

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2015 年 2 月 19 日 (19.02.2015)



(10) 国际公布号
WO 2015/021871 A1

- (51) 国际专利分类号:
C07K 16/28 (2006.01) C12N 15/63 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01) A61P 3/10 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2014/083568
- (22) 国际申请日: 2014 年 8 月 1 日 (01.08.2014)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201310350640.0 2013 年 8 月 13 日 (13.08.2013) CN
- (71) 申请人: 杭州鸿运华宁生物医药工程有限公司 (GMAX BIOPHARM LLC.) [CN/CN]; 中国浙江省杭州市滨江区秋溢路 288 号东冠高新科技园二号楼三层 302 室, Zhejiang 310052 (CN)。
- (72) 发明人: 张成 (ZHANG, Cheng); 中国浙江省杭州市滨江区秋溢路 288 号东冠高新科技园二号楼三层 302 室, Zhejiang 310052 (CN)。 景书谦 (JING, Shuqian); 中国浙江省杭州市滨江区秋溢路 288 号东冠高新科技园二号楼三层 302 室, Zhejiang 310052 (CN)。 章华 (ZHANG, Hua); 中国浙江省杭州市滨江区秋溢路 288 号东冠高新科技

园二号楼三层 302 室, Zhejiang 310052 (CN)。 汪笑峰 (WANG, Xiaofeng); 中国浙江省杭州市滨江区秋溢路 288 号东冠高新科技园二号楼三层 302 室, Zhejiang 310052 (CN)。 药晨江 (YAO, Chenjiang); 中国浙江省杭州市滨江区秋溢路 288 号东冠高新科技园二号楼三层 302 室, Zhejiang 310052 (CN)。

(74) 代理人: 杭州杭诚专利事务所有限公司 (HANG-ZHOU HANGCHENG PATENT ATTORNEY OFFICE CO.,LTD); 中国浙江省杭州市西湖大道 35 号万新大厦 1 号楼 505 室, Zhejiang 310009 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

[见续页]

(54) Title: ANTIBODY SPECIFICALLY BINDING TO GLP-1R AND FUSION PROTEIN THEREOF WITH GLP-1

(54) 发明名称: 一种能与 GLP-1R 特异性结合的抗体及其与 GLP-1 的融合蛋白质

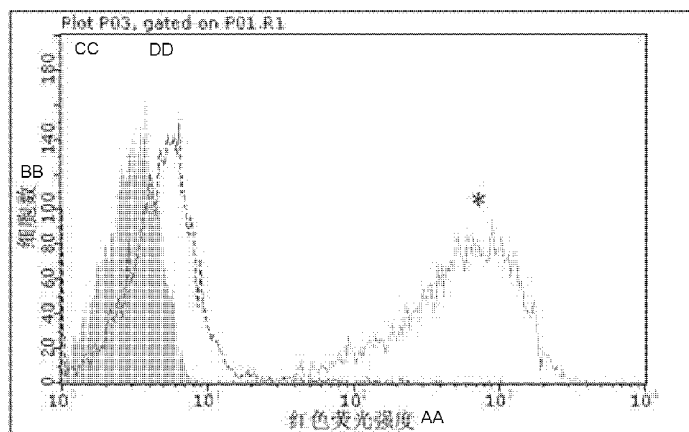


图 1 / Fig. 1

AA Red fluorescence intensity
BB Cell number
CC Plot P03
DD Gated on P01.R1

(57) Abstract: Disclosed in the present invention is an antibody specifically binding to GLP-1R and a fusion protein thereof with GLP-1. The fusion proteins can effectively bind to a human GLP-1R receptor and activate a receptor signalling channel, thus are useful for treating diabetes, excessive weight, obesity and related disorders thereof.

(57) 摘要: 本发明公开了一种能与 GLP-1R 特异性结合的抗体及其与 GLP-1 的融合蛋白。这些融合蛋白质可以高效地与人 GLP-1R 受体结合并激活受体信号通道, 可以被用于糖尿病, 超重, 肥胖, 及其相关病症的治疗。

WO 2015/021871 A1



(84) **指定国** (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG,

CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则 5.2(a))。

一种能与 GLP-1R 特异性结合的抗体及其与 GLP-1 的融合蛋白质

技术领域

本发明涉及抗体技术领域，特别涉及一种能与 GLP-1R 特异性结合的抗体及其与 GLP-1 的融合蛋白质。

背景技术

II 型糖尿病的典型症状包括以下三个方面：1) 外周胰岛素抵抗，主要是骨骼和肌肉对胰岛素的应激度下降，导致对这些组织的葡萄糖输出受到影响 (Kahn and Goldfine, *J Diabetes Complication* (1993) 7: 92-105; Weyer 等, *J Clin Invest.* (1999) 104:787-794); 2) 过度的肝脏葡萄糖生成，肝脏细胞对胰岛素的调节应激降低 (Kahn and Goldfine, *J Diabetes Complication.* (1993) 7: 92-105; Lam 等, *Am J Physiol Endocrinol Metab.* (2009) 11:375-378) 和胰高血糖素的过度分泌 (Unger and Orci, *Arch Intern Med.* (1977) 137:482-491); 3) 胰岛 beta 细胞失调，在疾病早期，beta 细胞的增殖和胰岛素分泌量增加代偿性弥补胰岛素抵抗对血糖的影响 (Bonner-Weir, *Trends Endocrinol Metab.* (2000) 11:375-378)，但随着时间和胰岛素抵抗程度的增加导致 beta 细胞耗竭，胰岛素分泌随之下降导致了 II 型糖尿病的真正始发 (DeFronzo, *Diabetes.* (1988) 37:667-687; Kahn 等, *J Nutr.* (2001) 131:354S-360S)。

胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 是一个包含有 30 个氨基酸的肽段。它由肠道内 L 细胞分泌来应激葡萄糖的摄入 (Orskov 等, *Diabetes* (1994) 43:535-539; Drucker 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1987) 84:3431-3438)。其应激分泌后，GLP-1 和胰腺上的 GLP-1R (胰高血糖素样肽-1 受体) 结合激活下游腺苷酸环化酶信号通路来促进胰岛素的合成与分泌。GLP-1 分泌还会减少胃排空，以此来减少食物消化后进入循环系统的葡萄糖的量 (Wettergren 等, *Dig. Dis. Sci.* (1993) 38: 665-673)。在小鼠以及 I 型和 II 型糖尿病患者中，GLP-1 增加了胰岛素的分泌降低血糖浓度 (Nauck 等, *Diabetes.* (1997) 105:187-195; Todd 等, *Eur J Clin Invest.* (1997) 27:533-536)。有研究显示，GLP-1 还能够抑制胰腺 beta 细胞的凋亡，促进其增殖 (Perfetti 等, *Endocrinology* (2000) 141:4600-4605; Hui 等, *Endocrinology* (2003) 144:1444-1455)。临床已经证实了 GLP-1 在治疗糖尿病病人上的可行性和效果 (Samson and Garber, *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* (2013) 20:87-97)，也已经有专利 (U.S Pat. No

5,899,883, U.S. Pat. No. 6,989,148) 叙述了使用 GLP-1 及其衍生物来治疗糖尿病的方法。但是 GLP-1 在体内半衰期较短, 治疗效果不佳。

发明内容

本发明的目的之一在于提供一种能与 GLP-1R 特异性结合的抗体。

本发明的目的之二在于提供一种能与 GLP-1R 特异性结合的抗体与 GLP-1 形成的融合蛋白质, 它能延长 GLP-1 的体内半衰期来保留 GLP-1 分子生物学活性。同时, GLP-1 和能与 GLP-1R 特异性结合的抗体形成的融合蛋白质具有由抗体提供的分子靶向性, 而且抗体的免疫源性也低于其他的融合蛋白质伙伴。

本发明解决其技术问题所采用的技术方案是:

一种能与 GLP-1R 特异性结合的抗体, 所述抗体包含以下方案之一的氨基酸序列:

a. 选自以下序列之一的轻链 CDR3 序列:

与选自 L1-L13 的轻链 CDR3 序列: SEQ ID NO: 46~SEQ ID NO: 53 其中之一相差总共不超过三个氨基酸添加、替换和 / 或缺失的轻链 CDR3 序列; 优选的与选自 L1-L13 的轻链 CDR3 序列: SEQ ID NO: 46~SEQ ID NO: 53 其中之一相差总共不超过两个氨基酸添加、替换和 / 或缺失的轻链 CDR3 序列; 更优选的与选自 L1-L13 的轻链 CDR3 序列: SEQ ID NO: 46~SEQ ID NO: 53 其中之一相差一个氨基酸添加、替换和 / 或缺失的轻链 CDR3 序列。

b. 选自以下序列之一的重链 CDR3 序列:

与选自 H1-H13 的重链 CDR3 序列: SEQ ID NO: 20~SEQ ID NO: 27 其中之一相差总共不超过四个氨基酸添加、替换和 / 或缺失的重链 CDR3 序列; 优选的与选自 H1-H13 的重链 CDR3 序列: SEQ ID NO: 20~SEQ ID NO: 27 其中之一相差总共不超过三个氨基酸添加、替换和 / 或缺失的重链 CDR3 序列; 进一步的与选自 H1-H13 的重链 CDR3 序列: SEQ ID NO: 20~SEQ ID NO: 27 其中之一相差总共不超过二个氨基酸添加、替换和 / 或缺失的重链 CDR3 序列; 更进一步的与选自 H1-H13 的重链 CDR3 序列: SEQ ID NO: 20~SEQ ID NO: 27 其中之一相差一个氨基酸添加、替换和 / 或缺失的重链 CDR3 序列。

c. (a) 的轻链 CDR3 序列和 (b) 的重链 CDR3 序列。

作为优选, 所述抗体还包含以下方案的一种或几种组合的氨基酸序列:

a. 选自以下之一的轻链 CDR1 序列:

与选自 L1-L13 的轻链 CDR1 序列: SEQ ID NO: 28~SEQ ID NO: 37 其中之一相差不超过三个氨基酸添加、替换和 / 或缺失的轻链 CDR1; 优选的与选自 L1-L13 的

