

(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
2020 年 6 月 25 日 (25.06.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/125744 A1

(51) 国际专利分类号:

C07K 16/28 (2006.01) *C12N 1/15* (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2019/126903

(22) 国际申请日: 2019 年 12 月 20 日 (20.12.2019)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

201811573634.0 2018 年 12 月 21 日 (21.12.2018) CN
201811606887.3 2018 年 12 月 27 日 (27.12.2018) CN

(71) 申请人: 江苏恒瑞医药股份有限公司(JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD.) [CN/CN]; 中国江苏省连云港市经济技术开发区昆仑山路 7 号, Jiangsu 222047 (CN)。上海恒瑞医药有限公司(SHANGHAI HENGRUI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [CN/CN]; 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。

(72) 发明人: 曹卓晓(CAO, Zhuoxiao); 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。罗肖(LUO, Xiao); 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。何宁(HE, Ning); 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。胡齐悦(HU, Qiyue); 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。张连山(ZHANG, Lianshan); 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。陶维康(TAO, Weikang); 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。

(74) 代理人: 北京戈程知识产权代理有限公司(GE CHENG & CO., LTD.); 中国北京市东城区东长安街 1 号东方广场东三办公楼 19 层程伟 (David W. Cheng), Beijing 100738 (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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,

GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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。

(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, ST, 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))。

(54) Title: BISPECIFIC PROTEIN

(54) 发明名称: 双特异性蛋白

(57) Abstract: Provided are a human GCGR antibody, a GLP-1 peptide and a mutant thereof, as well as a bispecific protein formed by fusion of the GCGR antibody and the GLP-1 peptide and a preparation method therefor, which may be used for weight loss and diabetes treatment.

(57) 摘要: 提供一种人 GCGR 抗体、GLP-1 肽及其突变体, 以及 GCGR 抗体与 GLP-1 肽融合形成的双特异性蛋白及其制备方法, 可用于减肥、治疗糖尿病。

WO 2020/125744 A1

双特异性蛋白

本申请要求 2018 年 12 月 21 日提交的专利申请 201811573634.0 和 2018 年 12 月 27 日提交的专利申请 201811606887.3 的优先权；两者通过引用并入本文。

5

技术领域

本公开涉及人 GCGR 抗体、GLP-1 肽及其突变体，以及 GCGR 抗体与 GLP-1 肽融合形成的双特异性蛋白及其制备方法和应用。

10 背景技术

这里的陈述仅提供与本公开有关的背景信息，而不必然地构成现有技术。

糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 是一种表现为胰岛素分泌缺陷和/或胰岛素作用障碍，以高血糖为特征的代谢性疾病，其发病主要是胰岛素与胰高血糖素共同作用的结果。

15 GLP-1 是影响胰岛素分泌最主要的激素之一，与胰高血糖素 (Glucagon) 一起均来源于前胰岛素原。前胰岛素原由约 158 个氨基酸组成，在不同的部位被切割成不同的肽链。人体内具有生物活性的 GLP-1 主要包括 GLP-1(7-36)酰胺和 GLP-1(7-37) 两种形式。GLP-1 通过小肠 L 细胞分泌，主要以葡萄糖浓度依赖性方式促进胰岛素分泌，保护胰岛 β 细胞，抑制胰高血糖素分泌来降低机体血糖水平。同时 GLP-1 还有抑制胃排空，降低食欲的作用。临床可用于 II 型糖尿病和肥胖症的治疗。机体内天然活性 GLP-1 的半衰期很短 (不足 2 分钟)，很容易被机体内 DPPIV 酶降解，不具有临床使用价值。

25 延长半衰期一直是 GLP-1 类药物研发的主要方向，目前已有多款 GLP-1 激动剂上市，如度拉糖肽 (Dulaglutide) 和索马鲁肽 (Semaglutide) 等。虽然 GLP-1 在疗效上已经获得人们的充分肯定，但也存在诸多副作用，主要表现为胃肠道症状，低血糖，胰腺炎及肾损伤等。

胰高血糖素与胰岛素作用相反，主要起升高机体血糖的作用。胰高血糖素是由胰岛 α 细胞分泌的具有 29 个氨基酸的肽，与肝细胞膜上受体 GCGR 结合后主要通过激活下游 cAMP/PKA 途径，加速糖原分解、脂肪分解和糖异生，使血糖升高。

30 研究发现，GCGR 基因敲除鼠呈现出 GLP-1 升高，肝糖输出减少，脂代谢增加，食欲减退等一系列表型。GCGR 是糖尿病治疗最热门的靶点之一，但目前针对 GCGR 的拮抗类药物研发进展缓慢。REMD Biotherapeutics 公司的 REMD-477，目前是最前沿的 GCGR 单克隆抗体药物，处于临床二期。

35 现有技术已在专利 CN101589062A、CN101983208A、CN102482350A、CN103314011A、CN105189560A、CN107614695A、US20180273629A1、WO2013059531A1 等专利中公开 GCGR 抗体，但仍有待于提供新的高效的 GCGR

抗体及糖尿病治疗方法。

发明内容

本公开提供一种抗 GCGR 的单克隆抗体或其抗原结合片段。该抗体或其抗原
5 结合片段具有与人 GCGR（或其所包含的抗原表位）结合的能力。

在一些实施方式中，所述抗 GCGR 的单克隆抗体或其抗原结合片段，包含选自如下 a）或 b）的重链可变区和轻链可变区的组合：

a）所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO：48、49 和 50 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 区，和所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO：51、52 和 53
10 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 区；或

b）所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO：38、39 和 54 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 区，和所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO：55、56 和 57 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 区。

在一些实施方式中，所述抗 GCGR 的单克隆抗体或其抗原结合片段，包含选自如下 i）至 vi）的重链可变区和轻链可变区的任一组合：
15

i)所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO：14、15 和 16 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 区，和所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO：17、18 和 19 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 区；

ii）所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO：20、21 和 22 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 区，和所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO：23、24 和 25
20 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 区；

iii）所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO：26、27 和 28 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 区，和所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO：29、30 和 31 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 区；

iv）所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO：32、33 和 34 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 区，和所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO：35、36 和 37
25 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 区；

v）所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO：38、39 和 40 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 区，和所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO：41、42 和 43
30 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 区；或

vi）所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO：38、39 和 44 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 区，和所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO：45、46 和 47 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 区。

在一些实施方式中，所述抗 GCGR 的单克隆抗体或其抗原结合片段是鼠源抗体、嵌合抗体或人源化抗体或其抗原结合片段。
35

在一些实施方式中，所述抗 GCGR 的单克隆抗体或其抗原结合片段，所述人

源化抗体包含源自人抗体的框架区或其框架区变体，所述框架区变体为在人抗体的轻链框架区上具有至多 10 个回复突变，和/或，所述框架区变体在人抗体的重链框架区基础上具有至多 10 个、至多 9 个、至多 8 个、至多 7 个、至多 6 个、至多 5 个、至多 4 个、至多 3 个、至多 2 个、至多 1 个氨基酸的回复突变。

5 在一些实施方式中，所述框架区变体包含选自：

aa) 轻链可变区中包含 42G、44V、71Y 和 87F 中的一个或多个氨基酸回复突变，和/或重链可变区中包含 38K、48I、67A、69F、71A、73P、78A 和 93S 中的一个或多个氨基酸回复突变；或者

10 ab) 轻链可变区中包含 38L、44V、59S、70E 和 71Y 中的一个或多个氨基酸回复突变，和/或重链可变区中包含 38K、48I、66K、67A、69L、73R、78M 和 94S 中的一个或多个氨基酸回复突变。进一步地，所述回复突变位点的位置依据 Kabat 编号规则确定。

在一些实施方式中，所述抗 GCGR 的单克隆抗体或其抗原结合片段，其包含序列如 SEQ ID NO: 2、61、62、63 和 64 任一所示或与 SEQ ID NO: 2、61、62、63 和 64 任一所示具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或 99% 序列同一性的重链可变区；和/或

序列如 SEQ ID NO: 3、58、59 和 60 任一所示或与 SEQ ID NO: 3、58、59 和 60 任一所示具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或 99% 序列同一性的轻链可变区。

20 在一些实施方案中，所述抗 GCGR 的单克隆抗体或其抗原结合片段，其包含序列如 SEQ ID NO: 63 所述的重链可变区和序列如 SEQ ID NO: 58 所示的轻链可变区。

在一些实施方式中，所述抗 GCGR 的单克隆抗体或其抗原结合片段，其包含序列为 SEQ ID NO: 4 所示或与 SEQ ID NO: 4 所示具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或 99% 序列同一性的重链可变区和/或序列为 SEQ ID NO: 5 所示或与 SEQ ID NO: 5 所示具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或 99% 序列同一性的轻链可变区。

30 在一些实施方式中，所述抗 GCGR 的单克隆抗体或其抗原结合片段，其包含序列为 SEQ ID NO: 6 所示或与 SEQ ID NO: 6 所示具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或 99% 序列同一性的重链可变区和/或序列为 SEQ ID NO: 7 所示或与 SEQ ID NO: 7 所示具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或 99% 序列同一性的轻链可变区。

35 在一些实施方式中，所述抗 GCGR 的单克隆抗体或其抗原结合片段，其包含序列为 SEQ ID NO: 8、68、69、70 和 71 任一所示或与 SEQ ID NO: 8、68、69、70 和 71 任一所示具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或 99% 序列同一性的重链可变区和/或序列为 SEQ ID NO: 9、65、66 和 67

任一所示或与 SEQ ID NO: 9、65、66 和 67 任一所示具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或 99% 序列同一性的轻链可变区。

在一些实施方案中，所述抗 GCGR 的单克隆抗体或其抗原结合片段，其包含序列如 SEQ ID NO: 71 所述的重链可变区和序列如 SEQ ID NO: 67 所示的轻链可变区。

在一些实施方式中，所述抗 GCGR 的单克隆抗体或其抗原结合片段，其包含序列为 SEQ ID NO: 10 所示或与 SEQ ID NO: 10 所示具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或 99% 序列同一性的重链可变区和/或序列为 SEQ ID NO: 11 所示或与 SEQ ID NO: 11 所示具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或 99% 序列同一性的轻链可变区。

在一些实施方式中，所述抗 GCGR 的单克隆抗体或其抗原结合片段，其包含序列为 SEQ ID NO: 12 所示或与 SEQ ID NO: 12 所示具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或 99% 序列同一性的重链可变区和/或序列为 SEQ ID NO: 13 所示或与 SEQ ID NO: 13 所示具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或 99% 序列同一性的轻链可变区。

在一些实施方式中，所述抗 GCGR 的单克隆抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体为全长抗体，进一步包括抗体恒定区，具体地，所述抗体恒定区的重链恒定区选自人 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4 恒定区及其常规变体，所述抗体恒定区的轻链恒定区选自人抗体 κ 和 λ 链恒定区及其常规变体，更优选包含 SEQ ID NO: 72 所示的人抗体重链恒定区和 SEQ ID NO: 73 所示的人轻链恒定区。

在一些实施方式中，所述的抗 GCGR 的单克隆抗体或其抗原结合片段，包括重链和轻链，其中：

所述重链为 SEQ ID NO: 74、76 或 78 所示或与其具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或 99% 的序列同一性，且所述轻链为 SEQ ID NO: 75 所示或与其具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或 99% 的序列同一性。

在一些实施方式中，所述的抗 GCGR 的单克隆抗体或其抗原结合片段，包括重链和轻链，其中：

所述重链为 SEQ ID NO: 74、76 或 78 所示或与其具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或 99% 的序列同一性，且所述轻链为 SEQ ID NO: 77 所示或与其具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或 99% 的序列同一性。

在一些实施方式中，所述的抗 GCGR 的单克隆抗体或其抗原结合片段，包括重链和轻链，其中：

所述重链为 SEQ ID NO:74、76 或 78 所示或与其具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或 99% 的序列同一性，且所述轻链为 SEQ ID NO: 79 所示或与其具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或 99% 的序列同一性。

在一些实施方式中，所述的抗 GCGR 的单克隆抗体或其抗原结合片段，包括重链和轻链，其中：

所述重链为 SEQ ID NO:80 所示或与其具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或 99% 的序列同一性，且所述轻链为 SEQ ID NO:81 所示或与其具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或 99% 的序列同一性。

在一些实施方式中，所述的抗 GCGR 的单克隆抗体或其抗原结合片段，包括重链和轻链，其中：

所述重链为 SEQ ID NO:82 所示或与其具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或 99% 的序列同一性，且所述轻链为 SEQ ID NO:83 所示或与其具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或 99% 的序列同一性。

在一些实施方式中，所述的抗 GCGR 的单克隆抗体或其抗原结合片段，包括重链和轻链，其中：

所述重链为 SEQ ID NO:84 所示或与其具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或 99% 的序列同一性，且所述轻链为 SEQ ID NO:85 所示或与其具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或 99% 的序列同一性。

在一些实施方式中，所述的抗 GCGR 的单克隆抗体或其抗原结合片段，包括重链和轻链，其中：

所述重链为 SEQ ID NO:86 所示或与其具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或 99% 的序列同一性，且所述轻链为 SEQ ID NO:87 所示或与其具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或 99% 的序列同一性。

在一些实施方式中，所述的抗 GCGR 的单克隆抗体或其抗原结合片段，包括重链和轻链，其中：

所述重链为 SEQ ID NO:88 所示或与其具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、

90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或 99% 的序列同一性，且所述轻链为 SEQ ID NO:89 所示或与其具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或 99% 的序列同一性。

5 在一些实施方案中，所述的抗 GCGR 的单克隆抗体或其抗原结合片段，其包含如序列如 SEQ ID NO: 78 所示的重链和序列如 SEQ ID NO: 79 所示的轻链。

在一些实施方案中，所述的抗 GCGR 的单克隆抗体或其抗原结合片段，其包含如序列如 SEQ ID NO: 84 所示的重链和序列如 SEQ ID NO: 85 所示的轻链。

10 在一些实施方式中，所述抗 GCGR 的单克隆抗体或其抗原结合片段，包含选自如下 ac) 至 ah) 的重链可变区和轻链可变区的任一组合：

ac) 所述重链可变区包含与 SEQ ID NO: 2 所示重链可变区具有相同序列的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 区，和所述轻链可变区包含与 SEQ ID NO: 3 所示轻链可变区具有相同序列的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 区；

15 ad) 所述重链可变区包含与 SEQ ID NO: 4 所示重链可变区具有相同序列的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 区，和所述轻链可变区包含与 SEQ ID NO: 5 所示轻链可变区具有相同序列的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 区；

ae) 所述重链可变区包含与 SEQ ID NO: 6 所示重链可变区具有相同序列的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 区，和所述轻链可变区包含与 SEQ ID NO: 7 所示轻链可变区具有相同序列的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 区；

20 af) 所述重链可变区包含与 SEQ ID NO: 8 所示重链可变区具有相同序列的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 区，和所述轻链可变区包含与 SEQ ID NO: 9 所示轻链可变区具有相同序列的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 区；

25 ag) 所述重链可变区包含与 SEQ ID NO: 10 所示重链可变区具有相同序列的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 区，和所述轻链可变区包含与 SEQ ID NO: 11 所示轻链可变区具有相同序列的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 区；或

ah) 所述重链可变区包含与 SEQ ID NO: 12 所示重链可变区具有相同序列的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 区，和所述轻链可变区包含与 SEQ ID NO: 13 所示轻链可变区具有相同序列的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 区。

30 在一些实施方式中，所述抗 GCGR 的单克隆抗体或其抗原结合片段，其中所述抗原结合片段是选自 Fab、Fab'、F(ab')₂、单链抗体、二聚化的 V 区（双抗体）和二硫键稳定化的 V 区（dsFv）。

