱西单抗和依洛尤单抗与重组人 PCSK9(D374Y) 结合恢复 LDL - C 内吞作用的  $EC_{50}$

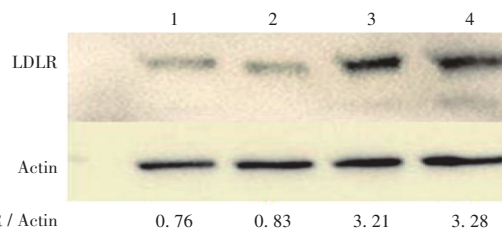
Fig. 5  $EC_{50}$  values of tacelesimab and evolocumab for restoring LDL - C endocytosis by binding recombinant human PCSK9(D374Y)

## 2.6 托莱西单抗阻断重组人 PCSK9(D374Y)与 LDLR 结合上调 LDLR 表达试验

采用免疫印迹(Western blot)法检测 HepG2 细胞中 LDLR 的表达水平,考察托莱西单抗阻断重组人 PCSK9(D374Y)结合 LDLR 及上调 LDLR 表达水平的作用。结果只加重重组人 PCSK9(D374Y)蛋白(0.75  $\mu$ g / mL)时,LDLR 蛋白表达的灰度值为 0.76;而随着共孵育托莱西单抗质量浓度(0,6,60,180  $\mu$ g / mL)的升高,灰度值逐渐增大,LDLR 蛋白表达量也逐渐增加,表明托莱西单抗浓度依赖性地上调 HepG2 细胞 LDLR 的表达。详见图 6。

## 3 讨论

抗体的亲和力是指抗体与抗原表位或抗原决定簇间的结合力,其大小可用平衡解离常数表示。平衡解



1 - 4. 0.75  $\mu$ g / mL 重组人 PCSK9(D374Y) + 托莱西单抗 (质量浓度分别为 0,6,60,180  $\mu$ g / mL)

图 6 Western blot 法检测 LDLR 蛋白表达水平

1 - 4. 0.75  $\mu$ g / mL recombinant human PCSK9(D374Y) + tacelesimab (mass concentrations of 0,6,60,180  $\mu$ g / mL, respectively)

Fig. 6 Expression levels of LDLR protein determined by the Western blot

离常数越小,表示抗体结合抗原的能力越强。高亲和力的抗体能更有效地结合靶标抗原,使其肿瘤靶向性得到增强,从而发挥更好的疗效<sup>[15-17]</sup>。同时,亲和力会影响抗体在体内的药物代谢动力学<sup>[18]</sup>,高亲和力的单克隆抗体可更有效地与靶点抗原结合,减缓单克隆抗体的清除,从而延长单克隆抗体在体内的循环时间<sup>[19-21]</sup>。

目前已上市的 PCSK9 单克隆抗体有托莱西单抗、依洛尤单抗和阿利西尤单抗,均可显著降低高胆固醇血症患者的 LDL - C 水平,对心血管疾病的预防和治疗有重要意义。鉴于此,本研究中首先通过 SPR 法和 BLI 法验证 3 种 PCSK9 单克隆抗体与重组人 PCSK9(D374Y)的亲和力,结果托莱西单抗与 PCSK9 的亲和力强于依洛尤单抗和阿利西尤单抗。这可能与产品的生产方式不同相关,托莱西单抗采用酵母展示库技术,依洛尤单抗和阿利西尤单抗采用转基因动物技术。转基因动物技术具有稳定性、无需人源化、体内亲和力成熟、克隆选择多样性等优点,但成本较高,且生产周期较长<sup>[22]</sup>。酵母展示库技术是利用流式细胞术进行筛选,免去了纯化步骤,使亲和力筛选过程更高效、便捷,且能实现高灵敏度的定量筛选,提高展示抗体的稳定性和抗原结合能力<sup>[22-23]</sup>。故利用酵母展示库技术筛选出的单抗亲和力一般高于转基因动物技术。

重组人 PCSK9(D374Y)突变体对 LDLR 的降解能力比野生型蛋白强 10 倍,更增加高胆固醇患者高胆固醇血症的风险<sup>[24]</sup>。本研究还在细胞水平上比较了托莱西单抗与依洛尤单抗增加肝细胞 LDLR 表达的能力,结果托莱西单抗阻断野生型 PCSK9 和重组人 PCSK9(D374Y)突变型与 LDL - R 的结合能力强于依洛尤单抗,且能浓度依赖性地增加肝细胞 LDLR 的表达,恢复肝细胞对 LDL - C 的内吞作用。作为首款、原研创新全人源 PCSK9 单克隆抗体,托莱西单抗得益于与 PCSK9 较高的亲和力,可显著降低中国非家族性高胆固醇血

症和杂合子家族性高胆固醇血症患者的LDL - C水平,其LDL - C的降幅较基线高68.9%<sup>[12-14]</sup>。此外,有I期临床试验显示,托莱西单抗降低LDL - C的持续时间比依洛尤单抗更长<sup>[25-27]</sup>,可能源于本研究观察到的亲和力差异。

综上所述,本研究首次通过体外试验对比了3种PCSK9单克隆抗体与PCSK9的亲和力,托莱西单抗与PCSK9的亲和力强于阿利西尤单抗和依洛尤单抗,能阻止LDLR的降解,从而浓度依赖性地增加肝细胞表面LDLR的表达,恢复肝细胞对LDL - C的内吞作用,在非家族性高胆固醇血症和杂合子家族性高胆固醇血症患者中具有应用价值。但未来还需进一步的动物实验和临床试验去验证3种PCSK9单克隆抗体的疗效差异。