轻链 CDR1 序列: SEQ ID NO: 28~SEQ ID NO:37 其中之一相差总共不超过两个氨基酸添加、替换和/或缺失的轻链 CDR1 序列;更优选的与选自 L1-L13 的轻链 CDR1 序列: SEQ ID NO: 28~SEQ ID NO:37 其中之一相差一个氨基酸添加、替换和/或缺失的轻链 CDR1 序列。

b. 选自以下之一的轻链 CDR2 序列:

与选自 L1-L13 的轻链 CDR2 序列: SEQ ID NO: 38~SEQ ID NO: 45 其中之一相差不超过两个氨基酸添加、替换和 / 或缺失的轻链 CDR2; 优选的与选自 L1-L13 的轻链 CDR2 序列: SEQ ID NO: 38~SEQ ID NO: 45 其中之一相差一个氨基酸添加、替换和/或缺失的轻链 CDR2 序列。

c. 选自以下之一的重链 CDR1 序列:

与选自 H1-H13 的重链 CDR1 序列: SEQ ID NO: 6~SEQ ID NO: 12 其中之一相差不超过两个氨基酸添加、替换和 / 或缺失的重链 CDR1; 优选的与选自 H1-H13 的重链 CDR1 序列: SEQ ID NO: 6~SEQ ID NO: 12 其中之一相差一个氨基酸添加、替换和/或缺失的轻链 CDR2 序列。

d. 选自以下之一的重链 CDR2:

与选自 H1-H13 的重链 CDR2 序列: SEQ ID NO: 13~SEQ ID NO: 19 其中之一相差不超过三个氨基酸添加、替换和 / 或缺失的重链序列。优选的与选自 H1-H13 的重链 CDR2 序列: SEQ ID NO: 13~SEQ ID NO: 19 其中之一相差总共不超过两个氨基酸添加、替换和/或缺失的轻链 CDR1 序列; 更优选的与选自 H1-H13 的重链 CDR2 序列: SEQ ID NO: 13~SEQ ID NO: 19 其中之一相差一个氨基酸添加、替换和/或缺失的轻链 CDR1 序列。

一种能与 GLP-1R 特异性结合的抗体, 所述抗体包含以下方案之一:

a. 包含以下方案的一种或几种的轻链可变结构域:

- i. 选自 SEQ ID NO: 28~SEQ ID NO: 37 其中之一轻链 CDR1 序列;
- ii. 选自 SEQ ID NO: 38~SEQ ID NO: 45 其中之一轻链 CDR2 序列;
- iii. 选自 SEQ ID NO: 46~SEQ ID NO: 53 其中之一轻链 CDR3 序列;

b. 包含以下方案的一种或几种的重链可变结构域:

- i. 选自 SEQ ID NO: 6~SEQ ID NO: 12 其中之一重链 CDR1 序列;
- ii. 选自 SEQ ID NO: 13~SEQ ID NO: 19 其中之一重链 CDR2 序列;

iii. 选自 SEQ ID NO: 20~SEQ ID NO: 27 其中之一的重链 CDR3 序列;

c. (a)的轻链可变结构域序列和(b)的重链可变结构域序列。

一种能与 GLP-1R 特异性结合的抗体,所述抗体包含以下方案之一的氨基酸序列:

a. 选自以下方案之一的轻链可变结构域序列:

i. 具有与选自 L1-L13 的轻链可变结构域序列: SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 105 其中之一至少 80%相同的序列的氨基酸;

ii. 与编码 L1-L13 的轻链可变结构域序列的多聚核苷酸序列: SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 104 其中之一至少 80%相同的多聚核苷酸序列编码的氨基酸序列;

b. 选自以下的重链可变结构域序列:

i. 与 H1-H13 的重链可变结构域序列: SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79 其中之一至少 80%相同的氨基酸序列;

ii. 与编码 H1-H13 的重链可变结构域序列的多聚核苷酸序列: SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 78 其中之一至少 80%相同的多聚核苷酸序列编码的氨基酸序列;

c. (a)的轻链可变结构域序列和(b)的重链可变结构域序列。

作为优选,所述抗体还包含以下方案之一的氨基酸序列:

a. 选自 L1-L13 的轻链可变结构域序列: SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 105 其中之一轻链可变结构域序列;

b. 选自 H1-H13 重链可变结构域序列: SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 57, SEQ ID

NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79 其中之一的重链可变结构域序列;

c. a 的轻链可变结构域序列和 b 的重链可变结构域序列。

作为优选, 方案 c 中 a 的轻链可变结构域序列与 b 的重链可变结构域序列的组合选自以下之一: L1H1、L2H2、L3H3、L4H4、L5H5、L6H6、L7H7、L8H8、L9H9、L10H10、L11H11、L12H12、L13H13。

作为优选, 所述抗体还包含以下方案之一的氨基酸序列:

- a. SEQ ID NO: 106 的轻链恒定区氨基酸序列;
- b. SEQ ID NO: 107 的轻链恒定区氨基酸序列;
- c. SEQ ID NO: 108 的重链恒定区氨基酸序列;
- d. SEQ ID NO: 109 的重链恒定区氨基酸序列;
- e. SEQ ID NO: 106 的轻链恒定区氨基酸序列和 SEQ ID NO: 108 的重链恒定区氨基酸序列;
- f. SEQ ID NO: 107 的轻链恒定区氨基酸序列和 SEQ ID NO: 108 的重链恒定区氨基酸序列;
- g. SEQ ID NO: 106 的轻链恒定区氨基酸序列和 SEQ ID NO: 109 的重链恒定区氨基酸序列;
- h. SEQ ID NO: 107 的轻链恒定区氨基酸序列和 SEQ ID NO: 109 的重链恒定区氨基酸序列。

作为优选, 所述抗体选自鼠源抗体、人类抗体、人源化抗体、嵌合抗体、单克隆抗体、多克隆抗体、重组抗体、抗原结合抗体片段、单链抗体、双链抗体、三链抗体、四链抗体、Fab 片段、F(fa')_x 片段、结构域抗体、IgD 抗体、IgE 抗体、IgM 抗体、IgG1 抗体、IgG2 抗体、IgG3 抗体、IgG4 抗体。

一种 GLP-1 融合蛋白质, 所述 GLP-1 融合蛋白质由 GLP-1 和本发明的抗体融合形成, 其中 GLP-1 包含选自以下之一的氨基酸序列: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 127。

作为优选, GLP-1 通过 N'-R1-L-R2-C'、N'-R2-L-R1-C' 或者 N'-R2-L-R1-C' 的连接方式与权利要求 1 或 3 或 4 所述抗体的轻链和/或重链相融合;

其中 L 为肽接头序列, 其包含全长的、部分的或者重复的选自 LK1~LK3 的氨基酸序列: SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 112 其中之一的氨

基酸序列；

R1 为 GLP-1 的氨基酸序列；

R1_r 为 GLP-1 的反向氨基酸序列；

R2 为权利要求 1 或 3 或 4 所述抗体轻链或者重链的氨基酸序列；

C' 代表 GLP-1 融合蛋白质多肽链的羟基残基端；

N' 代表 GLP-1 融合蛋白质多肽链的氨基残基端。

一种多核苷酸，其编码本发明的 GLP-1 融合蛋白质。

一种载体，其包含本发明的多核苷酸。

一种宿主细胞，其包含本发明的载体。

一种药用组合物，其包含与药用可接受载体混合的本发明的 GLP-1 融合蛋白质。

一种包含或基于本发明的抗体或者 GLP-1 融合蛋白质的药用组合物在制备用于预防或治疗非胰岛素依赖性糖尿病的药物中的用途。

考虑到 GLP-1R 在使用胰岛素样肽-1 调控 II 型糖尿病人的血糖浓度方法中的所承担的关键作用，并且其显著的治疗特征是其刺激胰岛素分泌而不伴有低血糖相关危险的能力。本发明将 GLP-1 与能与 GLP-1R 特异性结合的抗体相融合，延长 GLP-1 的体内半衰期来保留 GLP-1 分子生物学活性。同时，GLP-1 和能与 GLP-1R 特异性结合的抗体形成的融合蛋白质具有由抗体提供的分子靶向性，而且抗体的免疫源性也低于其他的融合蛋白质伙伴。

本发明的有益效果是：将 GLP-1 与能与 GLP-1R 特异性结合的抗体相融合，延长 GLP-1 的体内半衰期来保留 GLP-1 分子生物学活性。同时，GLP-1 和能与 GLP-1R 特异性结合的抗体形成的融合蛋白质具有由抗体提供的分子靶向性，而且抗体的免疫源性也低于其他的融合蛋白质伙伴。

发明详述

本发明针对 GLP-1 在体内被二肽基肽酶(DPP-IV)迅速清除而有效性不足的缺点用 GLP-1R 的抗体与其融合来增强其半衰期和生物学活性。所用于融合的抗体，具有不阻碍 GLP-1 与受体结合的前提下，特异性识别 GLP-1R 的生物学活性，本身与受体的高亲和力和稳定性能够长效地增加 GLP-1 在受体周围的局部浓度，从而大大增加其与受体结合的有效时间和效价。同时，与抗体的融合增加了 GLP-1 被 DPP-IV 识别或者捕获的空间位阻，减少了其在体内被清除的几率而增加了 GLP-1 的有效时长。据文献报道，GLP-1R 的 N 端胞外区和其跨膜区部分的咬合状态的释放是 GLP-1 得以进入与 GLP-1R 的结合位点，行使其生物活性的关键步骤。而本发明中所述的抗体与 GLP-1R 结合很大程度上涉及到受体的 N 端胞外区，其与受体的结合有助于上述咬合状态的释放，利于 GLP-1 的进入。所以，GLP-1 与针对 GLP-1R 的抗体融合后增加了自身的半衰期和亲和效价，有更强的

生物学活性，是更进一步优越于 GLP-1 疗法的一个重要创新。更重要的是，本发明所用的部分抗体本身具有在 GLP-1 存在的情况下，增强 GLP-1R 的 GLP-1 激活的生物学特性。因为以上的一些原因，本发明所述的 GLP-1 融合蛋白质是比 GLP-1 更有效的 GLP-1R 激活剂。