在一些实施方式中，所述抗 GCGR 的单克隆抗体或其抗原结合片段，其特征在于与如前所述的单克隆抗体或其抗原结合片段竞争结合人 GCGR（或其表位）。

35 在一些实施方式中，所述抗 GCGR 的单克隆抗体或其抗原结合片段，具有以下特征中的至少一种：

i. 以小于 500nM、小于 450nM、小于 400nM、小于 350nM 或小于 300nM（优

选小于 300nM) IC₅₀ 值的水平阻断人 GCGR 与人胰高血糖素结合的拮抗活性;

ii. 阻断食蟹猴或恒河猴 GCGR 与食蟹猴或恒河猴胰高血糖素结合的拮抗活性;

iii. 抑制人血糖浓度的升高;

5 iv. 阻断小鼠 GCGR 与小鼠胰高血糖素结合的拮抗活性。

在一些实施方式中, 所述抗 GCGR 的单克隆抗体或其抗原结合片段, 其中所述单克隆抗体或其抗原结合片段与如前所述的单克隆抗体或其抗原结合片段结合相同的抗原表位。

10 另一方面, 本公开提供一种双特异性蛋白。在一些实施方式中, 所提供的一种双特异性蛋白, 所述双特异性蛋白包含 GLP-1 肽和 GCGR 抗体, 所述 GLP-1 肽与所述 GCGR 抗体的多肽链之间由肽键或接头共价连接。

在一些实施方式中, 所述的双特异性蛋白, 其中所述 GLP-1 肽的羧基端与 GCGR 抗体的重链可变区的氨基端由肽键或接头连接, 或者所述 GLP-1 肽的羧基端与 GCGR 抗体的轻链可变区的氨基端由肽键或接头连接。

15 在一些实施方式中, 所述的双特异性蛋白, 其中所述 GLP-1 肽的羧基端与 GCGR 抗体的重链可变区的氨基端由肽键或接头连接。

在一些实施方式中, 所述的双特异性蛋白, 其中所述 GLP-1 肽的羧基端与 GCGR 抗体的轻链可变区的氨基端由肽键或接头连接。

20 在一些实施方式中, 所述的双特异性蛋白, 其中所述 GLP-1 肽的羧基端与 GCGR 全长抗体的重链氨基端由肽键或接头连接。

在一些实施方式中, 所述的双特异性蛋白, 其中所述 GLP-1 肽的羧基端与全长 GCGR 抗体的轻链氨基端由肽键或接头连接。

在一些实施方式中, 所述的双特异性蛋白, 所述 GCGR 抗体选自如前所述的抗 GCGR 的单克隆抗体或其抗原结合片段。

25 在一些实施方式中, 所述的双特异性蛋白, 所述 GLP-1 肽是如 SEQ ID NO: 91 所示的 GLP-1A, 或所述 GLP-1 肽在 GLP-1A 基础上具有 Q17E、I23V、K28R 和 G30R 中一个或多个氨基酸替代的 GLP-1A 肽变体。

30 在一些实施方式中, 所述的双特异性蛋白, 所述 GLP-1 肽是如 SEQ ID NO: 91 所示的 GLP-1A, 或所述 GLP-1 肽在 GLP-1A 基础上具有 Q17E 的 GLP-1A 肽变体。

在一些实施方式中, 所述的双特异性蛋白, 所述 GLP-1 肽是如 SEQ ID NO: 91 所示的 GLP-1A, 或所述 GLP-1 肽在 GLP-1A 基础上具有 Q17E 替代, 且同时还具有 I23V、K28R 和 G30R 中一个或多个氨基酸替代 GLP-1A 肽变体。

35 在一些实施方式中, 所述的双特异性蛋白, 所述 GLP-1 肽是如 SEQ ID NO: 91 所示的 GLP-1A, 或所述 GLP-1 肽在 GLP-1A 基础上具有 Q17E 或具有 Q17E 和 I23V 的 GLP-1A 肽变体。

在一些实施方式中,所述的双特异性蛋白,所述 GLP-1A 肽变体包含如 SEQ ID NO: 92、93、94、95、96、97、98 或 99 所示的序列或由其组成。

在一些实施方式中,所述的双特异性蛋白,所述 GCGR 抗体是选自如前一项所述的抗 GCGR 的单克隆抗体或其抗原结合片段和如前一项所述的 GLP-1A 肽或 GLP-1A 肽变体。

在一些实施方式中,所述的双特异性蛋白,所述双特异性蛋白具有包含第一多肽链和第二多肽链,其中:所述第一多肽链选自如 SEQ ID NO: 100、101、102、103、104、105、106、107 和 108 任一所示的多肽,和所述第二多肽链选自如 SEQ ID NO: 79 所示的多肽。

在一些实施方式中,所述的双特异性蛋白,所述双特异性蛋白具有包含 GCGR 抗体重链的第一多肽链和包含 GCGR 抗体轻链的第二多肽链,其中:所述第一多肽链选自如 SEQ ID NO: 109 所示的多肽,和所述第二多肽链选自如 SEQ ID NO: 81 所示的多肽;

在一些实施方式中,所述的双特异性蛋白,所述双特异性蛋白具有包含 GCGR 抗体重链的第一多肽链和包含 GCGR 抗体轻链的第二多肽链,其中:所述第一多肽链选自如 SEQ ID NO: 110 所示的多肽,和所述第二多肽链选自如 SEQ ID NO: 83 所示的多肽;

在一些实施方式中,所述的双特异性蛋白,所述双特异性蛋白具有包含 GCGR 抗体重链的第一多肽链和包含 GCGR 抗体轻链的第二多肽链,其中:所述第一多肽链选自如 SEQ ID NO: 111 所示的多肽,和所述第二多肽链选自如 SEQ ID NO: 85 所示的多肽;

在一些实施方式中,所述的双特异性蛋白,所述双特异性蛋白具有包含 GCGR 抗体重链的第一多肽链和包含 GCGR 抗体轻链的第二多肽链,其中:所述第一多肽链选自如 SEQ ID NO: 112 所示的多肽,和所述第二多肽链选自如 SEQ ID NO: 87 所示的多肽;或者

在一些实施方式中,所述的双特异性蛋白,所述双特异性蛋白具有包含 GCGR 抗体重链的第一多肽链和包含 GCGR 抗体轻链的第二多肽链,其中:所述第一多肽链选自如 SEQ ID NO: 113 所示的多肽,和所述第二多肽链选自如 SEQ ID NO: 89 所示的多肽。

另一方面,本公开还提供一种 GLP-1 肽变体。在一些实施方式中,所述 GLP-1 肽变体,其是在 SEQ ID NO: 91 所示的 GLP-1A 基础上具有 Q17E、I23V、K28R 和 G30R 中一个或多个氨基酸突变的突变体。

在一些实施方式中,所述 GLP-1 肽是如 SEQ ID NO: 91 所示的 GLP-1A,或所述 GLP-1 肽在 GLP-1A 基础上具有 Q17E 或具有 Q17E 和 I23V 的 GLP-1A 肽变体。

在一些实施方式中,所述的 GLP-1 肽变体,其中具有如 SEQ ID NO: 92、93、

94、95、96、97、98 或 99 所示的序列。

本公开还提供一种药物组合物，其含有治疗有效量的如前所述的抗 GCGR 的单克隆抗体或其抗原结合片段，或如前所述的双特异性蛋白，或如前所述的 GLP-1 肽变体，以及一种或多种药学上可接受的载体、稀释剂、缓冲剂或赋形剂。

5 本公开还提供一种分离的核酸分子，其编码如前所述的抗 GCGR 的单克隆抗体或其抗原结合片段，或如前所述的双特异性蛋白，或如前所述的 GLP-1 肽变体。

本公开提供一种重组载体，其包含如前所述的分离的核酸分子。

本公开提供一种用如前所述的重组载体转化的宿主细胞，所述宿主细胞选自原核细胞和真核细胞，优选为真核细胞，更优选哺乳动物细胞或昆虫细胞。

10 本公开提供用于生产如前所述的抗 GCGR 的单克隆抗体或其抗原结合片段，或如前所述的双特异性蛋白，或根据如前所述的 GLP-1 肽变体的方法，所述方法包括将如前所述宿主细胞在培养基中进行培养以形成并积累如前所述的抗 GCGR 的单克隆抗体或其抗原结合片段，或如前所述的双特异性蛋白，或如前所述的 GLP-1 肽变体，以及从培养物回收所述单克隆抗体或其抗原结合片段或双特异性
15 蛋白或 GLP-1 肽变体。

本公开提供用于体外检测或测定人 GCGR 的方法，所述方法包括使用如前所述的单克隆抗体或其抗原结合片段。

一种检测人 GCGR 的试剂盒，其包含如前所述的单克隆抗体或其抗原结合片段。

20 根据一些实施方式，还提供了前述抗 GCGR 单克隆抗体或其抗原结合片段在制备医疗器械（例如试剂盒、阵列、试纸、多孔板、磁珠、包被微粒）中的用途，所述医疗器械包含前所述的单克隆抗体或其抗原结合片段。作为一个示例，试剂盒中包含包被有前述抗 GCGR 单克隆抗体或其抗原结合片段的多孔板。

本公开提供如前所述的单克隆抗体或其抗原结合片段在制备用于检测或测定
25 人 GCGR 的试剂中的用途。

本公开提供一种降低受试者血糖浓度的方法，所述方法包括向受试者施用治疗有效量的如前所述的抗 GCGR 的单克隆抗体或其抗原结合片段，或如前所述的双特异性蛋白，或如前所述的 GLP-1 肽变体，或如前所述的药物组合物。

30 优选地，所述治疗有效量为单位剂量的组合物中含有 0.1-3000mg 的如前所述的抗 GCGR 的单克隆抗体或其抗原结合片段，或如前所述的双特异性蛋白，或根据如前所述的 GLP-1 肽变体。

本公开提供一种治疗代谢障碍的方法，所述方法包括向受试者施用如前所述的抗 GCGR 的单克隆抗体或其抗原结合片段，或如前所述的双特异性蛋白，或如前所述的 GLP-1 肽变体，或如前所述的药物组合物；优选地，所述代谢障碍为代
35 谢综合征、肥胖症、葡萄糖耐量受损、糖尿病、糖尿病酮症酸中毒、高血糖症、高血糖高渗综合征、围术期高血糖症、高胰岛素血症、胰岛素抵抗综合征、空腹

血糖受损、血脂异常、动脉粥样硬化或糖尿病前期状态。

本公开还提供根据如前所述的抗 GCGR 的单克隆抗体或其抗原结合片段，或如前所述的双特异性蛋白，或如前所述的 GLP-1 肽变体，或如前所述的药物组合物在制备治疗代谢障碍或降低受试者血糖浓度的药物中的用途；

5 优选地，所述代谢障碍为代谢综合征、肥胖症、葡萄糖耐量受损、糖尿病、糖尿病酮症酸中毒、高血糖症、高血糖高渗综合征、围术期高血糖症、高胰岛素血症、胰岛素抵抗综合征、空腹血糖受损、血脂异常、动脉粥样硬化或糖尿病前期状态。

10 本公开还提供用如前所述的抗 GCGR 的单克隆抗体或其抗原结合片段，或如前所述的双特异性蛋白，或如前所述的 GLP-1 肽变体，或如前所述的药物组合物用作药物，优选的用作治疗代谢障碍或降低受试者血糖浓度的药物。

15 更优选地，所述代谢障碍为代谢综合征、肥胖症、葡萄糖耐量受损、糖尿病、糖尿病酮症酸中毒、高血糖症、高血糖高渗综合征、围术期高血糖症、高胰岛素血症、胰岛素抵抗综合征、空腹血糖受损、血脂异常、动脉粥样硬化或糖尿病前期状态。

附图说明

图 1：本公开的双特异性蛋白（GLP-1/GCGR 抗）结构示意图。

图 2：双特异性蛋白及 GCGR 抗体对 GCGR 的拮抗活性。

20 图 3：双特异性蛋白及度拉糖肽对 GLP-1R 的激活活性。

图 4：长期用药对 ob/ob 小鼠随机血糖的影响，Vehicle（空载体）为注射磷酸盐缓冲液（PBS）的模型对照组，hu1803-9D-3mpk 与 hu1803-9-2.84mpk 和度拉糖肽-1.16mpk 是相同物质的量浓度。

25 图 5：长期用药对 ob/ob 小鼠饥饿血糖的影响。所有实验组均能显著降低小鼠空腹血糖浓度，其中 hu1803-9D-3mpk 与 hu1803-9-2.84mpk 的降血糖浓度能力最强，且 hu1803-9D-3mpk 的降血糖活性优于 hu1803-9-2.84mpk。

具体实施方式

术语

30 本公开所用氨基酸三字母代码和单字母代码如 J.biol.chem,243,p3558(1968)中所述。

术语“双特异性蛋白”指能够与两个目标蛋白或目标抗原结合的蛋白分子。在本公开双特异性蛋白特指能够结合 GCGR 和 GLP-1R（GLP-1 受体），由 GLP-1 肽和 GCGR 抗体（或其抗原结合片段）的多肽链融合后形成的蛋白。

35 “GLP-1 肽”指能结合并激活 GLP-1 受体的肽。现有技术的肽描述于专利申请 WO2008/071972 、 WO2008/101017 、 WO2009/155258 、 WO2010/096052 、

WO2010/096142 、 WO2011/075393 、 WO2008/152403 、 WO2010/070251 、
WO2010/070252 、 WO2010/070253 、 WO2010/070255 、 WO2011/160630 、
WO2011/006497 、 WO2011/117415 、 WO2011/117416 、 WO2006/134340 、
WO1997046584、WO2007124461、WO2017100107、WO2007039140、CN1935261A、
5 CN1935846A、WO2006036834、WO2005058958、WO2002046227、WO1999043705、
WO1999043708、WO1999043341、CN102949730、CN104293834、CN104327187、
WO2015067716 、 WO2015049651 、 WO2014096145 、 WO2014096148 、
WO2014096150、WO2014096149 中，其内容通过引用并入本文。包括 GLP-1、GLP-1
类似物和 GLP-1 受体肽激动剂，部分具体的 GLP-1 肽例如：利西拉来(Lixisenatide)
10 /AVE0010/ZP10/Lyxumia 、 艾 塞 那 肽 (Exenatide) / 毒 蜥 外 泌 肽
-4/Byetta/Bydureon/ITCA 650/ AC-2993、利拉鲁肽/Victoza、索马鲁肽(Semaglutide)、
他司鲁肽(Taspoglutide)、Syncria/阿必鲁肽(Albiglutide)、度拉糖肽(Dulaglutide)、
rExendin-4、CJC-1134-PC、PB-1023、TTP-054、Langlenatide/HM-11260C、CM-3、
GLP-1 Eligen、ORMD-0901、NN-9924、NN-9926、NN-9927、Nodexen、Viador-GLP-1、
15 CVX-096、ZYOG-1、ZYD-1、GSK-2374697、DA-3091、MAR-701、MAR709、
ZP-2929、ZP-3022、TT-401、BHM-034、MOD-6030、CAM-2036、DA-15864、
ARI-2651、ARI-2255、艾塞那肽-XTEN 和胰高血糖素-Xten，除上述 GLP-1 肽外，
还包括本公开基于 SEQ ID NO: 91 所示 GLP-1A 及其突变体(如 SEQ ID NO: 92-99
所示)。

20 GPCR (G Protein-Coupled Receptor)，即G蛋白偶联受体，是表达在细胞质膜
上的一类跨膜蛋白。GPCR由超过800个成员组成，是目前已知的哺乳动物基因组
中最大的膜蛋白家族。在人体内，GPCR蛋白广泛分布于中枢神经系统、免疫系统、
心血管、视网膜等器官和组织，参与机体的发育和正常的功能行使。

GPCR 蛋白主体由 7 段跨细胞质膜的 α 螺旋结构构成。N 端和三个环位于胞外，
25 参与蛋白与其受体的相互作用；C 端和 3 个环位于胞内，其中 C 端和第 3 个环在
GPCR 蛋白与下游 G 蛋白的相互作用从而介导胞内的信号传导过程中发挥重要的
作用。