#### 参考文献

- [1] MORAN A, GU D, ZHAO D, et al. Future cardiovascular disease in china: markov model and risk factor scenario projections from the coronary heart disease policy model - China [J]. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes*, 2010, 3(3): 243 - 252.
- [2] 《中国心血管健康与疾病报告 2020》编写组. 《中国心血管健康与疾病报告 2020》要点解读 [J]. *中国心血管杂志*, 2021, 26(3): 209 - 218.
- [3] 中国心血管健康与疾病报告编写组. 中国心血管健康与疾病报告 2019 概要 [J]. *中国循环杂志*, 2020, 35(9): 833 - 854.
- [4] 社区成人血脂管理中国专家共识撰写组. 社区成人血脂管理中国专家共识(2024年) [J]. *中华全科医师杂志*, 2024, 23(3): 220 - 228.
- [5] GAO F, ZHOU YJ, HU DY, et al. Contemporary management and attainment of cholesterol targets for patients with dyslipidemia in China [J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e47681.
- [6] HAN SN, YANG WH, YIN JJ, et al. Drug Treatment of Hyperlipidemia in Chinese Patients: Focus on the Use of Simvastatin and Ezetimibe Alone and in Combination [J]. *Am J Cardiovasc Drugs*, 2019, 19(3): 237 - 247.
- [7] DUFF CJ, SCOTT MJ, KIRBY IT, et al. Antibody - mediated disruption of the interaction between PCSK9 and the low - density lipoprotein receptor [J]. *Biochem J*, 2009, 419(3): 577 - 584.
- [8] LAMBERT G, CHARLTON F, RVE KA, et al. Molecular basis of PCSK9 function [J]. *Atherosclerosis*, 2009, 203(1): 1 - 7.
- [9] 王增武, 刘 静, 李建军, 等. 中国血脂管理指南(2023年) [J]. *中国循环杂志*, 2023, 38(3): 237 - 271.
- [10] O'DONOGHUE ML, GIUGLIANO RP, WIVIOTT SD, et al. Long - Term evolocumab in Patients with Established Atherosclerotic Cardiovascular Disease [J]. *Circulation*, 2022, 146(15): 1109 - 1119.
- [11] SCHWARTZ GG, STEG PG, SZAREK M, et al. Alirocumab and Cardiovascular Outcomes After Acute Coronary Syndrome [J]. *N Engl J Med*, 2018, 379(22): 2097 - 2107.
- [12] HUO Y, CHEN B, LIAN Q, et al. Tafolecimab in Chinese patients with non - familial hypercholesterolemia (CREDIT - 1): a 48 - week randomized, double - blind, placebo - controlled phase 3 trial [J]. *The Lancet Regional Health - Western Pacific*, 2023, 41: 100907.
- [13] CHAI M, HE Y, ZHAO W, et al. Efficacy and safety of tafolecimab in Chinese patients with heterozygous familial hypercholesterolemia: a randomized, double - blind, placebo - controlled phase 3 trial (CREDIT - 2) [J]. *BMC Medicine*, 2023, 21(1): 77.
- [14] QI L, LIU D, QU Y, et al. Tafolecimab in Chinese Patients with Hypercholesterolemia (CREDIT - 4) [J]. *JACC: Asia*, 2023, 3(4): 636 - 645.
- [15] ADAMS GP, SCHIER R, MCCALL AM, et al. High affinity restricts the localization and tumor penetration of single - chain fv antibody molecules [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(12): 4750 - 4755.
- [16] BREKKE OH, SANDLIE I. Therapeutic antibodies for human diseases at the dawn of the twenty - first century [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2003, 2(1): 52 - 62.
- [17] AHMED M, CHENG M, ZHAO Q, et al. Humanized Affinity - matured Monoclonal Antibody 8H9 Has Potent Antitumor Activity and Binds to FG Loop of Tumor Antigen B7 - H3 [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(50): 30018 - 30029.
- [18] LEIPOLD D, PRABHU S. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Considerations in the Design of Therapeutic Antibodies [J]. *Clin Transl Sci*, 2019, 12(2): 130 - 139.
- [19] OBER RJ, RADU CG, GHETIE V, et al. Differences in promiscuity for antibody - FcRn interactions across species: implications for therapeutic antibodies [J]. *Int Immunol*, 2001, 13(12): 1551 - 1559.
- [20] BREKKE OH, SANDLIE I. Therapeutic antibodies for human diseases at the dawn of the twenty - first century [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2003, 2(1): 52 - 62.
- [21] LOFGREN JA, DHANDAPANI S, PENNUCCI JJ, et al. Comparing ELISA and surface plasmon resonance for assessing clinical immunogenicity of panitumumab [J]. *J Immunol*, 2007, 178(11): 7467 - 7472.
- [22] 武荣飞, 杨 溢, 王鹏志, 等. 单克隆抗体制备技术最新研究进展 [J]. *中国预防兽医学报*, 2022, 44(3): 333 - 337.
- [23] 郭 波, 谢佩蓉, 邹 强, 等. 酵母表面展示系统研究进展 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2002, 29(1): 19 - 22.
- [24] 张 雪, 黄 雷, 阮进学, 等. PCSK9 基因 D374Y 突变体转基因猪的制备与分析 [J]. *中国农业科学*, 2017, 50(19): 3808 - 3816.
- [25] DIAS CS, SHAYWITZ AJ, WASSERMAN SM, et al. Effects of AMG 145 on low - density lipoprotein cholesterol levels: results from 2 randomized, double - blind, placebo - controlled, ascending - dose phase 1 studies in healthy volunteers and hypercholesterolemic subjects on statins [J]. *J Am Coll Cardiol*,