融合蛋白质长时期反复施用时的抗原性存在普遍的顾虑。对于 GLP-1 融合物疗法，这尤其是一个顾虑，因为糖尿病患者一旦经诊断为该疾病，必须一生接受治疗。此外，如果免疫球蛋白的 Fc 部分保留不需要的效应子功能，Fc 融合蛋白质疗法可能是一个顾虑。通过用电脑协助对免疫球蛋白的三维结构的预测以及抗体的序列的优化以及人源化，加上鉴定反复和长期施用后诱导免疫反应风险降低并且不再具有效应子功能的特定 GLP-1 融合蛋白质，本发明的中讨论的 GLP-1 部分的氨基酸优选通过富含甘氨酸和丝氨酸的肽接头与抗体的轻链和重链相融合。因为甘氨酸和丝氨酸带有较小的侧链，使肽接头序列具有相当的灵活性，减少了 GLP-1 和抗体之间相对位置的刚性，使 GLP-1 可以自由地与 GLP-1R 相互作用。同时，肽接头的存在隔离了 GLP-1 和抗体，避免了两者的结构域的相互作用。甘氨酸和丝氨酸交替出现避免过度重复向融合蛋白质中引入不必要的免疫源性，但是肽接头无可避免的增加融合蛋白质在体内的免疫原性，优选肽接头长度，平衡结构柔度和免疫源性很重要，所以，本发明提供了 3 个不同长度的肽接头用于融合。同时，本发明中提供了 GLP-1 与抗体用肽接头通过不同的连接的方式来形成融合，由此而形成的 GLP-1 融合蛋白质的形式包括：

- 1) 带有 GLP-1 与轻链通过 N' -R1-L-R2-C' 方式连接的融合蛋白质；
- 2) 带有 GLP-1 与轻链通过 N' -R2-L-R1-C' 方式连接的融合蛋白质；
- 3) 带有 GLP-1 与轻链通过 N' -R2-L-R1_r-C' 方式连接的融合蛋白质；
- 4) 带有 GLP-1 与重链通过 N' -R1-L-R2-C' 方式连接的融合蛋白质；
- 5) 同时带有 1) 和 4) 的融合蛋白质；
- 6) 同时带有 2) 和 4) 的融合蛋白质；
- 7) 同时带有 3) 和 4) 的融合蛋白质。

本发明中，编码 GLP-1 的 DNA 与所述抗体的全长/可变区/片段轻链或全长/可变区/全长重链 DNA 通过编码肽接头序列的 DNA 连接成融合轻链或融合重链

DNA，同时在轻链 DNA 的 5' 末端还将引入编码信号引导肽的 DNA 来形成基因，并可以此基因基础连接突变/野生型的 GLP-1 和抗体序列。本发明通过基因合成的方法得到 GLP-1 的序列，并通过 PCR 的方法将其与肽接头序列以及抗体轻链或重链 DNA 相连接。针对 GLP-1R 的抗体轻链或重链可变区序列由特定杂交瘤细胞中通过 PCR 方法调取，并与特定抗体亚型的恒定区 DNA 相连接组成得到。野生型抗体亚型的恒定区 DNA 可以通过从特定的文库克隆得到并作为序列优化的基础。在此所述的用于表达融合蛋白质的基因，通过克隆方式放入表达载体中用于融合蛋白质的产生和表达。在表达过程中，轻链和重链表达载体搭配后，用共转染或者转化的方式将带有其基因的 DNA 引入宿主细胞中，并用优化适应诱导启动子，选择转化子或者扩增编码所希望序列的基因的培养基在适宜的 pH，温度中培养。DNA 引入方式选用普遍使用的 CaPO_4 ，电穿孔和 PEI 等方式。

适于表达此处所述载体中核酸的合适宿主细胞包括高等真核细胞，哺乳动物宿主细胞系表达的实例包括了中国仓鼠卵巢细胞系 (CHO) 和人胚胎肾脏细胞 (HEK293 或者悬浮培养的 HEK293 细胞系)，位于轻链 N 末端的信号引导肽指导重组融合蛋白质的从哺乳动物宿主细胞系中的分泌。用于表达和克隆的载体上带有能够使载体在宿主细胞中不断复制的选择标记，用于筛选有能力吸收编码融合蛋白质的核酸的细胞并且带有与融合蛋白质编码序列有效连接并指导 mRNA 合成的启动子。其中一个实例是用带有抗生素抗性以及乙型肝炎病毒和猿病毒启动子 (SV40) 的载体优选稳定表达融合蛋白质的 CHO 宿主细胞。

本发明在宿主细胞系表达融合蛋白质后，用亲和层析的方法将其分泌在细胞培养上清中的部分纯化。本发明中的实例包括用蛋白 G 的亲和层析柱捕获融合有全长抗体的融合蛋白质，然后用低 pH 将其从层析柱料上洗脱后再收集。温和的洗脱条件有助于防止蛋白的变性。

可以用一种或多种赋形剂配制本发明的融合蛋白质。本发明的融合蛋白质可以与可药用的缓冲液、经调节提供可接受的稳定性的 pH、以及可施用 (例如胃肠外施用) 的 pH 组合。任选地，可以添加一种或多种可药用的抗微生物剂。间甲酚和苯酚是优选的可药用抗微生物剂。可以添加一种或多种可药用盐溶液以调节离子强度或张力。可以添加一种或多种赋形剂以进一步调节制剂的等渗性。甘油是等渗性调节赋形剂的实例。可药用意味着适于施用于人类或其他动物，因此不

含有毒性成分或不希望的污染物，并且不干扰其中活性化合物的活性。

可以以溶液制剂或能够用合适的稀释剂重构的冻干粉配制本发明的融合蛋白质。冻干剂型是其中融合蛋白质稳定的一种剂型，具有或不具有重构产品在预期的使用货架期内保持 pH 的缓冲能力。包含在此讨论的融合蛋白质的溶液在冻干前优选是等渗的，使之重构后能够形成等渗溶液。

本发明的融合蛋白质的可药用盐溶液形式在本发明范围内。常用于形成酸加成盐的酸为无机酸，例如盐酸、氢溴酸、氢碘酸、硫酸、磷酸等，以及有机酸，例如对甲苯磺酸、甲磺酸、草酸、对溴苯基一磺酸、碳酸、琥珀酸、柠檬酸、苯甲酸、乙酸等。优选的酸加成盐是与无机酸，例如盐酸和氢溴酸形成的盐。

碱加成盐包括从无机碱，例如铵、碱或碱土金属氢氧化物衍生的那些盐、碳酸盐、碳酸氢盐等。在制备本发明的盐溶液中有用的这类碱因此包括氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、碳酸钾等。

本发明的融合蛋白质具有生物学活性。生物学活性指该融合蛋白质在体内结合并激活 GLP-1R 并引起细胞应激反应。反应包括但是不限于提高胰岛素的分泌、胰高血糖素分泌的抑制，抑制食欲、体重减轻、诱导过饱、抑制凋亡、诱导胰腺 beta 细胞增殖及胰腺 beta 细胞分化。对有代表性的一些 GLP-1 融合蛋白质测试体外和体内活性。首先，步骤 4（图 1）提供了该融合蛋白质和 GLP-1R 相互作用的荧光检测数据。然后，步骤 5 提供了基于该融合蛋白质与人 GLP-1R 相互作用后将其活化的体外活性测定。在实验中使用过表达人类 GLP-1R 的 CHO 细胞。在这些细胞中，GLP-1R 的活化引起腺苷酸环化酶的活化，该酶的活化又诱导由 cAMP 应答元件 (CRE) 驱动的报告基因的表达。步骤 12 (图 2) 提供了其中报告基因为萤光素酶的数据。体外的实验数据共同表明融合蛋白质能够结合并活化 GLP-1R，并且在体外表现比 GLP-1-Gly8(7-37)OH 更有效。步骤 13（图 3）提供对禁食并腹腔注射本发明的融合蛋白质之一后 16h 的小鼠灌服葡萄糖后血糖的变化数据。步骤 13 小鼠中产生的数据则显示该融合蛋白质在体内具有活性，并且比天然 GLP-1 具有更长的半衰期。

可以通过具有普通技能的内科医生已知有效的任意途径施用这些融合蛋白质。外周肠胃外属于其中一种此类方法。医学文献中通常将肠胃外施用理解为通过消毒注射器或一些其他机械装置例如注射泵向机体注射剂型。外周肠胃外可以

包括静脉内、肌内、皮下和腹膜内施用途径。

本发明的融合蛋白质也可以进行经口、直肠、经鼻或下呼吸道途径施用，它们是非肠胃外途径。这些非肠胃外途径中，优选下呼吸道途径和经口途径。

本发明的融合蛋白质可以用于治疗多种疾病和病症。本发明的融合蛋白质首先通过作用于 GLP-1R 而发挥其生物学作用。因此可以用本发明的 GLP-1 融合蛋白质治疗会对 GLP-1R 刺激或对 GLP-1 化合物施用做有宜应答的疾病和/或病症的受试者。将这些受试者称为“需要 GLP-1 化合物治疗”或“需要 GLP-1R 刺激”的受试者。包括非胰岛素依赖性糖尿病、胰岛素依赖性糖尿病、中风(见 WO 00 / 16797)、心肌梗死(见 WO 98 / 08531)、肥胖(见 WO 98 / 19698)、手术后分解代谢改变(见美国专利号 6,006,753)、功能性消化不良和肠易激综合征(见 WO99 / 64060)。也包括要求以 GLP-1 化合物预防性治疗的受试者，例如具有发展为非胰岛素依赖性糖尿病危险的受试者(见 WO 00 / 07617)。糖耐量损伤或空腹葡萄糖损伤的受试者、体重对于受试者身高和体液高出正常体重约 25% 的受试者、部分胰切除的受试者、父母一方或双方具有非胰岛素疗的 GLP-1 融合蛋白质的“有效量”是与没有治疗相比引起对血糖浓度的更佳控制，从而导致糖尿病并发症(例如视网膜病、神经病或肾脏疾病)发作延迟的量。预防糖尿病的 GLP-1 融合蛋白质的“有效量”是与没有治疗相比延缓血糖水平升高的发作的量，所述发作需要以抗低血糖药物例如磺酰脲类、噻唑烷二酮、胰岛素和 / 或双胍类治疗。有效将患者血糖正常化的融合蛋白质的剂量取决于许多因素，其中包括但不限于受试者性别、体重和年龄、调节血糖无能的严重性、施用途径和生物利用率。融合蛋白质药物代谢动力学图谱、潜能和剂型。剂量可以为 0.01 至 1 mg / kg 体重，优选 0.05 至 0.5 mg / kg 体重。优选每周一次或二次施用本发明的融合蛋白质。取决于所治疗的疾病，可能有必要更频繁地施用该融合蛋白质，例如每周三次或更多次。