“GCGR”是胰高血糖素 (Glucagon) 受体，是 GPCR 家族的成员之一，胰高血
糖素与 GCGR 结合后主要通过激活下游途径，加速糖原分解、脂肪分解和/或糖异
30 生，使血糖升高。

术语“抗体 (antibody, Ab)”包含至少一个与具体抗原 (或其表位) (例如 GCGR)
特异性结合或相互作用 (例如识别和/或结合) 的互补决定区的抗原结合分子 (或
分子复合物)。

术语“抗体”包含：包括通过双硫键相互连接的四条多肽链，两条重 (H) 链和
35 二条轻 (L) 链的免疫球蛋白分子以及其多聚体 (例如 IgM)。各重链包含重链可
变区 (文中缩写为 HCVR 或 VH) 和重链恒定区 (CH)。这一重链恒定区包含三个

区（结构域），CH1、CH2 和 CH3。各轻链包含轻链可变区（文中缩写为 LCVR 或 VL）和轻链恒定区（CL）。VH 和 VL 区可进一步细分为高变区，称为互补决定区（CDR），其间散布着较保守性区域，称为框架区（framework region, FR，也称骨架区、构架区）。各 VH 和 VL 是由三个 CDR 和四个 FR 所组成，以下列顺序由氨基端排列到羧基端：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。

在本公开的不同实施例中，抗 GCGR 抗体（或其抗原结合片段）的 FR 可与人种系序列相同，或可经自然或人工修饰。抗体可以是不同亚类（subclass）的抗体，例如，IgG（例如，IgG1、IgG2、IgG3、或 IgG4 亚类）、IgA1、IgA2、IgD、IgE 或 IgM 抗体。

术语“抗体”还包含完全抗体分子的抗原结合片段。

术语抗体的“抗原结合部分”、“抗原结合结构域”、“抗原结合片段”等，如文中所用，包含任何与抗原特异性结合形成复合物的天然生成、酶制得、合成或基因工程改造的多肽或糖蛋白。抗体的抗原结合片段可使用任何适合的标准技术，例如蛋白质水解消化作用或涉及编码抗体可变区和（视需要）恒定区的 DNA 操作和表达的重组基因工程技术，来源于例如全抗体分子。这一 DNA 是已知的和/或容易地从例如市售来源、DNA 资料库（包含，例如噬菌体-抗体资料库）取得或可经合成。这一 DNA 可用化学或通过使用分子生物技术来定序和操作，例如将一个或多个可变和/或恒定区排列成适合的配置，或导入密码子，产生半胱氨酸残基、修饰、增添或删除氨基酸等。

抗原结合片段的非限定示例包含：(i) Fab 片段；(ii) F(ab')₂ 片段；(iii) Fd 片段；(iv) Fv 片段；(v) 单链 Fv (scFv) 分子；(vi) dAb 片段。其它工程改造分子，例如区域特异性抗体、单域抗体、区域删除抗体、嵌合抗体、双抗体、三抗体、四抗体、微抗体、纳米抗体（例如单价纳米抗体、双价纳米抗体等）、小模块免疫医药（SMIP）和鲨可变 IgNAR 区，也涵盖在文中所用的“抗原结合片段”的词语内。

抗原结合片段典型地将包含至少一个可变区。可变区可以是任何大小或氨基酸组成的区域且一般将包含与一个或多个框架序列相邻或在其框架内的 CDR。

在某些实施例中，抗体的抗原结合片段在任何可变区和恒定区的配置中，可变区和恒定区可直接彼此相连接或可通过完整或部分的绞链或连接子区相连接。绞链区可由至少 2 个（例如 5、10、15、20、40、60 或更多个）氨基酸所组成，使得在单一多肽分子中在相邻的可变和/或恒定区之间产生柔性和半柔性连结。

“鼠源抗体”在本公开中为根据本领域知识和技能制备的来源于小鼠或大鼠的单克隆抗体。制备时用抗原注射试验对象，然后分离表达具有所需序列或功能特性的抗体的杂交瘤，当所注射的试验对象为小鼠时，所产生的抗体为小鼠来源抗体，当所注射的试验对象为大鼠时，所产生的抗体为大鼠来源抗体。

“嵌合抗体（chimeric antibody）”，是将第一物种（如鼠）抗体的可变区与第

二物种（如人）抗体的恒定区融合而成的抗体。建立嵌合抗体，要先建立分泌第一物种（如鼠）单抗的杂交瘤，然后从杂交瘤细胞中克隆可变区基因，再根据需要克隆第二物种（如人）抗体的恒定区基因，将第一物种可变区基因与第二物种恒定区基因连接成嵌合基因后插入表达载体中，最后在真核系统或原核系统中表达嵌合抗体分子。

在本公开一个优选的实施方案中，所述的嵌合抗体的抗体轻链进一步包含人源 κ 、 λ 链或其变体的轻链恒定区。所述的嵌合抗体的抗体重链进一步包含人源 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 或其变体的重链恒定区，优选包含人源 IgG1、IgG2 或 IgG4 重链恒定区，或者使用氨基酸突变（如 YTE 突变或回复突变，L234A 和/或 L235A 突变，或 S228P 突变）的 IgG1、IgG2 或 IgG4 重链恒定区变体。

术语“人源化抗体（humanized antibody）”，包括 CDR 移植抗体（CDR-grafted antibody），是指将动物来源抗体，例如鼠源抗体的 CDR 序列移植到人的抗体可变区框架区（或构架区，framework region）中产生的抗体。人源化抗体可以克服嵌合抗体由于携带大量异源蛋白成分，从而诱导的异源性反应。此类框架区的序列可以从包括种系抗体基因序列的公共 DNA 数据库或公开的参考文献获得。如人重链和轻链可变区基因的种系 DNA 序列可以在“VBase”人种系序列数据库（在因特网 <http://www.vbase2.org/> 获得），以及在 Kabat, E.A. 等人, 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版中找到。

为避免免疫原性下降引起的活性下降，可对所述的人抗体可变区框架序列进行最少的反向突变或回复突变，以保持活性。本公开的人源化抗体也包括进一步由噬菌体展示对 CDR 进行亲和力成熟后的人源化抗体。

由于抗原的接触残基，CDR 的移植可由于与抗原接触的构架残基而导致产生的抗体或其抗原结合片段对抗原的亲和力减弱。此类相互作用可以可能是体细胞高度突变的结果。因此，可能仍然需要将此类供体构架氨基酸移植至人源化抗体的构架。来自非人抗体或其抗原结合片段的参与抗原结合的氨基酸残基可通过检查动物单克隆抗体可变区序列和结构来鉴定。CDR 供体构架中与种系不同的各残基可被认为是相关的。如果不能确定最接近的种系，那么可将序列与亚类共有序列或具有高相似性百分数的动物抗体序列的共有序列相比较。稀有构架残基被认为可能是体细胞高度突变的结果，从而在结合中起着重要作用。

在本公开一个的实施方案中，所述的抗体或其抗原结合片段，可进一步包含人源或鼠源 κ 、 λ 链或其变体的轻链恒定区，或进一步包含人源或鼠源 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 或其变体的重链恒定区。

人抗体重链恒定区和人抗体轻链恒定区的“常规变体”是指现有技术已公开的来源于人的不改变抗体可变区结构和功能的重链恒定区或轻链恒定区的变体，示例性变体包括对重链恒定区进行定点改造和氨基酸替换的 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 重链恒定区变体，具体替换如现有技术已知的 YTE 突变，L234A 和/或 L235A

突变,或 S228P 突变,或获得 knob-into-hole 结构的突变(使得抗体重链具有 knob-Fc 和 hole-Fc 组合),这些突变已被证实使得抗体具有新的性能,但不改变抗体可变区的功能。

“人抗体”与“人源抗体”可以互换使用,可以是源于人的抗体或者是从一种转基因生物体中获得的抗体,该转基因生物体经“改造”以响应于抗原刺激而产生特异性人抗体并且可以通过本领域已知的任何方法产生。在某些技术中,将人重链和轻链基因座的元件引入到源于胚胎干细胞系的生物体的细胞株中,这些细胞株中的内源性重链和轻链基因座被靶向破坏。转基因生物可以合成对人抗原特异的人抗体,并且该生物可以用于产生人抗体-分泌杂交瘤。人抗体还可以是一种抗体,其中重链和轻链是由源于一个或多个个人 DNA 来源的核苷酸序列编码的。完全人抗体还可以通过基因或染色体转染方法以及噬菌体展示技术来构建,或者由体外活化的 B 细胞构建,所有的这些都是本领域已知的。

“单克隆抗体”是指从基本上均质抗体的群体获得的抗体,即除可能的变体抗体(例如含有天然存在的突变或在制造单克隆抗体制剂的期间产生的突变,这些变体通常以少量存在)之外,构成所述群体的个别抗体识别相同和/或结合相同表位。与通常包含针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制备物不同,单克隆抗体制备物(制剂)的每个单克隆抗体是针对抗原上的单一决定簇的。因此,修饰语“单克隆”指示如从基本上均质抗体群体获得的抗体的特性,且不应解释为需要通过任何特定方法来制造抗体。例如,根据本公开使用的单克隆抗体可通过各种技术制备,所述技术包括但不限于杂交瘤方法、重组 DNA 方法、噬菌体展示方法以及利用含有全部或部分人免疫球蛋白基因座的转基因动物的方法,此类方法以及用于制备单克隆抗体的其他示例性方法在本文中进行描述。术语“单克隆抗体或其抗原结合片段”中单克隆抗体指全长抗体。

术语“全长抗体”、“完整抗体”、“完全抗体”和“全抗体”在本文中可互换使用,指基本上完整形式的抗体,与下文定义的抗原结合片段相区分。该术语特别指重链由氨基端至羧基端依次包含 VH 区、CH1 区、铰链区和 Fc 区,轻链由氨基端至羧基端依次包含 VL 区和 CL 区的抗体。

此外,虽然 Fv 片段的两个结构域 VL 和 VH 由分开的基因编码,但可使用重组方法,通过合成的接头连接它们,从而使其能够产生为其中 VL 和 VH 区配对形成单价分子的单个蛋白质链(称为单链 Fv(scFv);参见,例如, Bird 等人(1988) Science242: 423-426; 和 Huston 等人(1988) Proc.Natl.Acad.Sci USA85:5879-5883)。此类单链抗体也意欲包括在术语抗体的“抗原结合片段”中。使用本领域技术人员已知的常规技术获得此类抗体片段,并且以与对于完整抗体的方式相同的方式就功用性筛选的片段。可通过重组 DNA 技术或通过酶促或化学断裂完整免疫球蛋白来产生抗原结合部分。

抗原结合片段还可并入至包含一对串联 Fv 片段(VH-CH1-VH-CH1)的单链

分子中，该对串联 Fv 片段连同互补轻链多肽一起形成一对抗原结合区（Zapata 等人,1995 Protein Eng.8（10）:1057-1062；及美国专利 US5641870）。

5 Fab 是通过用木瓜蛋白酶（切割 H 链的 224 位的氨基酸残基）处理 IgG 抗体分子所获得的具有约 50,000Da 分子量的抗体片段，其具有抗原结合活性，其中 H 链 N 端侧的约一半和整个 L 链通过二硫键结合在一起。

F(ab')₂ 是通过用胃蛋白酶消化 IgG 铰链区中两个二硫键的下方部分而获得的分子量为约 100,000Da 的抗体片段，并具有抗原结合活性并包含在铰链位置相连的两个 Fab 区。

10 Fab' 是通过切割上述 F(ab')₂ 的铰链区的二硫键而获得的分子量为约 50,000Da 并具有抗原结合活性的抗体片段。Fab' 可以通过用还原剂例如二硫苏糖醇处理特异性识别并结合抗原的 F(ab')₂ 来生产。

此外，可以通过将编码抗体的 Fab' 片段的 DNA 插入到原核生物表达载体或真核生物表达载体中并将载体导入到原核生物或真核生物中以表达 Fab' 来生产所述 Fab'。

15 术语“单链抗体”、“单链 Fv”或“scFv”意指包含通过接头连接的抗体重链可变结构域（或区域；VH）和抗体轻链可变结构域（或区域；VL）的分子。此类 scFv 分子可具有一般结构：NH₂-VL-接头-VH-COOH 或 NH₂-VH-接头-VL-COOH。合适的现有技术接头由重复的 GGGGS 氨基酸序列或其变体组成，例如使用 1-4 个（包括 1 个、2 个、3 个或 4 个）重复的变体（Holliger 等人（1993），Proc Natl Acad Sci USA. 90: 6444-6448）。可用于本公开的其他接头由 Alfthan 等人（1995），Protein Eng. 8:725-731，Choi 等人（2001），Eur J Immuno.31:94-106，Hu 等人（1996），Cancer Res.56:3055-3061，Kipriyanov 等人（1999），J Mol Biol. 293:41-56 和 Roovers 等人（2001），Cancer Immunol Immunother. 50:51-59 描述。

25 “Linker”或“接头”或“连接子”指用于连接蛋白质结构域的连接性多肽序列，通常具有一定的柔性，接头的使用不会使蛋白质结构域原有的功能丧失。

双抗体（diabody）是指 scFv 被二聚体化的抗体片段，是具有二价抗原结合活性的抗体片段。在二价抗原结合活性中，两个抗原可以是相同或不同的。

dsFv 是通过将其中每个 VH 和 VL 中的一个氨基酸残基被半胱氨酸残基取代的多肽经由半胱氨酸残基之间的二硫键相连而获得的。可以按照已知方法（Protein Engineering.7:697（1994））基于抗体的三维结构预测来选择被半胱氨酸残基取代的氨基酸残基。

30 本公开一些实施例中抗原结合片段可以通过以下步骤来生产：获得本公开的特异性识别并结合抗原的单克隆抗体的 VH 和/或 VL 及所需的其他结构域的编码 cDNA，构建编码抗原结合片段的 DNA，将所述 DNA 插入到原核生物表达载体或真核生物表达载体中，然后将所述表达载体导入到原核生物或真核生物中以表达抗原结合片段。

"Fc 区"可以是天然序列 Fc 区或变体 Fc 区。虽然免疫球蛋白重链的 Fc 区的边界可能变化,但人 IgG 重链 Fc 区通常被定义成从位置 Cys226 上的氨基酸残基或从 Pro230 延伸至其羧基端。Fc 区中的残基的编号为如 Kabat 中的 EU 索引的编号。Kabat 等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991。免疫球蛋白的 Fc 区通常具有两个恒定区结构域 CH2 和 CH3。

"knob-Fc"指在抗体 Fc 区包含 T366W 的点突变,以形成类似 knob 的空间结构。相对应地,"hole-Fc"指在抗体 Fc 区包含 T366S, L368A, Y407V 的点突变,以形成类似 hole 的空间结构。Knob-Fc 和 hole-Fc 由于空间位阻的原因,更易形成异二聚体。为进一步地促进异二聚体的形成,还可在 knob-Fc 和 hole-Fc 分别引入 S354C 和 Y349C 的点突变,通过二硫键进一步促进异二聚体的形成。同时,为消除或减弱抗体 Fc 引起的 ADCC 效应,还可向 Fc 引入的 234A 和 235A 的取代突变。在双特异性抗体中, knob-Fc 或 hole-Fc 既可以作为第一多肽链的 Fc 区域,也可以作为第二多肽链的 Fc 区域,在同一双特异性抗体中,第一多肽链和第二多肽链的 Fc 区不同时为 knob-Fc 或 hole-Fc。

术语“氨基酸差异”或“氨基酸突变”是指相较于原蛋白质或多肽,变体蛋白质或多肽存在氨基酸的改变或突变,包括在原蛋白质或多肽的基础上发生 1 个或数个氨基酸的插入、缺失或替换。