附图说明

图 1 是流式细胞术 (FACS) 检测重组表达的 GLP-1 融合蛋白质 (GLP-1 (A8G)-LK-L13H13) 与稳定表达人源 GLP-1R (hGLP-1R) 的中国仓鼠卵巢细胞株(标有*的实线峰) 以及中国仓鼠卵巢细胞株本身(虚线峰) 的特异性结合的对比。

图 2 是通过报告基因方法得到的 GLP-1 野生型 (圆形) 和 GLP-1 (A8G)-LK-L13H13 (三角形) 对稳定表达 hGLP-1R 的中国仓鼠卵巢细胞株的

激活曲线。

图 3 是小鼠 (ICR) 糖耐量实验, 检测 GLP-1 (A8G)-LK-L13H13 在 5 微克/只 (方形) 和 15 微克/只 (三角形) 单次 i. p. 注射 16h 后对禁食状态下的小鼠的糖耐量的影响。

图 4 是小鼠 (C57BL) 糖耐量实验, 检测 GLP-1 (A8G)-LK-L13H13 在 15 微克/只 (三角形) 单次 i. p 注射 40h 后对禁食状态下的小鼠的糖耐量的影响。

图 5 是二型糖尿病小鼠 (db/db Mice) 血糖浓度时间糖曲线, 检测 GLP-1 (A8G)-LK-L13H13 在 30 微克/千克的浓度下 (倒三角形) 对二型糖尿病小鼠进行单次 i. p. 注射后的小鼠血糖浓度变化的时间曲线。

图 6 是二型糖尿病小鼠 (db/db Mice) 日进食量时间曲线, 记录 GLP-1 (A8G)-LK-L13H13 在 30 微克/千克的浓度下 (倒三角形) 单次对二型糖尿病小鼠进行 i. p. 注射前 3 天到注射后 5 天这一时间段内小鼠日进食量的变化的时间曲线。图 6 和图 5 为平行进行的实验结果。

具体实施方式

下面通过具体实施例, 并结合附图, 对本发明的技术方案作进一步的具体说明。

本发明中, 若非特指, 所采用的原料和设备等均可从市场购得或是本领域常用的。下述实施例中的方法, 如无特别说明, 均为本领域的常规方法。

步骤 1: 免疫用抗原细胞稳定株的构建

接种 CHO-DHFR 细胞至 6 孔板中, 培养 24h 后转染含 hGLP-1R 基因 (核苷酸序列见 SEQ ID NO: 113, 氨基酸序列见 SEQ ID NO: 114) 的 pYS 质粒于 6 孔板中的细胞, 转染前更换培养液, 按照 Invitrogen 公司推荐 Lipofectamine 2000 的转染条件进行转染。48h 后, 再换为含有 10 nM MTX 的完全培养基, 每隔 3 天换液, 待两周左右, 出现稳定生长的克隆, 消化分散细胞集落, 待长至 50% 愈合度时, 逐渐提高 MTX 的浓度进行加压筛选, 直至 MTX 的浓度为 10 μ M。构建的稳定细胞株分别进行 FACS 检测, 利用抗 hGLP-1R 的抗体 (Abcam) 鉴定加压后的细胞群体, 10 μ M MTX 筛选后的 CHO-DHFR-hGLP-1R 细胞膜上 hGLP-1R 有大量表达, 最后经过亚克隆、鉴定获得 6 株 hGLP-1R 高表达细胞稳定株。

步骤 2: 抗体的制备

将在弗氏佐剂中乳化的 CHO-DHFR-hGLP-1R 全细胞, 以 2×10^6 细胞/只的剂量皮下注射 BALB/c 小鼠 (6-8 周龄)。2 周后, 使用不完全弗氏佐剂乳化免疫原, 加强免疫小鼠, 此后每周加强一次。通过剪尾的方式采血, 离心分离血清, 进行 FACS 检测血清效价。直至达到适合抗体滴度时, 断颈处死小鼠, 无菌状态下获

取脾脏细胞。收集生长状态处于对数生长期的 SP2/0 细胞，2000 rpm，3min 离心，沉淀用无血清培养至重悬，再次离心-重悬，计数。混合脾脏细胞和 SP2/0 细胞，保证 SP2/0 : 脾脏细胞 $\geq 1:1$ ，共“洗涤-离心”3 次。弹散最后一次离心后的沉淀，逐滴加入 1mL 预温至 37℃的 PEG-1350(30s 内滴完)，上下吹吸 1min，缓慢加入 30mL 预热至 37℃的无血清培养基 (Invitrogen) 以终止 PEG 的融合作用，1500rpm，5min 离心，弹散细胞沉淀，加入添加有 HAT (次黄嘌呤、氨甲喋呤和胸苷; Invitrogen)，20% FBS (Bioind) 的 RPMI1640 (Invitrogen) 作为融合培养基，按每孔 20000 个脾细胞及 5000 个饲养层细胞铺于 96 孔板中，每孔 100 μ l。融合后的杂交瘤细胞和饲养层细胞一起在 96 孔板中进行培养，并进行 HAT 筛选，以除去非融合的细胞。10 天后收取培养板中的杂交瘤细胞上清进行 ELISA 检测。

步骤 3: 全细胞 ELISA 筛选

将 CHO-DHFR-hGLP-1R 过表达 hGLP-1R 的细胞和不表达 hGLP-1R 的 CHO-DHFR-空白细胞分别接种至 96 孔板，长至 90%愈合度。除去细胞培养上清，PBS 洗两遍，加入 100 μ l 100%甲醇 4℃固定 10min。再加入 100 μ l 新鲜配制的 0.6% H_2O_2 -PBS，室温处理 20min，PBS 洗涤 2 遍。经过 PBS-1%BSA 封闭后，加入杂交瘤细胞上清 4℃孵育 90 min。多次洗涤后，每孔加入 5000 倍稀释的 GxM-HRP-Fc 二抗 (Sigma-Aldrich) 100 μ l，37℃孵育 0.5h。洗涤 5 次后，每孔加入 100 μ l TMB 显色底物，37℃反应 15min，2M H_2SO_4 终止，读取 OD450 值。阳性对照为免疫小鼠的血清；阴性对照为细胞培养基上清。选取分泌抗 hGLP-1R 抗体的杂交瘤株，进行克隆化以获得能稳定分泌针对 hGLP-1R 的细胞株。最后选取杂交瘤细胞分泌的抗体上清进行 FACS 验证。

步骤 4: 阳性杂交瘤细胞上清流式分析鉴定 (FACS)

用含 10mM EDTA 的 PBS 消化、收集 10^5 个 CHO-DHFR-hGLP-1R 细胞，分别加入 1.5ml EP 管，离心后弃上清，阴性对照样本用流式上样缓冲液 (PBS，2% FBS) 重悬。阳性处理组细胞每管加 200 μ l 抗体上清，室温孵育；1500rpm 离心，弃上清，用流式上样缓冲液洗一次，再离心，重悬，每孔加入 1:50 稀释的 FITC 标记的羊抗鼠荧光抗体 (BD Pharmingen) 200 μ l，室温避光孵育 30 min；离心，弃上清，再用流式上样缓冲液洗一次，离心，最后用流式上样缓冲液重悬，

上机检测。杂交瘤细胞上清和表达有 hGLP-1R 的 CHO-DHFR 细胞有特异性结合，灰色峰和虚线峰为阴性对照，杂交瘤细胞上清对应的实线峰（带有*标记）有明显右移（图 1）。

步骤 5：抗体基因的克隆及亚克隆

收集分泌抗体的杂交瘤细胞，按照 QIAGEN 的 mRNA 抽提试剂盒操作规程，提取杂交瘤细胞的 mRNA。然后将提取后的 mRNA 反转录成 cDNA，逆转录引物为小鼠轻、重链恒定区的特异性引物，重链逆转录引物为（5' -TTTGGRGGGAAGATGAAGAC-3'）（SEQ ID NO: 115），轻链逆转录引物为（5' -TTAACACTCTCCCCTGTTGAA-3'）（SEQ ID NO: 116）和（5' -TTAACACTCATTCCTGTTGAA-3'）（SEQ ID NO: 117）。RT-PCR 的反应条件为：25℃ 5min；50℃ 60min；70℃ 15min。将反转录的 cDNA 用 0.1mM 的 TE 稀释至 500 μl，加入到超滤离心管（Amicon Ultra-0.5）中，2000g 离心 10min；弃滤液，再加 500 μl 的 0.1mM 的 TE，2000g 离心 10min；弃滤液，将制备管倒置到新的离心管中，2000g 离心 10min，得到纯化后的 cDNA；取 10 μl 的纯化后的 cDNA 作为模板，加入 4 μl 的 5x 的 tailing buffer，4 μl 的 dATP（1mM）和 10U 的末端转移酶（Promega）后混匀，37℃ 孵育 5min 后 65℃ 5min；然后以加上 PolyA 尾的 cDNA 为模板，PCR 扩增抗体的轻、重链可变区基因。上游引物均为 OligodT，重链下游引物为（5' -TGGACAGGGATCCAGAGTTCC-3'）（SEQ ID NO: 118）和（5' -TGGACAGGGCTCCATAGTTCC-3'）（SEQ ID NO: 119），轻链下游引物为（5' -ACTCGTCCTTGGTCAACGTG-3'）（SEQ ID NO: 120）。PCR 反应条件：95℃ 5min；95℃ 30s，56℃ 30s，72℃ 1min 40cycles；72℃ 7min；PCR 产物连接到 PMD 18-T 载体后进行测序。测序得到的抗体轻链和重链可变区序列见附录序列表。