抗体的“可变区”是指单独的或组合的抗体轻链的可变区(VL)或抗体重链的可变区(VH)。如在本领域中已知的,重链和轻链的可变区各自自由通过 3 个互补决定区(CDR)(也称为高变区)连接的 4 个框架区(FR)组成。每一条链中的 CDR 通过 FR 紧密地保持在一起并且与来自另一条链的 CDR 一起促成抗体的抗原结合部位的形成。存在至少 2 个用于确定 CDR 的技术:(1)基于跨种序列变异性的方法(即, Kabat 等 Sequences of Proteins of Immunological Interest, (第 5 版, 1991, National Institutes of Health, Bethesda MD)); 和(2)基于抗原-抗体复合物的晶体学研究的方法(Al-Lazikani 等, J. Molec. Biol. 273:927-948 (1997))。如本文中所示, CDR 可指由任一方法或由两种方法的组合确定的 CDR。

术语“抗体框架”或“FR 区”,是指可变结构域 VL 或 VH 的一部分,其用作该可变结构域的抗原结合环(CDR)的支架。从本质上讲,其是不具有 CDR 的可变结构域。

术语“互补决定区”和“CDR”是指抗体的可变结构域内主要促成抗原结合的 6 个高变区之一。通常,每个重链可变区中存在三个 CDR (HCDR1、HCDR2、HCDR3)和每个轻链可变区中存在三个 CDR (LCDR1、LCDR2、LCDR3)。可以使用各种公知方案中的任何一种来确定 CDR 的氨基酸序列边界,包括“Kabat”编号规则(参见 Kabat 等(1991),“Sequences of Proteins of Immunological Interest”, 第 5 版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD)、“Chothia”

编号规则 (Al-Lazikani 等人, (1997) JMB 273: 927-948) 和 ImMunoGenTics (IMGT) 编号规则 (Lefranc M.P., Immunologist, 7,132-136 (1999); Lefranc, M.P.等, Dev. Comp. Immunol., 27,55-77 (2003)) 等。例如, 对于经典格式, 遵循 Kabat 规则, 所述重链可变域 (VH) 中的 CDR 氨基酸残基编号为 31-35 (HCDR1)、50-65 (HCDR2) 和 95-102 (HCDR3); 轻链可变域 (VL) 中的 CDR 氨基酸残基编号为 24-34 (LCDR1)、50-56 (LCDR2) 和 89-97 (LCDR3)。遵循 Chothia 规则, VH 中的 CDR 氨基酸编号为 26-32 (HCDR1)、52-56 (HCDR2) 和 95-102 (HCDR3); 并且 VL 中的氨基酸残基编号为 26-32 (LCDR1)、50-52 (LCDR2) 和 91-96 (LCDR3)。通过组合 Kabat 和 Chothia 两者的 CDR 定义, CDR 由人 VH 中的氨基酸残基 26-35 (HCDR1)、50-65 (HCDR2) 和 95-102 (HCDR3) 和人 VL 中的氨基酸残基 24-34 (LCDR1)、50-56 (LCDR2) 和 89-97 (LCDR3) 构成。遵循 IMGT 规则, VH 中的 CDR 氨基酸残基编号大致为 26-35 (CDR1)、51-57 (CDR2) 和 93-102 (CDR3), VL 中的 CDR 氨基酸残基编号大致为 27-32 (CDR1)、50-52 (CDR2) 和 89-97 (CDR3)。遵循 IMGT 规则, 抗体的 CDR 区可以使用程序 IMGT/DomainGap Align 确定。

“HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 区或其任意 CDR 变体”中的“其任意 CDR 变体”是指对 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 区中任意一个、或两个、或三个 HCDR 进行氨基酸突变获得的变体。

“抗体恒定区结构域”指来源于抗体的轻链和重链的恒定区的结构域, 包括 CL 和来源于不同类抗体的 CH1、CH2、CH3 和 CH4 结构域。

“表位”或“抗原决定簇”是指抗原上免疫球蛋白或抗体特异性结合的部位。表位通常以独特的空间构象包括至少 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 或 15 个连续或非连续的氨基酸。参见, 例如, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, 第 66 卷, G.E.Morris, Ed. (1996)。

术语“特异性结合”、“选择性结合”、“选择性地结合”和“特异性地结合”是指抗体对预先确定的抗原上的表位的结合。通常, 抗体以大约小于 10^{-8}M , 例如大约小于 10^{-9}M 、 10^{-10}M 、 10^{-11}M 或更小的亲和力 (KD) 结合。

当术语“竞争”用于竞争相同表位的抗原结合蛋白 (例如中和抗原结合蛋白或中和抗体) 的情况中时, 意指在抗原结合蛋白之间竞争, 其通过以下测定法来测定: 在所述测定法中, 待检测的抗原结合蛋白 (例如抗体或其抗原结合片段) 防止或抑制 (例如降低) 参考抗原结合蛋白 (例如配体或参考抗体) 与共同抗原的特异性结合。众多类型的竞争性结合测定可用于确定一种抗原结合蛋白是否与另一种竞争, 这些测定例如: 固相直接或间接放射免疫测定 (RIA)、固相直接或间接酶免疫测定 (EIA)、夹心竞争测定 (参见例如 Stahli 等, 1983, Methods in Enzymology 9: 242-253); 固相直接生物素-亲和素 EIA (参见例如 Kirkland 等, 1986, J.Immunol.137: 3614-3619)、固相直接标记测定、固相直接标记夹心测定 (参见例

如 Harlow 和 Lane, 1988, *Antibodies, A Laboratory Manual* (抗体, 实验室手册), Cold Spring Harbor Press); 用 I-125 标记物的固相直接标记 RIA (参见例如 Morel 等, 1988, *Molec.Immunol.*25: 7-15); 固相直接生物素-亲和素 EIA (参见例如 Cheung, 等, 1990, *Virology*176: 546-552); 和直接标记的 RIA (Moldenhauer 等, 1990, *Scand.J.Immunol.*32: 77-82)。通常所述测定法涉及使用能与带有未标记的检测抗原结合蛋白及标记的参考抗原结合蛋白结合的纯化抗原 (所述抗原在固态表面或细胞表面)。在待测抗原结合蛋白存在下, 测量结合于固态表面或细胞的标记的量, 来测量竞争性抑制。通常, 待测抗原结合蛋白是过量存在的。由竞争性测定 (竞争抗原结合蛋白) 鉴定的抗原结合蛋白包括: 结合与参考抗原结合蛋白同一表位的抗原结合蛋白; 和结合充分接近参考抗原结合蛋白的结合表位的邻近表位的抗原结合蛋白, 所述两个表位在空间上互相妨碍发生结合。在本公开实施例中提供关于用于测定竞争性结合的方法的其它详细资料。通常当竞争的抗原结合蛋白过量存在时, 其将抑制 (例如降低) 至少 40-45%、45-50%、50-55%、55-60%、60-65%、65-70%、70-75% 或 75% 或更多参考抗原结合蛋白与共同抗原的特异性结合。在某些情况下, 结合被抑制至少 80-85%、85-90%、90-95%、95-97% 或 97% 或更多。

术语“亲和力”是指在单一表位处, 抗体与抗原之间相互作用的强度。在各抗原位点内, 抗体“臂”的可变区通过弱非共价力与抗原在多个氨基酸位点处相互作用; 相互作用愈大, 亲和力愈强。如本文所用, 抗体或其抗原结合片段 (例如 Fab 片段) 的术语“高亲和力”通常是指具有 $1\text{E}^{-9}\text{M}$ 或更小的 K_D (例如 $1\text{E}^{-10}\text{M}$ 或更小的 K_D 、 $1\text{E}^{-11}\text{M}$ 或更小的 K_D 、 $1\text{E}^{-12}\text{M}$ 或更小的 K_D 、 $1\text{E}^{-13}\text{M}$ 或更小的 K_D 、 $1\text{E}^{-14}\text{M}$ 或更小的 K_D 等) 的抗体或抗原结合片段。

术语“KD”或“ K_D ”是指特定抗体-抗原相互作用的解离平衡常数。通常, 抗体以小于大约 $1\text{E}^{-8}\text{M}$, 例如小于大约 $1\text{E}^{-9}\text{M}$ 、 $1\text{E}^{-10}\text{M}$ 或 $1\text{E}^{-11}\text{M}$ 或更小的解离平衡常数 (KD) 结合抗原, 例如, 如使用表面等离子体共振 (SPR) 技术在 BIACORE 仪中测定的。KD 值越小, 亲和力越大。

术语“核酸分子”是指 DNA 分子和 RNA 分子。核酸分子可以是单链或双链的, 但优选是双链 DNA。当将核酸与另一个核酸序列置于功能关系中时, 核酸是“有效连接的”。例如, 如果启动子或增强子影响编码序列的转录, 那么启动子或增强子有效地连接至所述编码序列。

术语“载体”意指能够递送一个或多个目标基因或序列并且优选在宿主细胞中表达其的构建体。载体的示例包括, 但不限于, 病毒载体、裸露 DNA 或 RNA 表达载体、质粒、粘粒或噬菌体载体、与阳离子凝聚剂缔合的 DNA 或 RNA 表达载体、包封在脂质体中的 DNA 或 RNA 表达载体和某些真核生物细胞诸如生产细胞。

现有技术中熟知生产和纯化抗体和抗原结合片段的方法, 如冷泉港的抗体实验技术指南, 5-8 章和 15 章。例如, 鼠可以用抗原或其片段免疫, 所得到的抗体

能被复性、纯化，并且可以用常规的方法进行氨基酸测序。抗原结合片段同样可以用常规方法制备。本公开所述的抗体或抗原结合片段用基因工程方法在非人源的 CDR 区加上一个或多个个人源 FR 区。人 FR 种系序列可以通过比对 IMGT 人类抗体可变区种系基因数据库和 MOE 软件，从网站 <http://www.imgt.org/> 得到，或者从免疫球蛋白杂志，2001 ISBN 012441351 上获得。

术语“宿主细胞”是指已向其中引入了表达载体的细胞。宿主细胞可包括细菌、微生物、植物或动物细胞。易于转化的细菌包括肠杆菌科 (enterobacteriaceae) 的成员，例如大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 或沙门氏菌 (*Salmonella*) 的菌株；芽孢杆菌科 (Bacillaceae) 例如枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)；肺炎球菌 (*Pneumococcus*)；链球菌 (*Streptococcus*) 和流感嗜血菌 (*Haemophilus influenzae*)。适当的微生物包括酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 和毕赤酵母 (*Pichia pastoris*)。适当的动物宿主细胞系包括 CHO (中国仓鼠卵巢细胞系)、HEK293 细胞 (非限制性实施例例如 HEK293E 细胞) 和 NS0 细胞。

工程化的抗体或抗原结合片段可用常规方法制备和纯化。比如，编码重链和轻链的 cDNA 序列，可以克隆并重组至 GS 表达载体。重组的免疫球蛋白表达载体可以稳定地转染 CHO 细胞。作为一种可选的现有技术，哺乳动物类表达系统会导致抗体的糖基化，特别是在 Fc 区的高度保守 N 端位点。通过表达与抗原特异性结合的抗体得到稳定的克隆。阳性的克隆在生物反应器的无血清培养基中扩大培养以生产抗体。分泌了抗体的培养液可以用常规技术纯化。比如，用含调整过的缓冲液的蛋白 A 或蛋白 G Sepharose FF 柱进行纯化。洗去非特异性结合的组分。再用 pH 梯度法洗脱结合的抗体，用 SDS-PAGE 检测抗体片段，收集。抗体可用常规方法进行过滤浓缩。可溶的混合物和多聚体，也可以用常规方法去除，比如分子筛、离子交换。得到的产物需立即冷冻，如 -70℃，或者冻干。

“施用”、“给药”、“给予”、“处理”，当应用于动物、人、实验受试者、细胞、组织、器官或生物流体时，是指将外源性药物、治疗剂、诊断剂、组合物或者人为操作 (比如实施例中的“安乐死”) 提供给与动物、人、受试者、细胞、组织、器官或生物流体。“给予”和“处理”可以指例如治疗、药物代谢动力学、诊断、研究和实验方法。细胞的处理包括试剂与细胞的接触，以及试剂与流体的接触，其中所述流体与细胞接触。“给予”和“处理”还意指通过试剂、诊断、结合组合物或通过另一种细胞体外和离体处理例如细胞。“处理”当应用于人、兽医学或研究受试者时，是指治疗处理、预防或预防性措施，研究和诊断应用。

“治疗”意指给予受试者内用或外用治疗剂，例如包含本公开实施例的任一种化合物的组合物，所述受试者具 (或疑似患有、或易感于) 有一种或多种疾病症状，而已知所述治疗剂对这些症状具有治疗作用。通常，在受治疗受试者或群体中以有效缓解一种或多种疾病症状的量给予治疗剂，以诱导这类症状退化或抑制这类症状发展到任何临床有测量的程度。有效缓解任何具体疾病症状的治疗剂的量 (也

称作“治疗有效量”)可根据多种因素变化,例如受试者的疾病状态、年龄和体重,以及药物在受试者产生需要疗效的能力。通过医生或其它专业卫生保健人士通常用于评价该症状的严重性或进展状况的任何临床检测方法,可评价疾病症状是否已被减轻。尽管本公开的实施方案(例如治疗方法或制品)可能无法在缓解每个

5 目标疾病症状方面都有效,但是根据本领域已知的任何统计学检验方法如 Student t 检验、卡方检验、依据 Mann 和 Whitney 的 U 检验、Kruskal-Wallis 检验(H 检验)、Jonckheere-Terpstra 检验和 Wilcoxon 检验确定,其在统计学显著数目的受试者中应当减轻目标疾病症状。

“氨基酸保守修饰”或“氨基酸保守取代”指蛋白质或多肽中的氨基酸被具有相似特征(例如电荷、侧链大小、疏水性/亲水性、主链构象和刚性等)的其他氨基酸取代,从而使得在不改变蛋白质或多肽的生物活性或其他所需特性(例如抗原亲和力和/或特异性)的情况下,可以经常进行改变。本领域技术人员认识到,通常,多肽的非必需区域中的单个氨基酸取代基本上不改变生物活性(参见,例如,

10 Watson 等人,(1987) Molecular Biology of the Gene, The Benjamin/Cummings Pub. Co., 第 224 页(第 4 版))。此外,结构上或功能上相似的氨基酸的取代不太可能破坏生物活性。示例性氨基酸保守取代如下:

原始残基	保守取代
Ala (A)	Gly; Ser
Arg (R)	Lys; His
Asn (N)	Gln; His; Asp
Asp (D)	Glu; Asn
Cys (C)	Ser; Ala; Val
Gln (Q)	Asn; Glu
Glu (E)	Asp; Gln
Gly (G)	Ala
His (H)	Asn; Gln
Ile (I)	Leu; Val
Leu (L)	Ile; Val
Lys (K)	Arg; His
Met (M)	Leu; Ile; Tyr
Phe (F)	Tyr; Met; Leu
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Trp; Phe
Val (V)	Ile; Leu。

“有效量”、“有效剂量”是指获得任一种或多种有益的或所需的治疗结果所必需的药物、化合物或药物组合物的量。对于预防用途,有益的或所需的结果包括消除或降低风险、减轻严重性或延迟病症的发作,包括病症、其并发症和在病症的

发展过程中呈现的中间病理表型的生物化学、组织学和/或行为症状。对于治疗应用，有益的或所需的结果包括临床结果，如减少各种本公开靶抗原相关病症的发病率或改善所述病症的一个或多个症状，减少治疗病症所需的其它药剂的剂量，增强另一种药剂的疗效，和/或延缓受试者的本公开靶抗原相关病症的进展。