基于已测序得到的抗体的 DNA 序列设计 PCR 引物，从而将完整轻链、重链信号肽和可变域以及小鼠 IgG1 恒定区与表达载体 pTM5 相连。

步骤 6：在悬浮 HEK293 宿主细胞系中瞬时表达抗 GLP-1R 的抗体

接种悬浮 HEK293 或者 CHO 表达细胞系至转瓶中，经过 24h 37℃ 旋转培养后被用于转染。转染过程中使用 Polyethylenimine (PEI) 作为转染介质，将其与 DNA 混合后加入到细胞培养中。PEI 和 DNA 的混合优选配比为 1:1 至 5:1。细胞在接受 PEI 与 DNA 混合物后继续 37℃ 旋转培养 96h 以上以表达抗原结合蛋白，

其间向细胞培养中加入 0.5%的胰蛋白胨作为表达需要的氨基酸源，最后收集细胞上清用于抗原结合蛋白质的纯化分离。

步骤 7：抗体人源化及优化

首先，将筛选所得的鼠源抗体轻、重链可变区序列，并使用 NCBI 的在线抗体可变区序列比对工具 Ig Blast，搜索与输入的抗体可变区序列同源的人源的抗体生殖细胞系基因序列 (Ig Germline Gene sequence)，并将除 CDR 序列外，同源性最高的人源基因序列做为模板序列进行 CDR 嫁接，得到人源化抗体可变区序列，并外包合成人源化抗体轻、重链的基因。根据序列设计 PCR 引物，在合成序列的 5' 端和 3' 端引入合适的限制性内切酶位点，并通过 PCR 扩增后将其与人 IgG2 或者 IgG4 恒定区序列拼接后得到完整的重组人源化抗体序列。重组的抗体根据步骤 6 进行表达，并按照步骤 4 中的 FACS 技术验证其针对 GLP-1R 的亲合力。在保留了针对 GLP-1R 亲合力的人源化抗体群中，遴选出亲合力表现最优秀的抗体，并通过定点突变，对其可变区序列进行进一步的改造，更进一步提高其针对 GLP-1R 的亲合力。

步骤 8：GLP-1 人源化融合蛋白质的基因克隆与亚克隆

优化后的人源化抗体在轻链的 N 端或者 C 端与 GLP-1 及其衍生物序列进行融合组成 GLP-1 融合蛋白质，两者的序列由肽接头序列(LK)做为桥梁进行连接。信号肽-GLP-1-肽接头的核苷酸序列由金斯瑞生物科技有限公司合成，以合成基因为模板，PCR 扩增“信号肽-GLP1-接头”部分的序列，PCR 上游引物为 (5' -CCACCATGGACTTTGGGCTGAGC-3') (SEQ ID NO:121)，PCR 下游引物为 (5' -AGAGCCGGTGGCAGAGCCAG-3') (SEQ ID NO:122)，PCR 反应条件为：95℃ 5min; 95℃ 30s, 56℃ 30s, 72℃ 30s 35cycles; 72℃ 7min。另以人源化抗体的核苷酸序列为模板，扩增融合蛋白质的抗体部分的序列。

PCR 上游引物为 (5' -CTGGCTCTGCCACCGGCTCTGCCATCCAGATGACCCAGTCTCC-3') (SEQ ID NO:123)，PCR 下游引物为 (5' -ACACTCTCCCCTGTTGAAGCTC-3') (SEQ ID NO:124)，PCR 反应条件为：95℃ 5min; 95℃ 30s, 56℃ 30s, 72℃ 1min 35cycles; 72℃ 7min。然后通过 overlapping PCR 将融合蛋白质核酸序列的“信号肽-GLP-1-肽接头”部分与抗体部分连接，引物两端添加 NheI 和 NotI 的酶切位点，从而将完整的融合蛋白质序列与表达载体 pTM5 相连。overlapping PCR 上游引物为 (5' -CCGGCTAGCCACCATGGACTTTGGGCTGAGC-3') (SEQ ID NO:125)，下游引物为 (5' -AGTGGCGCCGCTCAACTCTCCCTGTTGAAGCTC-3') (SEQ ID NO: 126)。PCR 反应条件:95℃ 5min ;95℃ 30s,56℃ 30s,72℃ 1min 35cycles;72℃ 7min; PCR 产物连接到 PTM5 载体后进行测序。

步骤 9：在悬浮 HEK293 宿主细胞系中瞬时表达 GLP-1 融合蛋白质。

接种 HEK293 悬浮细胞至转瓶中，在转染前换培养基。将包含融合蛋白质轻/重链基因的载体以 DNA 总量 0.5-1.5 μg/ml 的浓度与 1.5-7.5 μg/ml 的 Polyethylenimine (PEI)混合静置 15-25 分钟后，加入细胞培养中。24 小时后，再向细胞培养加入 0.5-1%的 Trypton N1。培养 5-10 天后收取的上清中含有分泌表达的 GLP-1 融合蛋白质。

步骤 10: 在悬浮 CHO 宿主细胞系中稳定表达 GLP-1 融合蛋白质。

接种悬浮 CHO 细胞至 6 孔板中, 通过步骤 1 中的转染条件转染融合蛋白质的表达载体。48 小时后, 加入 300mg/ml 的 hygromycin (重链) 和 6mg/ml 的 puromycin (轻链) 进行联合筛选。在细胞出现大量凋亡后 (死亡率 > 90%), 逐步降低抗生素浓度恢复剩余细胞的生长, 后转为转瓶扩大培养, 并随后确认上清中抗体的表达。在随后的培养基中保持减半的抗生素浓度以维持细胞对 GLP-1 融合蛋白质的稳定表达。

步骤 11: GLP-1 融合蛋白质从细胞培养上清中的纯化和制备

将细胞培养离心去除其中细胞, 其上清经过偶联蛋白 G 配基的亲和层析柱后, 用 pH2.5-3.5 的洗脱液将表达的 GLP-1 融合蛋白质从层析柱上洗脱。洗脱管中预置中和缓冲液及时中和洗脱液的低 pH 值。洗脱后收集的蛋白质溶液对 PBS 透析。

步骤 12: 报告基因实验检测 GLP-1 融合蛋白质在体外激活 GLP-1 受体的功能 (见图 2)。

以每孔 20000 个接种共表达 hGLP1R-CRE-Luciferase 的 CHO-DHFR-细胞至 96 孔细胞培养板, 37°C 培养过夜。第二天除去培养基上清, 用无血清培养基清洗细胞表面两次, 吸去残液, 再加入 100 μ l 用无血清培养基稀释纯化抗体或 GLP-1, 37°C 孵育 4 小时。刺激结束后, 加入 100 μ l Promega 的 Bright Glo 化学发光底物, 最后将细胞裂解物转移至白色 96 孔板, 在 Molecular Devices 的 SpectraMax L 酶标仪上读取相对发光强度。

步骤 13: 小鼠 (ICR) 禁食状态下葡萄糖耐量实验。

测定小鼠静脉中葡萄糖耐量测定中评价本专利的 GLP-1 融合蛋白质 (优选抗体 GLP-1 (A8G)-LK-L13H13)) 的效果。四组中每组包含至少三至五只小鼠。I 组接受同体积 PBS 对照腹腔注射。II 组接受 15 μ g/只的单次腹腔注射。III 组接受 5 μ g/只的单次腹腔注射。在注射后, 小鼠进行 6-16 h 的禁食处理, 禁食完成后去小鼠血液样本测定其基础血糖浓度值。然后接受 1.5g/kg 浓度的葡萄糖灌胃。在葡萄糖灌胃后 15, 30, 60 和 90 分钟采集其血液样本以测定血糖浓度, 见图 3。

步骤 14: 糖耐量实验检测 GLP-1 融合蛋白质在小鼠 (C57BL) 体内长效性

(40h)。

测定小鼠静脉中葡萄糖耐量测定中评价本专利的 GLP-1 融合蛋白质(优选抗体 GLP-1 (A8G)-LK-L13H13))在小鼠体内的长效性。两组中包含至少三至五只小鼠。I 组接受同体积 PBS 对照腹腔注射。II 组接受 15 μ g/只浓度的单次腹腔注射。在注射后 24 h, 小鼠进行 16 h 的禁食处理, 禁食完成后取小鼠血液样本测定其基础血糖浓度值。然后接受 1.5g/kg 浓度的葡萄糖灌胃。在葡萄糖灌胃后 15, 30, 60 和 90 分钟采集其血液样本以测定血糖浓度, 见图 4。

步骤 15: GLP-1 融合蛋白质降低二型糖尿病小鼠 (db/db Mice) 血糖浓度的长效性研究 (72 h)。

在不同时间点测定二型糖尿病小鼠血糖浓度以评价本专利的 GLP-1 融合蛋白质(优选抗体 GLP-1 (A8G)-LK-L13H13))在二型糖尿病小鼠体内降低其血糖浓度的长效性。两组中每组包含至少六只小鼠。在注射开始前取小鼠血液样本测定其基础血糖浓度值。之后, I 组接受同体积 PBS 对照腹腔注射, II 组接受 30 μ g/千克浓度的单次腹腔注射。在注射后 1, 4, 6, 24, 48, 72 小时分别采集其血液样本以测定两组小鼠血糖浓度, 见图 5。

步骤 16: GLP-1 融合蛋白质减少二型糖尿病小鼠 (db/db Mice) 日进食量的长效性研究 (120h)。

在对二型糖尿病小鼠日进食量改变的测定中评价本专利的 GLP-1 融合蛋白质(优选抗体 GLP-1 (A8G)-LK-L13H13))在降低二型糖尿病小鼠进食水平方面的长效性。该步骤和步骤 15 在同一批小鼠上同步进行。两组中每组包含至少六只小鼠。在步骤 15 的注射前 3 天起至注射后 5 天 (120 小时), 每日早晨同一时间点称量每组小鼠日进食量, 见图 6。