5 “外源性”指根据情况在生物、细胞或人体外产生的物质。

“内源性”指根据情况在细胞、生物或人体内产生的物质。

“同源性”、“同一性”在本文中可以互换，是指两个多核苷酸序列之间或两个多肽之间的序列相似性。当两个比较序列中的位置均被相同碱基或氨基酸单体亚基占据时，例如如果两个 DNA 分子的每一个位置都被腺嘌呤占据时，那么所述分子在该位置是同源的。两个序列之间的同源性百分率是两个序列共有的匹配或同源位置数除以比较的位置数×100 的函数。例如，在序列最佳比对时，如果两个序列中的 10 个位置有 6 个匹配或同源，那么两个序列为 60%同源；如果两个序列中的 100 个位置有 95 个匹配或同源，那么两个序列为 95%同源。通常，当比对两个序列时进行比较以给出最大百分比同源性。例如，可以通过 BLAST 算法执行比较，其中选择算法的参数以在各个参考序列的整个长度上给出各个序列之间的最大匹

10 配。

15

以下参考文献涉及经常用于序列分析的 BLAST 算法：BLAST 算法（BLAST ALGORITHMS）：Altschul, S.F.等人，（1990） J. Mol. Biol. 215:403-410；Gish, W.等人，（1993） Nature Genet. 3:266-272；Madden, T.L.等人，（1996） Meth. Enzymol. 266:131-141；Altschul, S.F.等人，（1997） Nucleic Acids Res. 25:3389-3402；Zhang, J.等人，（1997） Genome Res. 7:649-656。其他如 NCBI BLAST 提供的常规 BLAST 算法也为本领域技术人员所熟知。

20

“分离的”指加以改为“脱离其原始存在环境状态”，并且在这种情况下意味着，指定的分子基本上不含其他非目标生物分子。通常，术语“分离的”并不意图指完全不

25 不存在这些材料或不存在水、缓冲液或盐，除非它们以显著干扰如本文所述的化合物的实验或治疗用途的量存在。

“任选”或“任选地”意味着随后所描述地事件或环境可以但不必发生，该说明包括该事件或环境发生或不发生的场合。

“药物组合物”表示含有一种或多种本公开所述化合物或其生理学上/可药用的盐或前体药物与其他化学组分的混合物，所述其他组分例如生理学/可药用的载体和赋形剂。药物组合物的目的是促进对生物体的给药，利于活性成分的吸收进而发挥生物活性。

30

术语“药学上可接受的载体”指适合用于制剂中用于递送抗体或抗原结合片段的任何无活性物质。载体可以是抗粘附剂、粘合剂、包衣、崩解剂、充填剂或稀释剂、防腐剂（如抗氧化剂、抗菌剂或抗真菌剂）、增甜剂、吸收延迟剂、润湿剂、乳化剂、缓冲剂等。合适的药学上可接受的载体的示例包括水、乙醇、多元

35

醇（例如甘油、丙二醇、聚乙二醇等）右旋糖、植物油（例如橄榄油）、盐水、缓冲液、缓冲的盐水和等渗剂例如糖、多元醇、山梨糖醇和氯化钠。

术语“代谢障碍”的具体示例为代谢综合征、肥胖症、葡萄糖耐量受损、糖尿病、糖尿病酮症酸中毒、高血糖症、高血糖高渗综合征、围术期高血糖症、高胰岛素血症、胰岛素抵抗综合征、空腹血糖受损、血脂异常、动脉粥样硬化或糖尿病前期状态。

此外，本公开另一方面涉及用于免疫检测或测定目标抗原的方法、用于免疫检测或测定目标抗原的试剂、用于免疫检测或测定表达目标抗原的细胞的方法和用于诊断与目标抗原阳性细胞相关的疾病的诊断剂，其包含本公开的特异性识别并结合目标抗原的单克隆抗体或抗体片段作为活性成分。

在本公开中，用于检测或测定目标抗原的量的方法可以是任何已知方法。例如，它包括免疫检测或测定方法。

免疫检测或测定方法是使用标记的抗原或抗体检测或测定抗体量或抗原量的方法。免疫检测或测定方法的示例包括放射性物质标记的免疫抗体方法（RIA）、酶免疫测定法（EIA 或 ELISA）、荧光免疫测定法（FIA）、发光免疫测定法、蛋白质免疫印迹法、物理化学方法等。

上述与目标抗原阳性细胞相关的疾病可以通过用本公开的单克隆抗体或抗体片段检测或测定表达目标抗原的细胞来诊断。

为了检测表达多肽的细胞，可以使用已知的免疫检测方法，并优选使用免疫沉淀法、荧光细胞染色法、免疫组织染色法等。此外，可以使用利用 FMAT8100HTS 系统（Applied Biosystem）的荧光抗体染色法等。

在本公开中，对用于检测或测定目标抗原的活体样本没有特别限制，只要它具有包含表达目标抗原的细胞的可能性即可，例如组织细胞、血液、血浆、血清、胰液、尿液、粪便、组织液或培养液。

根据所需的诊断方法，含有本公开的单克隆抗体或其抗体片段的诊断剂还可以含有用于执行抗原-抗体反应的试剂或用于检测反应的试剂。用于执行抗原-抗体反应的试剂包括缓冲剂、盐等。用于检测的试剂包括通常用于免疫检测或测定方法的试剂，例如识别所述单克隆抗体、其抗体片段或其结合物的标记的第二抗体和与所述标记对应的底物等。

在以上说明书中提出了本发明一种或多种实施方式的细节。虽然可使用与本文所述类似或相同的任何方法和材料来实施或测试本发明，但是以下描述优选的方法和材料。通过说明书和权利要求书，本发明的其他特点、目的和优点将是显而易见的。在说明书和权利要求书中，除非上下文中有清楚的另外指明，单数形式包括复数指代物的情况。除非另有定义，本文使用的所有技术和科学术语都具有本发明所属领域普通技术人员所理解的一般含义。说明书中引用的所有专利和出版物都通过引用纳入本文。提出以下实施例是为了更全面地说明本发明的优选

实施方式。这些实施例不应以任何方式理解为限制本发明的范围，本发明的范围由权利要求书限定。

实施例

5 实施例 1: GCGR 抗原抗体的制备

1.1 抗原构建和筛选

将编码全长 477 个氨基酸的胰高血糖素受体的人类 GCGR cDNA 亚克隆到表达载体（如 pcDNA3.1）中，并转染 CHO-K1 细胞。在筛选和单细胞克隆后，选择单克隆用于抗原的表达、及基于受体的细胞表面表达的特性研究。以下 GCGR 抗原未特殊说明的均指人 GCGR。

全长GCGR：用于构建GCGR过表达细胞株，或用于免疫用抗原及后续检测：

MPPCQPQRPLLLLLLLACQPQVPSAQVMDFLFEKWKLYGDQCHHNSLL
PPPTELVCNRTFDKYSCWPDTPANTTANISCPWYLPWHHKVQHRFVFKRCGPD
GQWVRGPRGQPWRDASQCQMDGEEIEVQKEVAKMYSSFQVMYTVGYSLSLG
15 ALLLAILGGLSKLHCTRNAIHANLFASFVLKASSVLVIDGLLRTRYSQKIGDD
LSVSTWLS DGAVAGCRVA AVFMQYGIVANYCWLLVEGLYLHNLLGLATLPER
SFFSLYLIGWGAPMLFVVPWAVVKCLFENVQCWTSNDNMGFWWILRFPVFL
AILINFFIFVRIVQLLVAKLRARQMHTDYKFRLAKSTLTLIPLLGVHEVVFAFV
TDEHAQGTLRSAKLFFDLFLSSFQGLLVAVLYCFLNKEVQSELRRRWHRWRLG
20 KVLWEERNTSNHRASSSPGHGPPSKELQFGRGGGSQDSSAETPLAGGLPRLAES
PF (SEQ ID NO: 1)

1.2 GCGR杂交瘤、重组抗体的纯化

(1) 杂交瘤上清分离纯化/ProteinG 亲和层析：

对于小鼠杂交瘤上清纯化首选 ProteinG 进行亲和层析，将培养所得杂交瘤离心取上清，根据上清体积加入 10-15%体积的 1M Tris-HCl (pH8.0-8.5) 调节上清 pH。ProteinG 柱利用 6M 盐酸胍洗 3-5 倍柱体积，然后利用纯水清洗 3-5 倍柱体积；利用如 1×PBS (pH7.4) 缓冲体系作为平衡缓冲液对层析柱平衡 3-5 倍柱体积；细胞上清利用低流速上样结合，控制流速使保留时间约 1min 或更长时间；利用 1×PBS (pH7.4) 洗涤层析柱 3-5 倍柱体积至紫外吸收回落至基线；利用 0.1M 醋酸/醋酸钠 (pH3.0) 缓冲液进行样本洗脱，根据紫外检测收集洗脱峰，洗脱产物利用 1M Tris-HCl (pH8.0) 快速调节 pH 至 5-6 暂存。对于洗脱产物可以利用本领域技术人员熟知的方法进行溶液置换，如利用超滤管进行超滤浓缩及溶液置换至所需的缓冲体系，或者利用分子排阻如 G-25 脱盐替换成所需的缓冲体系，或者利用如 Superdex 200 等高分辨率分子排阻柱去除洗脱产物中的聚体成分以提高样本纯度。

35 (2) Protein A 亲和层析提取带 Fc 标签的双特异性蛋白或者抗体：

首先将表达 Fc 双特异性蛋白或者抗体的细胞培养上清进行高速离心收取上清。ProteinA 亲和柱利用 6M 盐酸胍洗 3-5 倍柱体积，然后利用纯水清洗 3-5 倍柱

体积。利用如 1×PBS (pH7.4) 缓冲体系作为平衡缓冲液对层析柱平衡 3-5 倍柱体积。细胞上清利用低流速上样结合, 控制流速使保留时间约 1min 或更长时间, 结合完毕后利用 1×PBS (pH7.4) 洗涤层析柱 3-5 倍柱体积至紫外吸收回落至基线。利用 0.1M 醋酸/醋酸钠 (pH3.0-3.5) 缓冲液进行样本洗脱, 根据紫外检测收集洗脱峰, 洗脱产物利用 1M Tris-HCl (pH8.0) 快速调节 pH 至 5-6 暂存。对于洗脱产物可以利用本领域技术人员熟知的方法进行溶液置换, 如利用超滤管进行超滤浓缩及溶液置换至所需的缓冲体系, 或者利用分子排阻如 G-25 脱盐替换成所需的缓冲体系, 或者利用如 Superdex 200 等高分辨率分子排阻柱去除洗脱产物中的聚体成分以提高样本纯度。

10

实施例 2: 抗人 GCGR 单克隆抗体的制备

2.1 免疫

(1) 小鼠免疫: 抗人 GCGR 单克隆抗体通过免疫小鼠产生。实验用 SJL 白小鼠, 雌性, 6-8 周龄 (北京维通利华实验动物技术有限公司, 动物生产许可证号: SCXK (京) 2012-0001)。饲养环境: SPF 级。小鼠购进后, 实验室环境饲养 1 周, 12/12 小时光/暗周期调节, 温度 20-25℃; 湿度 40-60 %。将已适应环境的小鼠按以下方案免疫。免疫抗原为 GCGR CHO-K1 稳转细胞。

免疫方案: 用佐剂 TiterMax® Gold Adjuvant (Sigma Cat No. T2684) 预先免疫小鼠, 腹膜内 (IP) 注射 0.1ml/只 (首次免疫)。15min 后, 腹膜内 (IP) 注射 GCGR CHO-K1 稳转细胞, 1E7 细胞/只。接种时间为第 0、14、28、42、56、70、84、98、112 天。于第 35、63、91 天取血, 用 ELISA 方法确定小鼠血清中的抗体滴度。在第 6-9 次免疫以后, 选择血清中抗体滴度高并且滴度趋于平台的小鼠进行脾细胞融合。在进行脾细胞融合前 3 天加强免疫, 腹膜内 (IP) 注射 1 E7 细胞/只的 GCGR CHO-K1 稳转细胞。

(2) 大鼠免疫: 使用 DNA (编码全长 hGCGR, 编码序列参见 Genbank 登录号: NM_000160) 免疫 6-8 周龄 SD 大鼠, 用 FACS 方法确定大鼠血清中的抗体滴度。在第 3-4 次免疫以后, 选择血清中抗体滴度高并且滴度趋于平台的大鼠进行脾细胞融合。在进行脾细胞融合前 3 天加强免疫。

2.2 脾细胞融合

采用优化的 PEG 介导的融合步骤将脾淋巴细胞与骨髓瘤细胞 Sp2/0 细胞 (ATCC® CRL-8287™) 进行融合得到杂交瘤细胞。融合的杂交瘤细胞以 0.5-1E6/ml 的密度用完全培养基 (含 20% FBS、1×HAT、1×OPI 的 IMEM 培养基) 重悬, 100μl/孔种于 96 孔板中, 37℃, 5%CO₂ 孵育 3-4 天后, 补充 HAT 完全培养基 100μl/孔, 继续培养 3-4 天至形成克隆。去除上清, 加入 200μl/孔的 HT 完全培养基 (含 20%FBS、1×HT 和 1×OPI 的 IMDM 培养基), 37℃, 5%CO₂ 培养 3 天后进行 ELISA 检测。

2.3 杂交瘤细胞筛选

根据杂交瘤细胞生长密度,用细胞结合 ELISA 方法进行杂交瘤培养上清检测。将测试呈为阳性的孔细胞及时进行扩增、冻存、和二到三次亚克隆直至获得单细胞克隆。

- 5 每次亚克隆细胞也均需进行 GCGR 细胞结合 ELISA 实验检测。通过实验筛选得到杂交瘤克隆,用无血清细胞培养法进一步制备抗体,按纯化实例纯化抗体,供在测试例中使用。

2.4 杂交瘤阳性克隆序列测定

- 10 从阳性杂交瘤中克隆序列过程如下。收集对数生长期杂交瘤细胞,用 Trizol (Invitrogen, Cat No.15596-018)按照试剂盒说明书步骤提取 RNA,用 PrimeScript™ Reverse Transcriptase 试剂盒反转录 (Takara, Cat No. 2680A)。将反转录得到的 cDNA 采用小鼠 Ig-Primer Set (Novagen, TB326 Rev.B 0503) 进行 PCR 扩增后测序。

- 15 从得到的 DNA 序列获得所筛选到的阳性克隆,用无血清细胞培养法制备抗体,按纯化实例纯化抗体,在测试例中使用基于细胞的 GCGR 结合阻断实验经过多轮筛选,得到来源于小鼠的杂交瘤克隆 1803, 1805, 1808 和 1810, 来源于大鼠的杂交瘤克隆 1817 和 1822。

表 1. GCGR 抗体轻链可变区和重链可变区序列

抗体名称	重链可变区 (SEQ ID NO)	轻链可变区 (SEQ ID NO)
m1803	QFQLHQSGAELVKPGASVKLSCKAT GYTFTDYWIEWVKQRPGHGLEWIG EILPGSTYTNENEKFKGRATFTAEP SSAYMQLSGLTTEDSAIYYCSRGLS TLMAVDYFDYWGGTTLTVSS (SEQ ID NO: 2)	DIQMTQTTSSLASLGDRVITIN CRASQDISNYLNWYQQKPDGT VKLLIYSSSTLHSGVPSRFSGSG SGTDYSLTISHLEQEDIATYFCQ QTNIFPWTFGGGTKLEI (SEQ ID NO: 3)
m1805	EVQLQQSGPELVKPGASVKIPCKTSG YTFTDYNMDWVKQSHGRSLEWIGSI DPDNGGTIYNQKFKGKATLTVDKSS STAYMELRSLTSEDNAVYYCTRDYY GSSSWFAYWGQGLTVTSA (SEQ ID NO: 4)	DVVMTQSPATLSVTPGDRVSL CRASQSISDYLHWYQQKSHESP RLLIKYASQSIGIPSRFSGSGSG SDFTLSINSVEPEDVGVYYCQN GHSFPYTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 5)
m1808	QVQLQQSGAELARPGASVKLSCKAS GDTFTTNGISWVKQRIGQGLEWIGE YPRSGNTYYNENFKGKATLTADKSS TTAYMELRRLTSEDSAVYFCARSITS VIGADYFDYWGGTTLTVSS (SEQ ID NO: 6)	DIQMTQTTSSLASLGDRVITISC RASQDISNYLNWYQQKPDGTV KLLIYSSSTLHSGVPSRFSGSGS GTDYSLTISNLEQEDIATYFCQ QGNTFPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 7)
m1810	QVQLQQSGTELARPGTSVTLCKAS GYTFTNYAISWVKQRTGQGLEWIGE IYPTSGNTYYNEKFKGKATLTADRS SKTMYMELRSLTSVDSAVYFCASGV	DIQMTQIPSSLSVSLGDRVITISC RASLDISNYLNWYQLKPDGTV KLLIYYTSTLHSGVSSRFSGSGS GTEYSLTISNLEQEDIATYFCQQ

	ITTVVSTDYFDYWGQGSPLTVSS (SEQ ID NO: 8)	GNMVPYTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 9)
rat1817	EVQLVESGGDLVQPGRSMKLSAAS GFTFSNYYMAWVRQAPTKGLEWVA SISTGGVNTYYRDSVKGRFTISRDN KNNLYLQMDSLRSEETATYYCARH TTADYFYGIYFALDAWGQGSVTVS S (SEQ ID NO: 10)	QFTLTQPKSVSGSLRSTITIPCE SSGDIGDSYVNWYQQHLGRPP LNVIYADVQRPSEVSDRFSGSI DSSSNSASLTITNLQMDDEADY FCQSYDTNIDIFFGGGKLTVL (SEQ ID NO: 11)
rat1822	EVRLVESGGDFVQPGRSVKLSCAAS GFTFSNYYMAWVRQAPTKGLEWVG SISTGGVNTYYRDSVKGRFTISRDN ESTLYLQMDSLRSEETATYYCARHT TPDYHYGIYFAMDAGWGQGSVTVS S (SEQ ID NO: 12)	QVTLTQPKSVSGSLRSTITIPCE RSSGDIGESYVNWYQQHLGRP PINVIYADDQRPSEVSDRFSGSI DSSSNSASLTITNLQVDDEADY FCQSYDSSIDIFFGGGKLTVL (SEQ ID NO: 13)

表 2. Kabat 编号的 CDR 区序列

抗体名称	重链CDR		轻链CDR	
m1803	HCDR1	<u>DYWIE</u> (SEQ ID NO: 14)	LCDR1	<u>RASQDISNYLN</u> (SEQ ID NO: 17)
	HCDR2	<u>EILPGSTYTNNEKFKG</u> (SEQ ID NO: 15)	LCDR2	<u>YSSTLHS</u> (SEQ ID NO: 18)
	HCDR3	<u>GLSTLMAVDYFDY</u> (SEQ ID NO: 16)	LCDR3	<u>QQTNI FPWT</u> (SEQ ID NO: 19)
m1805	HCDR1	<u>DYNMD</u> (SEQ ID NO: 20)	LCDR1	<u>RASQSISDY LH</u> (SEQ ID NO: 23)
	HCDR2	<u>SIDPDNGGTIYNQKFKG</u> (SEQ ID NO: 21)	LCDR2	<u>YASQIS</u> (SEQ ID NO: 24)
	HCDR3	<u>DYYGSSSWFAY</u> (SEQ ID NO: 22)	LCDR3	<u>QNGHSFPYT</u> (SEQ ID NO: 25)
m1808	HCDR1	<u>TNGIS</u> (SEQ ID NO: 26)	LCDR1	<u>RASQDISNYLN</u> (SEQ ID NO: 29)
	HCDR2	<u>EIYPRSGNTYYNENFKG</u> (SEQ ID NO: 27)	LCDR2	<u>YSSTLHS</u> (SEQ ID NO: 30)
	HCDR3	<u>SITSVIGADYFDY</u> (SEQ ID NO: 28)	LCDR3	<u>QQGNTFPWT</u> (SEQ ID NO: 31)
m1810	HCDR1	<u>NYAIS</u> (SEQ ID NO: 32)	LCDR1	<u>RASLDISNYLN</u> (SEQ ID NO: 35)
	HCDR2	<u>EIYPTSGNTYYNEKFKG</u> (SEQ ID NO: 33)	LCDR2	<u>YTSTLHS</u> (SEQ ID NO: 36)
	HCDR3	<u>GVITTVVSTDYFDY</u> (SEQ ID NO: 34)	LCDR3	<u>QQGNMVPYT</u> (SEQ ID NO: 37)
rat1817	HCDR1	<u>NYYMA</u> (SEQ ID NO: 38)	LCDR1	<u>ERSSGDIGDSYVN</u> (SEQ ID NO: 41)
	HCDR2	<u>SISTGGVNTYYRDSVKG</u> (SEQ ID NO: 39)	LCDR2	<u>ADVQRPS</u> (SEQ ID NO: 42)
	HCDR3	<u>HTTADYFYGIYFALDA</u>	LCDR3	<u>QSYDTNIDI</u>

		(SEQ ID NO: 40)		(SEQ ID NO: 43)
rat1822	HCDR1	<u>NYDMA</u> (SEQ ID NO: 38)	LCDR1	<u>ERSSGDIGESYVN</u> (SEQ ID NO: 45)
	HCDR2	<u>SISTGGVNTYYRDSVKG</u> (SEQ ID NO: 39)	LCDR2	<u>ADDQRPS</u> (SEQ ID NO: 46)
	HCDR3	<u>HTTDPYHYGIYFAMDA</u> (SEQ ID NO: 44)	LCDR3	<u>QSYDSSIDIF</u> (SEQ ID NO: 47)

经序列比对及计算机模拟发现, 上述小鼠来源抗体m1803、m1805、m1808和m1810的轻重链CDR序列具有较高的同源性, 大鼠来源抗体rat1817和rat1822的轻重链CDR序列具有较高的同源性, 其共有序列如下表所示:

表 3. 重链及轻链 CDR 区序列的共有序列

	重链CDR		轻链CDR	
小鼠来源抗体	HCDR1	X ₁ X ₂ X ₃ IX ₄ , 其中 X ₁ X ₂ X ₃ 选自 DYW、TNG 或 NYA, X ₄ 选自 E/S (SEQ ID NO: 48)	LCDR1	RASX ₁₇ DISNYLN, 其中 X ₁₇ 选自 L/Q, (SEQ ID NO: 51)
	HCDR2	EIX ₅ PX ₆ SX ₇ X ₈ TX ₉ YNEX ₃₁ FKG, 其中 X ₅ 选自 L/Y, X ₆ 选自 G/R/T, X ₇ 选自 T/G, X ₈ 选自 N/Y, X ₉ 选自 N/Y, X ₃₁ 选自 K 或 N (SEQ ID NO: 49)	LCDR2	YX ₁₈ STLHS, 其中 X ₁₈ 选自 S/T (SEQ ID NO: 52)
	HCDR3	X ₃₁ X ₁₀ X ₁₁ X ₁₂ X ₁₃ X ₁₄ X ₁₅ X ₁₆ DYFDY, 其中 X ₁₀ 选自 I/L/VI, X ₁₁ 选自 S/T, X ₁₂ 选自 S/T, X ₁₃ 选自 L/V, X ₁₄ 选自 M/V/I, X ₁₅ 选自 S/G/A, X ₁₆ 选自 T/A/V, X ₃₁ 选自 G 或 S。 (SEQ ID NO: 50)	LCDR3	QQX ₁₉ NX ₂₀ X ₂₁ PX ₂₂ T, 其中 X ₁₉ 选自 T/G, X ₂₀ 选自 M/T/I, X ₂₁ 选自 F/V, X ₂₂ 选自 W/Y (SEQ ID NO: 53)
大鼠来源抗体	HCDR1	NYDMA (SEQ ID NO: 38)	LCDR1	ERSSGDIGX ₂₆ SYVN, 其中 X ₂₆ 选自 E/D (SEQ ID NO: 55)
	HCDR2	SISTGGVNTYYRDSVKG (SEQ ID NO: 39)	LCDR2	ADX ₂₇ QRPS, 其中 X ₂₇ 选自 D/V (SEQ ID NO: 56)
	HCDR3	HTTX ₂₃ DYX ₂₄ YGIYFAX ₂₅ DA, 其中 X ₂₃ 选自 P/A, X ₂₄ 选自 F/H, X ₂₅ 选自 L/M (SEQ ID NO: 54)	LCDR3	QSYDX ₂₈ X ₂₉ IDIX ₃₀ , 其中 X ₂₈ 选自 S/T, X ₂₉ 选自 S/N, X ₃₀ 选自 F/I (SEQ ID NO: 57)

5

实施例 3: 鼠源抗人 GCGR 抗体的人源化

使用 MOE 软件, 比对 IMGT 人类抗体轻重链可变区种系基因数据库, 分别挑

选与鼠源抗体同源性高的重链和轻链可变区种系基因作为模板。将鼠源抗体的 CDR 分别移植到相应的人源模板中，形成次序为 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 的可变区序列。根据需要，将骨架序列中部分氨基酸回复突变为鼠源抗体对应的氨基酸，即得到人源化抗 GCGR 单克隆抗体。

5 其中 CDR 区氨基酸残基的确定由 Kabat 编号系统确定并注释。

上述鼠源抗体的轻重链可变区与人源抗体的轻重链恒定区连接后形成嵌合抗体，1803 号克隆对应的嵌合抗体命名为 ch1803，其他抗体类推。

3.1 杂交瘤克隆 1803 的人源化

(1) 杂交瘤克隆 1803 人源化构架选择：

10 鼠源抗体 m1803 的人源化轻链模板为 IGKV1-39*01 和 hjk4.1，人源化重链模板为 IGHV1-3*01 和 hjh6.1，人源化可变区序列如下：

hu1803VH-CDR 嫁接：(SEQ ID NO: 61)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYWIEWVRQAPGQGLEWMGEIL
PGSTYTNYNEKFKGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGLSTLMAVDY
15 FDYWGQGTTVTVSS;

hu1803VL-CDR 嫁接：(SEQ ID NO: 58)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYSSTL
HSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYCQQTNIFPWTFGGGTKVEIK;

20 注：顺序为 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4，序列中斜体为 FR 序列，下划线为 CDR 序列。

(2) 杂交瘤克隆 1803 号的人源化模板选择和回复突变设计如下表：

表 4. 模板选择和回复突变

hu1803_VL		hu1803_VH	
hu1803_VL.1	嫁接	hu1803_VH.1	嫁接
hu1803_VL.1A	K42G、 P44V、 F71Y、 Y87F	hu1803_VH.1A	M69F、 R71A、 V78A
hu1803_VL.1B	P44V、 F71Y	hu1803_VH.1B	M48I、 V67A、 M69F、 R71A、 V78A、 A93S
		hu1803_VH.1C	R38K、 M48I、 V67A、 M69F、 R71A、 T73P、 V78A、 A93S

注：如 P44V 表示依照 Kabat 编号系统，将 Kabat 编号的第 44 位 P 突变回 V。嫁接代表鼠抗体 CDR 直接植入人种系 FR 区序列。

25 (3) 杂交瘤克隆 1803 的人源化具体序列如下：

> hu1803_VL.1 (同 Hu1803VL-CDR 嫁接)：(SEQ ID NO: 58)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYSSTL
HSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYCQQTNIFPWTFGGGTKVEIK

> hu1803_VL.1A：(SEQ ID NO: 59)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGGAVKLLIYSSSTL
HSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYFCQQTNIFPWTFGGGTKVEIK

> hu1803_VL.1B: (SEQ ID NO: 60)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAVKLLIYSSSTL
HSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQTNIFPWTFGGGTKVEIK

> hu1803_VH.1 (同 Hu1803VH-CDR 嫁接): (SEQ ID NO: 61)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYWIEWVRQAPGQGLEWMGEIL
PGSTYTNYNEKFKGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGLSTLMAVDY
FDYWGQGTTVTVSS

> hu1803_VH.1A: (SEQ ID NO: 62)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYWIEWVRQAPGQGLEWMGEIL
PGSTYTNYNEKFKGRVTFTADTSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARGLSTLMAVDY
FDYWGQGTTVTVSS

> hu1803_VH.1B: (SEQ ID NO: 63)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYWIEWVRQAPGQGLEWIGEILP
GSTYTNYNEKFKGRATFTADTSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCSRGLSTLMAVDYF
DYWGQGTTVTVSS

> hu1803_VH.1C: (SEQ ID NO: 64)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYWIEWVKQAPGQGLEWIGEILP
GSTYTNYNEKFKGRATFTADPSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCSRGLSTLMAVDYF
DYWGQGTTVTVSS。

(4) 杂交瘤克隆 1803 来源抗体的人源化抗体轻链可变区和重链可变区序列组合如下:

表 5. 不同人源化抗体轻重链可变区组合

	hu1803_VL.1	hu1803_VL.1A	hu1803_VL.1B
hu1803_VH.1	hu1803-1	hu1803-5	hu1803-9
hu1803_VH.1A	hu1803-2	hu1803-6	hu1803-10
hu1803_VH.1B	hu1803-3	hu1803-7	hu1803-11
hu1803_VH.1C	hu1803-4	hu1803-8	hu1803-12

上表中抗体名称所指代的抗体轻重链可变区可以分别与抗体轻重链恒定区连接形成全长抗体。在本公开中如无明确说明时,形成全长抗体时轻链可变区与 SEQ ID NO: 73 所示的 Kappa 链恒定区连接形成抗体轻链,重链可变区与 SEQ ID NO: 72 所示的 IgG4-AA 连接形成抗体重链。

3.2 杂交瘤克隆 1810 的人源化

(1) 杂交瘤克隆 1810 人源化构架选择:

鼠源抗体 m1810 的人源化轻链模板为 IGKV1-39*01 和 hJK4.1,人源化重链模板为 IGHV1-69*02 和 hJH4.1,人源化可变区序列如下:

Hu1810VH-CDR 嫁接: (SEQ ID NO: 68)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSNYAISWVRQAPGQGLEWMGEIY
PTSGNTYYNEKFVKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGVITTVVSTDY
FDYWGQGTLLTVSS

Hu1810VL-CDR 嫁接: (SEQ ID NO: 65)

5 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASLDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSTL
HSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQGNMVPYTFGGGTKVEIK

注: 顺序为 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4, 序列中斜体为 FR 序列,
 下划线为 CDR 序列。

(2) 杂交瘤克隆 1810 号的人源化模板选择和回复突变设计如下表:

10

表 6. 模板选择和回复突变

hu1810_VL		hu1810_VH	
hu1810_VL.1	嫁接	hu1810_VH.1	嫁接
hu1810_VL.1A	P44V, P59S, F71Y	hu1810_VH.1A	K73R, A78M, R94S
hu1810_VL.1B	Q38L, P44V, P59S, D70E, F71Y	hu1810_VH.1B	M48I, V67A, I69L, K73R, A78M, R94S
		hu1810_VH.1C	R38K, M48I, R66K, V67A, I69L, K73R, A78M, R94S

注: 如 P44V 表示依照 Kabat 编号系统, 将 Kabat 编号的第 44 位 P 突变回 V。
 嫁接代表鼠抗体 CDR 直接植入人种系 FR 区序列。

(3) 杂交瘤克隆 1810 的人源化具体序列如下:

> hu1810_VL.1 (同 Hu1810VL-CDR 嫁接): (SEQ ID NO: 65)

15 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASLDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSTL
HSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQGNMVPYTFGGGTKVEIK

> hu1810_VL.1A: (SEQ ID NO: 66)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASLDISNYLNWYQQKPGKAVKLLIYYTSTL
HSGVSSRFSGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYYCQQGNMVPYTFGGGTKVEIK

20 > hu1810_VL.1B: (SEQ ID NO: 67)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASLDISNYLNWYQLKPGKAVKLLIYYTSTL
HSGVSSRFSGSGSGTEYTLTISLQPEDFATYYCQQGNMVPYTFGGGTKVEIK

> hu1810_VH.1 (同 Hu1810VH-CDR 嫁接): (SEQ ID NO: 68)