以上所述的实施例只是本发明的一种较佳的方案, 并非对本发明作任何形式上的限制, 在不超出权利要求所记载的技术方案的前提下还有其它的变体及改型。

权 利 要 求

1. 一种能与 GLP-1R 特异性结合的抗体，其特征在于：所述抗体包含以下方案之一的氨基酸序列：

a. 选自以下序列之一的轻链 CDR3 序列：

与选自 L1-L13 的轻链 CDR3 序列：SEQ ID NO: 46~SEQ ID NO: 53 其中之一相差总共不超过三个氨基酸添加、替换和 / 或缺失的轻链 CDR3 序列；

b. 选自以下序列之一的重链 CDR3 序列：

与选自 H1-H13 的重链 CDR3 序列：SEQ ID NO: 20~SEQ ID NO: 27 其中之一相差总共不超过四个氨基酸添加、替换和 / 或缺失的重链 CDR3 序列；

c. (a) 的轻链 CDR3 序列和 (b) 的重链 CDR3 序列。

2. 根据权利要求 1 所述的一种能与 GLP-1R 特异性结合的抗体，其特征在于：所述抗体还包含以下方案的一种或几种组合的氨基酸序列：

a. 选自以下之一的轻链 CDR1 序列：

与选自 L1-L13 的轻链 CDR1 序列：SEQ ID NO: 28~SEQ ID NO: 37 其中之一相差不超过三个氨基酸添加、替换和 / 或缺失的轻链 CDR1；

b. 选自以下之一的轻链 CDR2 序列：

与选自 L1-L13 的轻链 CDR2 序列：SEQ ID NO: 38~SEQ ID NO: 45 其中之一相差不超过两个氨基酸添加、替换和 / 或缺失的轻链 CDR2；

c. 选自以下之一的重链 CDR1 序列：

与选自 H1-H13 的重链 CDR1 序列：SEQ ID NO: 6~SEQ ID NO: 12 其中之一相差不超过两个氨基酸添加、替换和 / 或缺失的重链 CDR1；

d. 选自以下之一的重链 CDR2 序列：

与选自 H1-H13 的重链 CDR2 序列：SEQ ID NO: 13~SEQ ID NO: 19 其中之一相差不超过三个氨基酸添加、替换和 / 或缺失的重链序列。

3. 一种能与 GLP-1R 特异性结合的抗体，其特征在于：所述抗体包含以下方案之一：

a. 包含以下方案的一种或几种的轻链可变结构域：

i. 选自 SEQ ID NO: 28~SEQ ID NO: 37 其中之一的轻链 CDR1 序列；

ii. 选自 SEQ ID NO: 38~SEQ ID NO: 45 其中之一的轻链 CDR2 序列；

iii. 选自 SEQ ID NO: 46~SEQ ID NO: 53 其中之一的轻链 CDR3 序列；

- b. 包含以下方案的一种或几种的重链可变结构域：
 - i. 选自 SEQ ID NO: 6~SEQ ID NO: 12 其中之一的重链 CDR1 序列；
 - ii. 选自 SEQ ID NO: 13~SEQ ID NO: 19 其中之一的重链 CDR2 序列；
 - iii. 选自 SEQ ID NO: 20~SEQ ID NO: 27 其中之一的重链 CDR3 序列；
 - c. (a)的轻链可变结构域序列和(b)的重链可变结构域序列。
4. 一种能与 GLP-1R 特异性结合的抗体，其特征在于：所述抗体包含以下方案之一的氨基酸序列：
- a. 选自以下方案之一的轻链可变结构域序列：
 - i. 具有与选自 L1-L13 的轻链可变结构域序列：SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 105 其中之一至少 80%相同的序列的氨基酸；
 - ii. 与编码 L1-L13 的轻链可变结构域序列的多聚核苷酸序列：SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 104 其中之一至少 80%相同的多聚核苷酸序列编码的氨基酸序列；
 - b. 选自以下的重链可变结构域序列：
 - i. 与 H1-H13 的重链可变结构域序列：SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79 其中之一至少 80%相同的氨基酸序列；
 - ii. 与编码 H1-H13 的重链可变结构域序列的多聚核苷酸序列：SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 78 其中之一至少 80%相同的多聚核苷酸序列编码的氨基酸序列；
 - c. (a)的轻链可变结构域序列和(b)的重链可变结构域序列。
5. 根据权利要求 4 所述的一种能与 GLP-1R 特异性结合的抗体，其特征在于：所

述抗体还包含以下方案之一的氨基酸序列：

a. 选自 L1-L13 的轻链可变结构域序列：SEQ ID NO：81，SEQ ID NO：83，SEQ ID NO：85，SEQ ID NO：87，SEQ ID NO：89，SEQ ID NO：91，SEQ ID NO：93，SEQ ID NO：95，SEQ ID NO：97，SEQ ID NO：99，SEQ ID NO：101，SEQ ID NO：103，SEQ ID NO：105 其中之一的轻链可变结构域序列；

b. 选自 H1-H13 重链可变结构域序列：SEQ ID NO：55，SEQ ID NO：57，SEQ ID NO：59，SEQ ID NO：61，SEQ ID NO：63，SEQ ID NO：65，SEQ ID NO：67，SEQ ID NO：69，SEQ ID NO：71，SEQ ID NO：73，SEQ ID NO：75，SEQ ID NO：77，SEQ ID NO：79 其中之一的重链可变结构域序列；

c. a 的轻链可变结构域序列和 b 的重链可变结构域序列。

6. 根据权利要求 5 所述的一种能与 GLP-1R 特异性结合的抗体，其特征在于：方案 c 中 a 的轻链可变结构域序列与 b 的重链可变结构域序列的组合选自以下之一：L1H1、L2H2、L3H3、L4H4、L5H5、L6H6、L7H7、L8H8、L9H9、L10H10、L11H11、L12H12、L13H13。

7. 根据权利要求 6 所述的一种能与 GLP-1R 特异性结合的抗体，其特征在于：所述抗体还包含以下方案之一的氨基酸序列：

a. SEQ ID NO：106 的轻链恒定区氨基酸序列；

b. SEQ ID NO：107 的轻链恒定区氨基酸序列；

c. SEQ ID NO：108 的重链恒定区氨基酸序列；

d. SEQ ID NO：109 的重链恒定区氨基酸序列；

e. SEQ ID NO：106 的轻链恒定区氨基酸序列和 SEQ ID NO：108 的重链区氨基酸恒定序列；

f. SEQ ID NO：107 的轻链恒定区氨基酸序列和 SEQ ID NO：108 的重链恒定区氨基酸序列；

g. SEQ ID NO：106 的轻链恒定区氨基酸序列和 SEQ ID NO：109 的重链恒定区氨基酸序列；

h. SEQ ID NO：107 的轻链恒定区氨基酸序列和 SEQ ID NO：109 的重链恒定区氨基酸序列。

8. 根据权利要求 1 或 3 或 4 所述的一种能与 GLP-1R 特异性结合的抗体，其特征

在于：所述抗体选自鼠源抗体、人类抗体、人源化抗体、嵌合抗体、单克隆抗体、多克隆抗体、重组抗体、抗原结合抗体片段、单链抗体、双链抗体、三链抗体、四链抗体、Fab 片段、F(fa')_x 片段、结构域抗体、IgD 抗体、IgE 抗体、IgM 抗体、IgG1 抗体、IgG2 抗体、IgG3 抗体、IgG4 抗体。

9. 一种 GLP-1 融合蛋白质，其特征在于：所述 GLP-1 融合蛋白质由 GLP-1 和权利要求 1 或 3 或 4 所述抗体融合形成，其中 GLP-1 包含选自以下之一的氨基酸序列：SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO:127。

10. 根据权利要求 9 所述的 GLP-1 融合蛋白质，其特征在于：GLP-1 通过 N' -R1-L-R2-C'、N' -R2-L-R1-C' 或者 N' -R2-L-R1_r-C' 的连接方式与权利要求 1 或 3 或 4 所述抗体的轻链和/或重链相融合；

其中 L 为肽接头序列，其包含全长的、部分的或者重复的选自 LK1~LK3 的氨基酸序列：SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 112 其中之一的氨基酸序列；

R1 为 GLP-1 的氨基酸序列；

R1_r 为 GLP-1 的反向氨基酸序列；

R2 为权利要求 1 或 3 或 4 所述抗体轻链或者重链的氨基酸序列；

C' 代表 GLP-1 融合蛋白质多肽链的羟基残基端；

N' 代表 GLP-1 融合蛋白质多肽链的氨基残基端。

11. 一种多核苷酸，其特征在于：其编码权利要求 9 的 GLP-1 融合蛋白质。

12. 一种载体，其特征在于：其包含权利要求 11 的多核苷酸。

13. 一种宿主细胞，其特征在于：其包含权利要求 12 的载体。

14. 一种药用组合物，其特征在于：其包含与药用可接受载体混合的权利要求 9 的 GLP-1 融合蛋白质。

15. 一种权利要求 14 的药用组合物在制备用于预防或治疗非胰岛素依赖性糖尿病的药物中的用途。

说明书附图

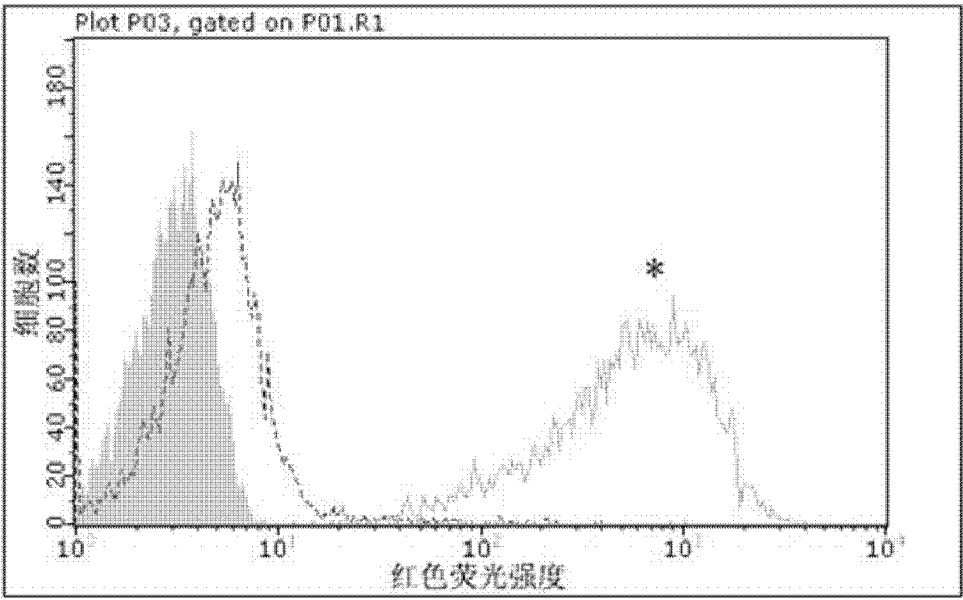


图 1

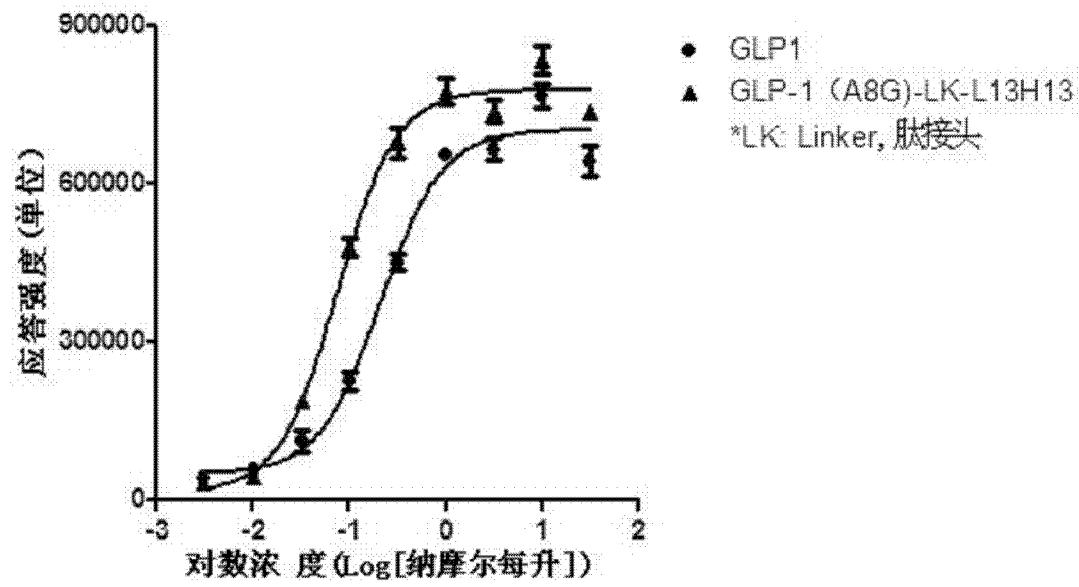


图 2

说明书附图

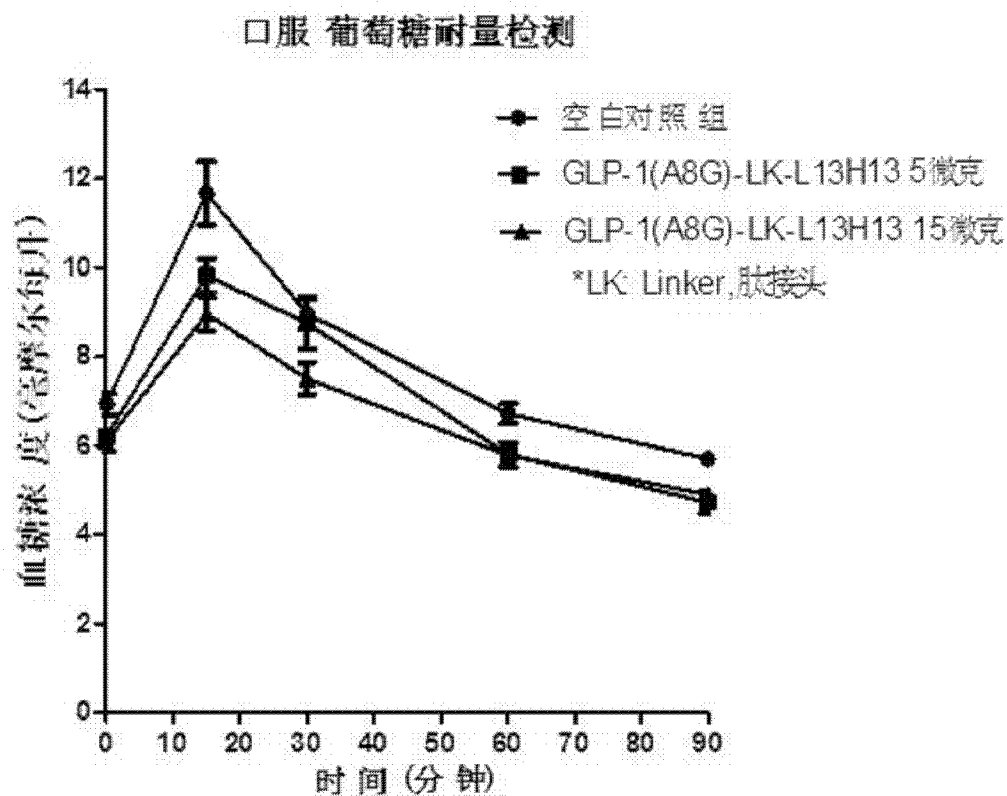


图 3

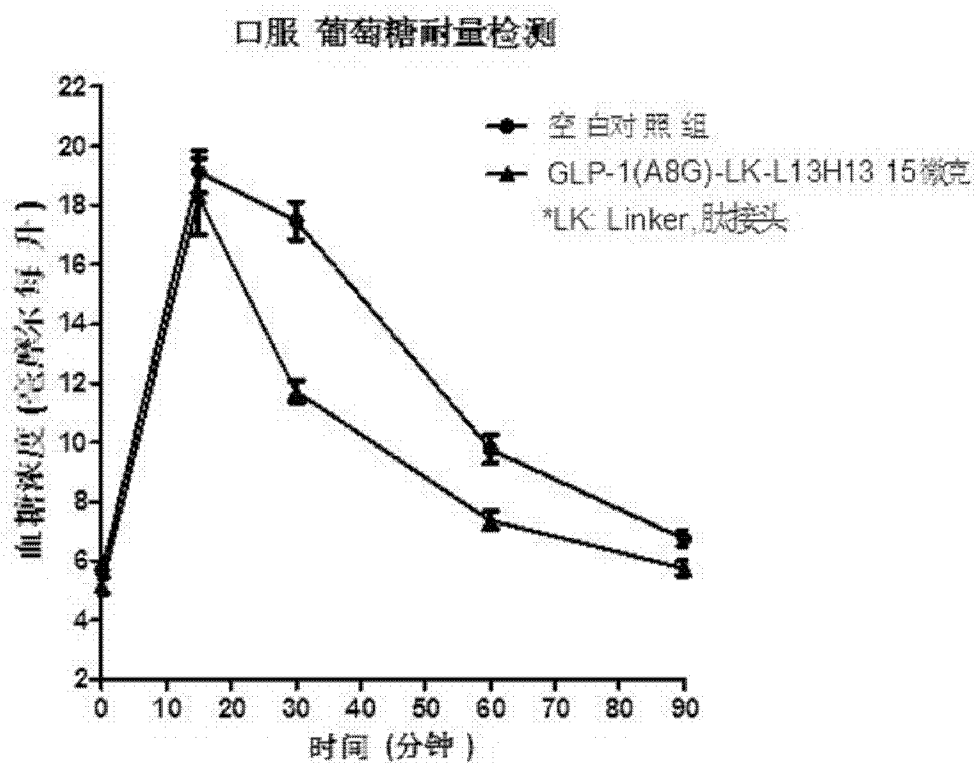


图 4

说明书附图

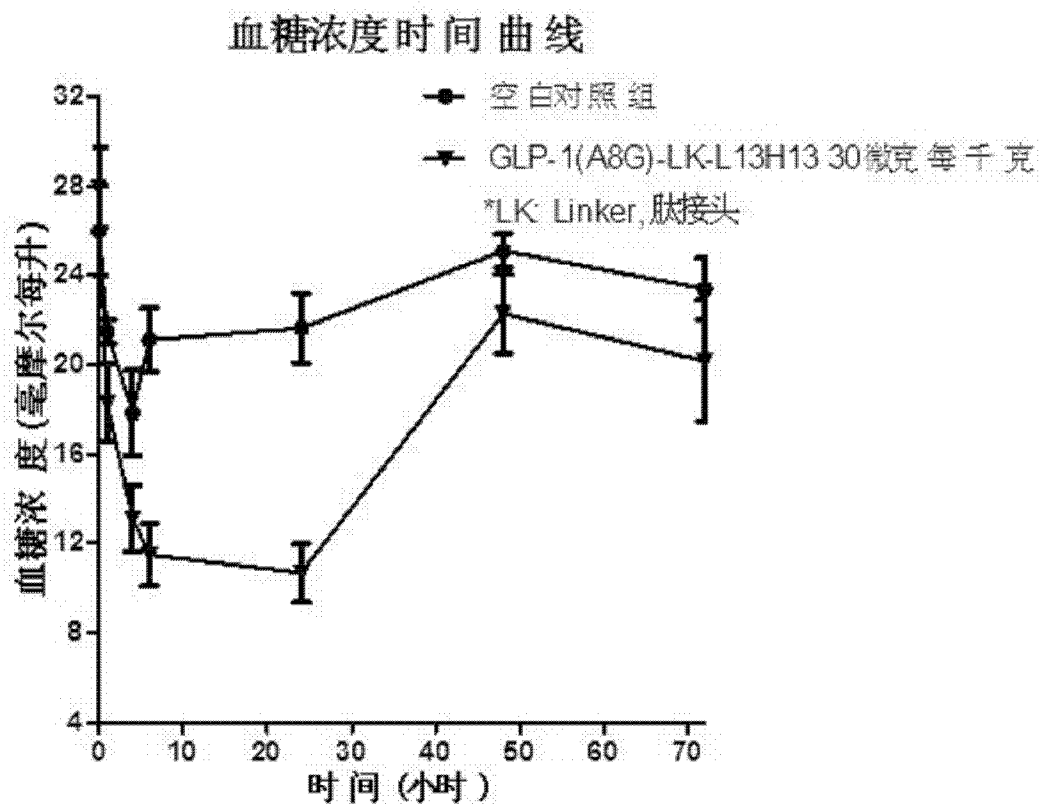


图 5

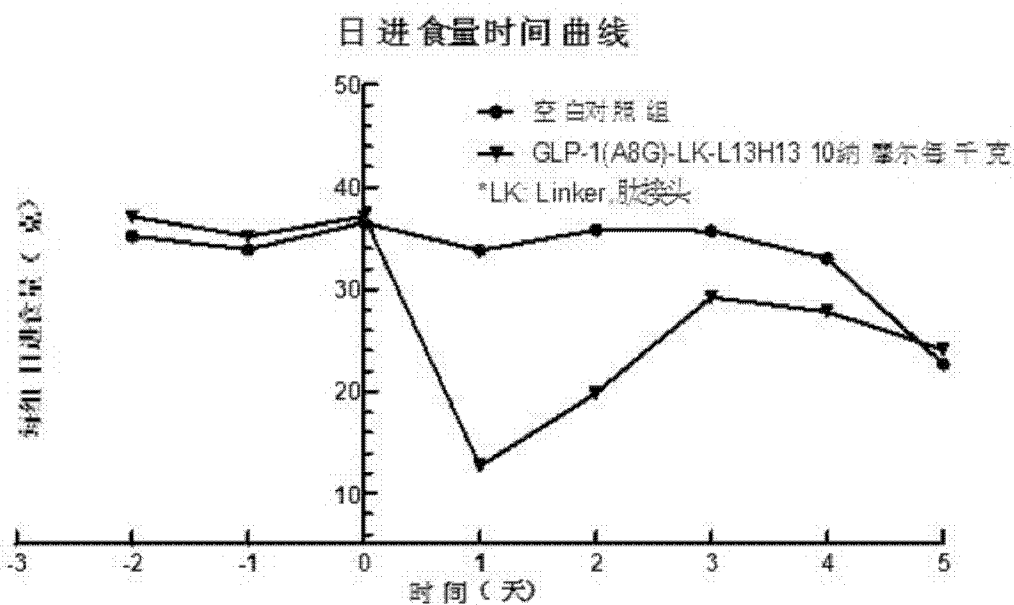


图 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2014/083568

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/28 (2006.01) i; C07K 19/00 (2006.01) i; C12N 15/09 (2006.01) i; C12N 15/63 (2006.01) i;
A61K 39/395 (2006.01) i; A61P 3/10 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K; C12N; A61K; A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CNABS, CNKI, CNTXT, DWPI, SIPOABS, EPTXT, USTXT, WOTXT, JPTXT, ISI web of knowledge, Retrieving System for Biological Sequence of Chinese Patent, Genbank, EMBL, STN and searched terms: glucagon like ptiptide-1, glp-1r, glp-1, glp, 1r, receptor, antibody,

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2011098443 A1 (ONEIL KARYN et al.) 28 April 2011 (28.04.2011) claims 1 to 16, description, paragraphs [0003]-[0006]	1-8
Y	US 2011098443 A1 (ONEIL KARYN et al.) 28 April 2011 (28.04.2011) claims 1 to 16, description, paragraphs [0003]-[0006]	9-15
Y	CN 101128487 A (DOMANTIS LTD.) 20 February 2008 (20.02.2008) claims 15, 18 to 20, 22 and 54, description, page 55, the second paragraph	9-15
Y	CN 102046207 A (GLAXO GROUP LTD.) 04 May 2011 (04.05.2011) claims 1 to 6, 13, 15 and 26 to 29	9-15
A	CN 101663317 A (COVX TECHNOLOGIES IRELAND LTD.) 03 March 2010 (03.03.2010) see the whole document	1-15

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 24 October 2014	Date of mailing of the international search report 04 November 2014
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer WANG, Xiangyu Telephone No. (86-10) 62411992

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2014/083568

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
US 2011098443 A1	28 April 2011	EP 2494062 A4	29 May 2013
		JP 2013509182 A	14 March 2013
		EP 2494062 A2	05 September 2012
		WO 2011056644 A3	29 December 2011
		WO 2011056644 A2	12 May 2011
		US 2014162316 A1	12 June 2014
		US 8389689 B2	05 March 2013
CN 101128487 A	20 February 2008	AU 2005311099 B2	02 February 2012
		BR PI0518761 A2	09 December 2008
		NO 20072751 A	29 August 2007
		RU 2428431 C2	10 September 2011
		MA 29079 B1	03 December 2007
		CA 2589800 A1	08 June 2006
		MX 2007006605 A	10 December 2007
		NZ 555464 A	26 March 2010
		EP 1841796 A2	10 October 2007
		US 2009214534 A1	27 August 2009
		EP 2769990 A2	27 August 2014
		CN 101128487 B	10 October 2012
		WO 2006059106 A3	04 January 2007
		JP 5185624 B2	17 April 2013
		AU 2005311099 A1	08 June 2006
		WO 2006059106 A2	08 June 2006
		RU 2007119990 A	10 January 2009
		IL 183450 D0	20 September 2007
		KR 20070094909 A	27 September 2007
		SG 157423 A1	29 December 2009
		JP 2008521869 A	26 June 2008

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2014/083568

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 102046207 A	04 May 2011	JP 2011517561 A	16 June 2011
		CN 102046207 B	28 August 2013
		KR 20100132535 A	17 December 2010
		US 2011020345 A1	27 January 2011
		EA 018471 B1	30 August 2013
		SG 189682 A1	31 May 2013
		WO 2009121804 A1	08 October 2009
		CA 2718480 A1	08 October 2009
		MX 2010010776 A	26 October 2010
		AU 2009231439 A1	08 October 2009
		EA 201001357 A1	29 April 2011
		US 2013189255 A1	25 July 2013
		EP 2259802 A1	15 December 2010
CN 101663317 A	03 March 2010	None	

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2014/083568

A. 主题的分类

C07K 16/28(2006.01)i; C07K 19/00(2006.01)i; C12N 15/09(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 3/10(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C07K; C12N; A61K; A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNABS, CNKI, CNTXT, DWPI, SIPOABS, EPTXT, USTXT, WOTXT, JPTXT, ISI web of knowledge, 中国专利生物序列检索系统, Genbank, EMBL, STN和检索项: 胰高血糖素样肽-1, 受体, 抗体, 融合, glucagon like ptiptide-1, glp-1r, glp-1, glp, lr, receptor, antibody, fusion, SEQ ID NOs:79和105

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	US 2011098443 A1 (ONEIL KARYN等) 2011年 4月 28日 (2011 - 04 - 28) 权利要求1-16, 说明书第[0003]-[0006]段	1-8
Y	US 2011098443 A1 (ONEIL KARYN等) 2011年 4月 28日 (2011 - 04 - 28) 权利要求1-16, 说明书第[0003]-[0006]段	9-15
Y	CN 101128487 A (杜门蒂斯有限公司) 2008年 2月 20日 (2008 - 02 - 20) 权利要求15、18-20、22和54, 说明书第55页第2段	9-15
Y	CN 102046207 A (葛兰素集团有限公司) 2011年 5月 04日 (2011 - 05 - 04) 权利要求1-6, 13, 15, 26-29	9-15
A	CN 101663317 A (COVX科技爱尔兰有限公司) 2010年 3月 03日 (2010 - 03 - 03) 全文	1-15

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2014年 10月 24日

国际检索报告邮寄日期

2014年 11月 04日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)
北京市海淀区蓟门桥西土城路6号
100088 中国

受权官员

王翔宇

传真号 (86-10)62019451

电话号码 (86-10)62411992

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2014/083568

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
US	2011098443	A1	2011年 4月 28日	EP	2494062	A4	2013年 5月 29日
				JP	2013509182	A	2013年 3月 14日
				EP	2494062	A2	2012年 9月 05日
				WO	2011056644	A3	2011年 12月 29日
				WO	2011056644	A2	2011年 5月 12日
				US	2014162316	A1	2014年 6月 12日
				US	8389689	B2	2013年 3月 05日
CN	101128487	A	2008年 2月 20日	AU	2005311099	B2	2012年 2月 02日
				BR	PI0518761	A2	2008年 12月 09日
				NO	20072751	A	2007年 8月 29日
				RU	2428431	C2	2011年 9月 10日
				MA	29079	B1	2007年 12月 03日
				CA	2589800	A1	2006年 6月 08日
				MX	2007006605	A	2007年 12月 10日
				NZ	555464	A	2010年 3月 26日
				EP	1841796	A2	2007年 10月 10日
				US	2009214534	A1	2009年 8月 27日
				EP	2769990	A2	2014年 8月 27日
				CN	101128487	B	2012年 10月 10日
				WO	2006059106	A3	2007年 1月 04日
				JP	5185624	B2	2013年 4月 17日
				AU	2005311099	A1	2006年 6月 08日
				WO	2006059106	A2	2006年 6月 08日
				RU	2007119990	A	2009年 1月 10日
				IL	183450	D0	2007年 9月 20日
				KR	20070094909	A	2007年 9月 27日
				SG	157423	A1	2009年 12月 29日
				JP	2008521869	A	2008年 6月 26日
CN	102046207	A	2011年 5月 04日	JP	2011517561	A	2011年 6月 16日
				CN	102046207	B	2013年 8月 28日
				KR	20100132535	A	2010年 12月 17日
				US	2011020345	A1	2011年 1月 27日
				EA	018471	B1	2013年 8月 30日
				SG	189682	A1	2013年 5月 31日
				WO	2009121804	A1	2009年 10月 08日
				CA	2718480	A1	2009年 10月 08日
				MX	2010010776	A	2010年 10月 26日
				AU	2009231439	A1	2009年 10月 08日
				EA	201001357	A1	2011年 4月 29日
				US	2013189255	A1	2013年 7月 25日
CN	101663317	A	2010年 3月 03日	EP	2259802	A1	2010年 12月 15日
				无			

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)