25 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSNYAISWVRQAPGQGLEWMGEIY
PTSGNTYYNEKFVKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGVITTVVSTDY
FDYWGQGTLLTVSS

> hu1810_VH.1A: (SEQ ID NO: 69)

30 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSNYAISWVRQAPGQGLEWMGEIY
PTSGNTYYNEKFVKGRVTITADRSTSTMELSSLRSEDTAVYYCASGVITTVVSTDY
FDYWGQGTLLTVSS

> hu1810_VH.1B: (SEQ ID NO: 70)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSNYAISWVRQAPGQGLEWIGEIYP
TSGNTYYNEKFKGRATLTADRSTSTMYMELSSLRSEDTAVYYCASGVITTVVSTDYF
DYWGQGTLVTVSS

> hu1810_VH.1C: (SEQ ID NO: 71)

5 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSNYAISWVKQAPGQGLEWIGEIYP
TSGNTYYNEKFKGKATLTADRSTSTMYMELSSLRSEDTAVYYCASGVITTVVSTDYF
DYWGQGTLVTVSS。

(4) 杂交瘤克隆 1810 的人源化抗体轻重链可变区序列组合如下:

表 7. 不同人源化抗体轻重链可变区的组合

	hu1810_VL.1	hu1810_VL.1A	hu1810_VL.1B
hu1810_VH.1	hu1810-1	hu1810-5	hu1810-9
hu1810_VH.1A	hu1810-2	hu1810-6	hu1810-10
hu1810_VH.1B	hu1810-3	hu1810-7	hu1810-11
hu1810_VH.1C	hu1810-4	hu1810-8	hu1810-12

10 上表中抗体名称所指代的抗体轻重链可变区可以分别与抗体轻重链恒定区连接形成全长抗体, 在本公开中如无明确说明时, 形成全长抗体时轻链可变区与 SEQ ID NO: 73 所示的 Kappa 链恒定区连接形成抗体轻链, 重链可变区与 SEQ ID NO: 72 所示的 IgG4-AA 连接形成抗体重链。

15 实施例 4: 构建和表达 GCGR 嵌合体/人源化抗体的 IgG4-AA 形式

设计引物, PCR 搭建各嵌合体/人源化抗体 VH/VK 基因片段, 再与表达载体 pHr (带信号肽及恒定区基因 (CH1-FC/CL) 片段) 进行同源重组, 构建抗体全长表达载体 VH-CH1-FC-pHr/VK-CL-pHr。IgG4-AA 抗体形式可以通过 IgG4 抗体形式简单点突变获得, IgG4-AA 代表 F234A、L235A 和 S228P 突变。F234A 和 L235A 的突变可降低 IgG4-Fc 与 FcγR 的结合能力, 进一步降低 ADCC/CDC, S228P 代表野生型 IgG4 较链区第 228 位的氨基酸 S 突变成 P, 该位点突变能够避免天然 IgG4 抗体在体内发生 Fab-交换 (exchange) 导致的错配。

25 ch1803、ch1805、ch1808、ch1810、ch1817 和 ch1822 为表 1 所示动物来源的轻重链可变区分别与人抗体 kappa 链和人抗体 IgG4-AA 重链恒定区连接后形成的嵌合抗体。

IgG4-AA 的重链恒定区序列如下: (SEQ ID NO: 72)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPP
CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYV
30 DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSLGK;

抗体的轻链（Kappa 链）恒定区序列如下：（SEQ ID NO: 73）

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
SQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
EC;

5 构建后的抗体序列示例性列举如下：

ch1803：抗体形式 IgG4AA

ch1803 重链序列：（SEQ ID NO: 74）

QFQLHQSGAELVKPGASVKLSCKATGYTFTDYWIEWVKQRPBGHGLEWIG
EILPGSTYTNVNEKFKGRATFTAEPSSSSAYMQLSGLTTEDSAIYYCSRGLSTLM
10 AVDYFDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP
VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVTVPSSSLGKTYTCNVDPHKPS
NTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLV
15 KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK;

ch1803 轻链序列：（SEQ ID NO: 75）

DIQMTQTTSSLSASLGDRVTINCRASQDISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYSS
STLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISHLEQEDIATYFCQQTNIFPWTFGGGKLEIRT
20 VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV
TEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC;

hu1803-1：抗体形式 IgG4AA

hu1803-1 重链序列：（SEQ ID NO: 76）

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTDYWIEWVRQAPGQGLEWM
25 GEILPGSTYTNVNEKFKGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGLST
LMAVDYFDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP
EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVTVPSSSLGKTYTCNVDPHKP
SNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
30 KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK;

hu1803-1 轻链序列：（SEQ ID NO: 77）

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYSS
35 TLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQTNIFPWTFGGGKVEIKR
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
VTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC;

hu1803-9 重链序列：（SEQ ID NO: 78）

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTDYWIEWVRQAPGQGLEWM

GEILPGSTYTNNEKFKGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED~~TAVYYC~~ARGLST
 LMAVDYFDYWGQGTTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF
 PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKITYTCNVDH
 KPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
 5 VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDW
 LNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL
 LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEG
 NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK;

hu1803-9 轻链序列: (SEQ ID NO: 79)

10 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAVKLLIYYSL
 STLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQTNIFPWTFGGGKTKVEI
 KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
 QESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC;

15 ch1805 重链序列: (SEQ ID NO: 80)

EVQLQQSGPELVKPGASVKIPCKTSGYTFTDYNMDWVKQSHGRSLEWIGS
IDPDNGGTIYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSED~~TAVYYC~~TRDYYGSS
SWFAYWGQGLTVTSAASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT
 VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKITYTCNVDHKPSNT
 20 KVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
 SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
 YKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGF
 YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS
 VMHEALHNHYTQKSLSLGLGK;

25 ch1805 轻链序列: (SEQ ID NO: 81)

DVVMTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQISDYLHWYQQKSHESPRLLIKYA
SQISIGIPSRFSGSGSGSDFTLSINSVEPEDVG~~VYYC~~QNGHSFPYTFGGGTKLEIK
 RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
 SVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC;

30 ch1808 重链序列: (SEQ ID NO: 82)

QVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGDTFTTNGISWVKQRIGQGLEWIGEI
YPRSGNTYYNENFKGKATLTADKSSSTAYMELRRLTSEDS~~AVYFCAR~~SITSVIG
ADYFDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPV
 TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKITYTCNVDHKPSN
 35 TKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
 VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
 KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK
 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS
 CSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK;

40 ch1808 轻链序列: (SEQ ID NO: 83)

DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQKKPDGTVKLLIYYSSTLH
 SGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQOGNTEPWTFGGGTKLEIKRTV
 AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
 EQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC;

5 hu1810-12 重链序列: (SEQ ID NO: 84)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSNYAISWVKQAPGQGLEWIGEIYP
TSGNTYYNEKFKGKATLTADRSTSTMYELSSLRSEDTAVYYCASGVITTVVSTDYF
DYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
 SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDK
 10 RVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDP
 EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
 VSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
 AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE
 ALHNHYTQKSLSLGLGK;

15 hu1810-12 轻链序列: (SEQ ID NO: 85)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASLDISNYLNWYQLKPGKAVKLLIYYTSTL
HSGVSSRFSGSGSGTEYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNMVPYTFGGGKVEIKRTVA
 APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
 QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC;

20 ch1817 重链序列: (SEQ ID NO: 86)

EVQLVESGGDLVQPGRSMKLSCAASGFTFSNYYMAWVRQAPTKGLEWV
 ASISTGGVNTYYRDSVKGRFTISRDNANKNNLYLQMDSLRSEETATYYCARHTT
ADYFYGIYFALDAWGQGTSVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK
 DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCN
 25 VDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
 TCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ
 DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL
 TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQE
 GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK;

30 ch1817 轻链序列: (SEQ ID NO: 87)

QFTLTQPKSVSGSLRSTITIPCERSSGDIGDSYVNWYQQHLGRPPLNVIYAD
VQRPSEVSDRFSGSIDSSNSASLTITNLQMDDEADYFCQSYDTNIDIIIFGGGKTL
 TVLRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
 SQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
 35 EC;

ch1822 重链序列: (SEQ ID NO: 88)

EVRLVESGGDFVQPGRSVKLSCAASGFTFSNYYMAWVRQAPTKGLEWVG
SISTGGVNTYYRDSVKGRFTISRDNAAESTLYLQMDSLRSEETATYYCARHTTPD
YHYGIYFAMDAWGQGTSVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD
 40 YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNV

5 DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
 CVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD
 WLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT
 CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQE
 GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG;

ch1822 轻链序列: (SEQ ID NO: 89)

QVTLTQPKSVSGSLRSTITIPCERSSGDIGESYVNWYQQHLGRPPINVIYAD
DQRPSEVSDRFSGSIDSSSNSASLTITNLQVDDEADYFCQSYDSSIDIFFGGGTKL
 TVLRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGN
 10 SQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
 EC;

阳性对照: 度拉糖肽是双链形式, 单链为 GLP-1/hIgG4 Fc (SEQ ID NO: 90)

HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGGSGGGGSGGGGSAES
 KYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQF
 15 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
 GLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
 ESNQGPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN
 HYTQKSLSLGLG。

20 实施例 5: 抗体双特异性蛋白的克隆和表达

采用人 GLP-1 肽作为双特异性蛋白中 GLP-1 受体激动剂部分, 将 GCGR 抗体
 作为双特异性蛋白的 GCGR 拮抗部分, 形成 GLP-1/GCGR 抗体双特异性蛋白。

研究发现, GLP-1 特定位点氨基酸突变 (如 Q17E、I23V、K28R 或 G30R) 后,
 形成的新 GLP-1/GCGR 抗体双特异性蛋白, 其体外稳定性更高, 其中将 GLP-1A
 25 第 17 位的 Q 突变为 E 和第 23 位的 I 突变为 V 形式 (GLP-1C), 稳定性最高。本
 公开 GLP-1 及其突变形式的非限制性实施例序列如下:

30

表 8. GLP-1A 多肽及其变体序列

GLP-1 肽名称 (相 对于 GLP-1A 的 突变点)	序列	SEQ ID NO
GLP-1A	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGG	91
GLP-1B (Q17E)	HGEGTFTSDVSSYLEEEAAKEFIAWLVKGGG	92

GLP-1C (Q17E G30R)	HGEGTFTSDVSSYLEEEAAKEFIAWLVKGRG	93
GLP-1D (Q17E I23V)	HGEGTFTSDVSSYLEEEAAKEFVAWLVKGGG	94
GLP-1E (Q17E I23V G30R)	HGEGTFTSDVSSYLEEEAAKEFVAWLVKGRG	95
GLP-1F (Q17E K28R)	HGEGTFTSDVSSYLEEEAAKEFIAWLVRGGG	96
GLP-1G (Q17E I23V K28R)	HGEGTFTSDVSSYLEEEAAKEFVAWLVRGGG	97
GLP-1H (Q17E K28R G30R)	HGEGTFTSDVSSYLEEEAAKEFIAWLVRGRG	98
GLP-1J (Q17E I23V K28R G30R)	HGEGTFTSDVSSYLEEEAAKEFVAWLVRGRG	99

利用同源重组技术，将本公开 GLP-1 肽的 C 末端氨基酸通过肽键或接头（linker）连接 GCGR 抗体重链 N 末端氨基酸。通过 293 表达系统进行常规表达，得到如表 9 所示的双特异性蛋白的模式结构：

5

表 9. GLP-1/GCGR 双特异性蛋白的结构模式

双特异性蛋白结构模式名称	结构模式 GLP-1-接头-Ab*
双特异性蛋白 1	GLP-1A -接头-Ab
双特异性蛋白 2	GLP-1B -接头-Ab
双特异性蛋白 3	GLP-1C -接头-Ab
双特异性蛋白 4	GLP-1D -接头-Ab
双特异性蛋白 5	GLP-1E -接头-Ab
双特异性蛋白 6	GLP-1F -接头-Ab
双特异性蛋白 7	GLP-1G -接头-Ab
双特异性蛋白 8	GLP-1H -接头-Ab
双特异性蛋白 9	GLP-1-I -接头-Ab

*注：Ab 为本公开所述 GCGR 抗体。GLP-1 肽可以连接至 GCGR 抗体重链可变区的氨基端或连接至 GCGR 抗体轻链可变区的氨基端。经试验验证，GLP-1 肽连接至 GCGR 抗体中重链可变区的氨基端的双特异性蛋白较连接至 GCGR 抗体轻

链可变区的氨基端稳定性更佳。本公开 GLP-1 肽连接至 GCGR 全长抗体重链可变区的部分实施方式中双特异性蛋白结构示意图如图 1 所示。

将不同 GLP-1 肽与不同抗体的重链氨基酸用接头（例如（GGGGS）₃）相连接，形成以下蛋白：

5

表 10. 双特异性蛋白序列

双特异性蛋白名称	第一条链（含重链部分（SEQ ID NO））： GLP-1 肽-接头-抗体重链（从 N 至 C）	第二条链（轻链部分）
hu1803-9A	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGG GSGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTDYWIEWVRQAPGQGLEWMGEILPGST YTNYNEKFKGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED AVYYCARGLSTLMAVDYFDYWGGQGT TVTVSSAS TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLGKTYTCNVDPHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG SFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSLGK（SEQ ID NO： 100）	DIQMTQSP SSLSASVG DRVTITCR ASQDISNY LNWYQQK PGKAVKLL IYYSSLHS GVPSRFSG SGSGTDYT LTISSLQPE DFATYYC QQTNIFPW TFGGGTKV EIKRTVAA PSVFIFPPS
hu1803-9B	HGEGTFTSDVSSYLEEEAAKEFIAWLVKGGGGGG GSGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTDYWIEWVRQAPGQGLEWMGEILPGST YTNYNEKFKGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED AVYYCARGLSTLMAVDYFDYWGGQGT TVTVSSAS TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLGKTYTCNVDPHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG SFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSLGK（SEQ ID NO： 101）	DEQLKSGT ASVVCLLN NFYPREAK VQWKVDN ALQSGNSQ ESVTEQDS KDSTYSL STLTLSKA DYEKHKV YACEVTH QGLSSPVT KSFNRGEC （SEQ ID NO： 79）
hu1803-9C	HGEGTFTSDVSSYLEEEAAKEFIAWLVKGRGGGG	

	GGSGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFTDYWIEWVRQAPGQGLEWMGEILPGS TYTNYNEKFKGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGLSTLMAVDYFDYWGGQTTVTVSSA STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGKTKTYTCNVDPHKPSNTKVDKRVESKYGPPCP PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 102)	
hu1803-9D	HGEFTFTSDVSSYLEEEAAKEFVAWLKGGGGGG GSGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTDYWIEWVRQAPGQGLEWMGEILPGST YTNYNEKFKGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED AVYYCARGLSTLMAVDYFDYWGGQTTVTVSSAS TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS SSLGKTKTYTCNVDPHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 103)	
hu1803-9E	HGEFTFTSDVSSYLEEEAAKEFVAWLKGRGGGG GGSGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFTDYWIEWVRQAPGQGLEWMGEILPGS TYTNYNEKFKGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGLSTLMAVDYFDYWGGQTTVTVSSA STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGKTKTYTCNVDPHKPSNTKVDKRVESKYGPPCP PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS	

	SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS GSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 104)	
hu1803-9F	HGEGTFTSDVSSYLEEEAAKEFIAWLVRGGGGGG GSGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTDYWIEWVRQAPGQGLEWMGEILPGST YTNYNEKFKGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED AVYYCARGLSTLMAVDYFDYWGGGTTVTVSSAS TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLGKTKYTCNVDPHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS GSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 105)	
hu1803-9G	HGEGTFTSDVSSYLEEEAAKEFVAVLVRGGGGGG GSGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTDYWIEWVRQAPGQGLEWMGEILPGST YTNYNEKFKGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED AVYYCARGLSTLMAVDYFDYWGGGTTVTVSSAS TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLGKTKYTCNVDPHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS GSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 106)	
hu1803-9H	HGEGTFTSDVSSYLEEEAAKEFIAWLVRGRGGGGG SGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC ASGYTFTDYWIEWVRQAPGQGLEWMGEILPGST YTNYNEKFKGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED AVYYCARGLSTLMAVDYFDYWGGGTTVTVSSAS KGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT	

	SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCP APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 107)	
hu1803-9J	HGEGTFTSDVSSYLEEEAAKEFVAWLVRGRGGGG GSGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTDYWIEWVRQAPGQGLEWMGEILPGST YTNYNEKFKGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED AVYYCARGLSTLMAVDYFDYWGGQTTVTVSSAS TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSLGTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 108)	
ch1805-D	HGEGTFTSDVSSYLEEEAAKEFVAWLKGGGGGG GSGGGGSGGGGSEVQLQQSGPELVKPGASVKIPCK TSGYTFTD <u>DYNMD</u> WVKQSHGRSLEWIGSIDPDNGG <u>TIYNQKFKG</u> KATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDTA VYYCTR <u>DYYGSSSWFAY</u> WGQGLTVTVSAASTKG PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAP EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSLGK (SEQ ID NO: 109)	ch1805 轻 链序列： (SEQ ID NO: 81)
ch1808-D	HGEGTFTSDVSSYLEEEAAKEFVAWLKGGGGGG	ch1808 轻

	GSGGGGSGGGGSQVQLQQSGAELARPGASVKLSC KASGDTFTTNGISWVKQRIGQGLEWIGEIYPRSGN TYYNENFKGKATLTADKSSTTAYMELRRLTSEDS AVYFCARSITSVIGADYFDYWGQGTTLTVSSASTK GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCP APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 110)	链序列： (SEQ ID NO: 83)
hu1810-12D	HGEGTFTSDVSSYLEEEAAKEFVAWLKGGGGGG GSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKA SGGTFSNYAISWVKQAPGQGLEWIGEIYPTSGNTYY NEKFKGKATLTADRSTSTMELSSLRSEDTAVYYCAS GVITTVVSTDYFDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPL APCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYT CNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRL TVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS LGK (SEQ ID NO: 111)	hu1810-12 轻链序列： (SEQ ID NO: 85)
ch1817-D	HGEGTFTSDVSSYLEEEAAKEFVAWLKGGGGGG GSGGGGSGGGGSEVQLVESGGDLVQPGRSMKLSC AASGFTFSNYYMAWVRQAPTKGLEWVASISTGGV NTYYRDSVKGRFTISRDNANKNNLYLQMDSLSEET ATYYCARHTTADYFYGIYFALDAWGQGTSTVTVSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPC PPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP	ch1817 轻 链序列： (SEQ ID NO: 87)

	SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVSFCSVMHEALHN HYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 112)	
ch1822-D	HGEGTFTSDVSSYLEEEAAKEFVAWLKGGGGGGG GSGGGGSGGGGSEVRLVESGGDFVQPGRSVKLSC AASGFTFSNYYMAWVRQAPTKGLEWVGSISTGGV NTYYRDSVKGRFTISRDNASTLYLQMDSLRSEET ATYYCARHTTPDYHYGIYFAMDAWGQGTSTVTVSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPCC PPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVSFCSVMHEALHN HYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 113)	ch1822 轻链 序列: (SEQ ID NO: 89)

此处双特异性蛋白中接头接头可选用 (GGGGS)₃, 在其他实施方式中也可以是肽键或其他常规用于多肽连接的接头, (GGGGS)₃ 的使用并不是对本公开双特异性蛋白接头的限制。编码 GLP-1 的核苷酸序列、编码 GCGR 抗体的核苷酸序列、接头蛋白片段 ((GGGGS)₃) 的核苷酸序列通过所属领域常规技术手段获得。利用同源重组技术将 GLP-1 的 C 末端核苷酸通过接头蛋白连接 GCGR 抗体的 N 末端核苷酸, 克隆到 Phr-BsmbI 载体上。重组的 GLP-1/GCGR 抗体双特异性蛋白在 293 细胞表达, 通过实施例 6 的方法进行纯化。纯化的蛋白可用于下述各实施例中。

实施例 6: 抗体双特异性蛋白的纯化

- 10 细胞培养液高速离心后收集上清, 利用亲和层析进行第一步纯化。层析介质为与 Fc 相互作用的 Protein A 或者衍生填料, 如 GE 的 Mabselect。平衡缓冲液为 1×PBS (137mmol/L NaCl, 2.7mmol/L KCl, 10mmol/L Na₂HPO₄, 2mmol/L KH₂PO₄, pH7.4), 平衡 5 倍柱体积后, 将细胞上清上样结合, 流速控制为样本在柱上保留时间 ≥ 1min。上样结束后, 用 1×PBS (pH7.4) 冲洗柱子, 直至 A280 紫外吸收降至基线。然后用 0.1M 甘氨酸 (pH3.0) 的洗脱缓冲液冲洗层析柱, 根据 A280 紫外吸收峰收集洗脱峰, 收集的洗脱样本用 1M Tris (pH8.5) 中和。

将上述中和后的洗脱样本超滤浓缩后进行体积排阻层析, 缓冲液为 1×PBS, 层析柱为 XK26/60 Superdex200 (GE), 流速控制在 4ml/min, 上样体积小于 5ml, 根据 A280 紫外吸收合并目的蛋白峰。收集的蛋白经 SEC-HPLC 鉴定纯度大于 95%, 经

LC-MS鉴定为正确后分装备用。得到GLP-1/GCGR抗体双特异性蛋白。

测试例

测试例 1: GCGR 嵌合抗体结合人、小鼠和食蟹猴 GCGR 的 ELISA 实验

5 抗 GCGR 抗体的结合力通过抗体与过表达 GCGR 的 CHO 细胞的结合实验来检测。通过转染的方法分别将人、小鼠和食蟹猴 GCGR 全长质粒转进 CHO 细胞中加压筛选两周后,检测 GCGR 的表达量。将过表达细胞固定于 96 孔板底后,抗体加入后信号的强弱被用于判断抗体和 GCGR 过表达 CHO 细胞的结合活性,三种种属 GCGR 抗体结合实验方法相同,以检测 GCGR 抗体结合人 GCGR 方法为例,具体实验方法如下:

10 将细胞以 $0.9-1.0 \times 10^6/\text{ml}$ 密度, $100\mu\text{l}/\text{孔}$ 接种于 96 孔板中过夜培养。弃上清,用 PBS 洗三遍后,加入 $100\mu\text{l}/\text{孔}$ 的细胞免疫固定液 (Beyotime, Cat Wo. P0098) 室温固定 1 小时, PBS 洗四遍。弃去液体后,加入用 PBS 稀释的 5% 脱脂牛奶 (BD skim milk, Cat Wo.232100) 封闭液 $200\mu\text{l}/\text{孔}$, 37°C 孵育箱孵育 3 小时进行封闭。封闭结束后,弃去封闭液,并用 PBST 缓冲液 (pH7.4 PBS 含 0.05% tweenW-20) 洗板 3 次后,加入 $50\mu\text{l}/\text{孔}$ 用样本稀释液稀释的不同浓度待测抗体 (杂交瘤纯化抗体、嵌合抗体或人源化抗体),放于 37°C 孵育箱孵育 2 小时。孵育结束后用 PBST 洗板 3 次,加入 $50\mu\text{l}/\text{孔}$ 用样本稀释液稀释的 HRP 标记的羊抗鼠二抗 (JacksoW ImmuWo Research, Cat Wo. 115-035-003) 或羊抗人二抗 (JacksoW ImmuWo Research, Cat Wo. 109-035-003), 37°C 孵育 1 小时。用 PBST 洗板 3 次后,加入 $50\mu\text{l}/\text{孔}$ TMB 显色底物 (KPL, Cat Wo. 52-00-03), 于室温孵育 10 min, 加入 $50\mu\text{l}/\text{孔}$ 1M H_2SO_4 终止反应,用酶标仪 (Thermo scientific Multiskan MK3) 在波长 450nm 处读取吸收值,用 GraphPad Prism 5 分析数据,计算 GCGR 嵌合抗体对 GCGR 过表达 CHO 细胞的结合 EC_{50} 值,结果见下表。

25 表 11. 嵌合抗体结合活性

抗体 EC_{50} (nM)	ch1803	ch1805	ch1808	ch1810	ch1817	ch1822
人 GCGR	0.1167	0.2969	0.6769	0.1168	0.1926	0.3834
小鼠 GCGR	0.7183	0.3428	1.019	0.4415	0.1638	0.5681
食蟹猴 GCGR	0.2128	0.3585	0.5356	0.2480	0.2968	0.4280

结果显示各嵌合抗体 ch1803、ch1805、ch1808、ch1810、ch1817 和 ch1822 均与人 GCGR 具有良好的细胞表面结合活性,并且与小鼠 GCGR 和食蟹猴 GCGR 也有较好的交叉亲和活性。

30 测试例 2: GCGR 嵌合抗体阻断 GCGR 配体与 GCGR 结合试验

1、测试目的:

通过 GCGR 嵌合抗体阻断 GCGR 配体胰高血糖素与 GCGR 结合试验来评估

GCGR 嵌合抗体的拮抗活性。

2、测试原理：

cAMP 与 CRE 结合可启动 CRE 下游荧光素酶基因 (luciferase) 的表达，荧光素酶与其底物结合后发出荧光，通过荧光信号变化反映抑制效率。将 CRE 克隆至荧光素酶基因的上游，通过与含 GCGR 基因的质粒共转染 CHO-K1 细胞，挑选出同时高表达 CRE 及 GCGR 的单克隆细胞。GLP-1/GCGR 抗体双特异性蛋白和胰高血糖素可竞争性的与 GCGR 结合，阻断 GCGR 的下游信号传递，影响下游 cAMP 的表达，通过测定荧光信号变化可评估 GLP-1/GCGR 抗体双特异性蛋白对 GCGR 的拮抗活性。

3、测试样本：

嵌合抗体 ch1803, ch1805, ch1808, ch1810, ch1817, ch1822。

4、实验步骤：

a. 用新鲜细胞培养基制取细胞悬液，以 20000 个细胞/孔加入 80μl 培养体系的 96 孔细胞培养板中，5%二氧化碳，37℃ 培养 16 小时。

b. 每孔分别加入 10μl 配制好的待测蛋白，再加入 10μl 配好的胰高血糖素，5%二氧化碳，37℃培养 5 小时。

c. 每孔加入加 100μl 检测液 ONE Glo (Promega)，室温避光放置 7 分钟。

d. 酶标仪 Victor3 上检测荧光，计算 GCGR 嵌合抗体融合对人、小鼠和食蟹猴 GCGR 配体胰高血糖素的结合阻断的 IC50 值及阻断效率 Imax。

表 12. 嵌合抗体拮抗活性

抗体	人 GCGR		小鼠 GCGR	
	IC50 (nM)	Imax	IC50 (nM)	Imax (%)
ch1803	79.3	100%	24.7	93%
ch1805	95.03	91%	18	100%
ch1808	105.2	98%	26.6	100%
ch1810	72.46	100%	未检测	未检测
ch1817	59.8	83%	12.8	96%
ch1822	62.48	59%	15.96	87%

测试例 3: GCGR 人源化抗体对 GCGR 配体与 GCGR 结合的阻断试验

通过抗 GCGR 抗体阻断 GCGR 配体胰高血糖素与 GCGR 的结合试验来评估

GCGR 抗体的拮抗活性。实验原理和步骤同测试例 2，结果见下表：

表 13. 人源化抗体拮抗活性

抗体	人 GCGR		抗体	人 GCGR	
	IC50 (nM)	Imax		IC50 (nM)	Imax
hu1803-1	191.1	91.8%	hu1810-1	189.1	83.2%

hu1803-2	137.12	98.5%	hu1810-2	105.9	100%
hu1803-3	109.55	96.7%	hu1810-3	192.2	95.42%
hu1803-4	139.75	100%	hu1810-4	137.5	99.1%
hu1803-5	79.03	100%	hu1810-5	216.4	86.39%
hu1803-6	77.48	100%	hu1810-6	156.8	100%
hu1803-7	73.04	100%	hu1810-7	119.3	100%
hu1803-8	85.92	100%	hu1810-8	132.9	100%
hu1803-9	78.39	100%	hu1810-9	124.7	90.4%
hu1803-10	76.67	100%	hu1810-10	95.56	97.42%
hu1803-11	88.72	100%	hu1810-11	91.32	99.61%
hu1803-12	86.92	100%	hu1810-12	75.91	99.65%

体外活性生物学评价

测试例4：GLP-1/GCGR抗体双特异性蛋白在PBS中的稳定性

- 取200 μ g待测抗体双特异性蛋白溶于1ml 1 $\times$ PBS (pH7.4) 中, 37 $^{\circ}$ C恒温箱存放;
- 5 分别于0和14天取样, Agilent 6530 Q-TOF进行LC-MS检测完整重链保留情况, 结果如下表14所示。含各突变改造的GLP-1肽的双特异性蛋白均较含GLP-1A (SEQ ID NO: 91) 的双特异性蛋白稳定性大大提高, 并且hu1803-9B、hu1803-9D 和 hu1803-9G显示出更良好的稳定性。

表 14. GLP-1/GCGR 抗体双特异性蛋白的稳定性检测

蛋白	第 14 天
hu1803-9A	70.12%
hu1803-9B	$\geq 97\%$
hu1803-9C	93.98%
hu1803-9D	$\geq 97\%$
hu1803-9E	94.15%
hu1803-9F	94.65%
hu1803-9G	$\geq 97\%$

10

测试例5：基于细胞的GCGR结合阻断实验

实验原理和步骤同测试例 2。

测试样本:

- ① GCGR 抗体 (hu1803-9, hu1810-12)
- 15 ② 双特异性蛋白 hu1803-9B, hu1803-9D。

表 15. 双特异性蛋白对 GCGR 的拮抗活性

蛋白	对人GCGR的拮抗活性	
	IC50 (nM)	Imax (%)

hu1803-9	54	100
hu1803-9B	67	100
hu1803-9D	79	100

表 16. 人源化抗体对小鼠和食蟹猴 GCGR 的拮抗活性

抗体	小鼠 GCGR		食蟹猴 GCGR	
	IC 50(nM)	Imax (%)	IC 50(nM)	Imax (%)
hu1803-9	11.22	100%	220	100%
hu1810-12	17.54	97%	886	99%

图 2 和表 15 显示 hu1803-9B 和 hu1803-9D 均能完全抑制 GCGR 的拮抗活性，且与 GCGR 单抗具有相当的功效和 IC₅₀（抑制最大活性的 50%所需的浓度），表明 hu1803-9B 和 hu1803-9D 均保留了 GCGR 抗体部分完全的生物活性。除验证 hu1803-9 及含有 hu1803-9 的双特异性蛋白具有抑制人 GCGR 的拮抗活性外，进一步地还证明(见表 16)hu1803-9 和 hu1810-12 具有抑制小鼠 GCGR 和食蟹猴 GCGR 的拮抗活性。

测试例6：基于细胞的GLP-1R结合激活实验

1、测试目的：

评估 GLP-1/GCGR 抗体双特异性蛋白的 GLP-1 部分对 GLP-1R 的激活活性。

2、测试原理：

cAMP 与 CRE 结合可启动 CRE 下游荧光素酶基因的表达，荧光素酶与其底物结合后发出荧光，通过荧光信号变化反映抑制效率。将 CRE 克隆至荧光素酶基因的上游，通过与含 GLP-1R 基因的质粒共转染 CHO-K1 细胞，挑选出同时高表达 CRE 及 GLP-1R 的单克隆细胞。GLP-1/GCGR 抗体双特异性蛋白和阳性对照度拉糖肽可与 GLP-1R 结合，激活 GLP-1R 的下游信号传递，刺激下游 cAMP 的表达，通过测定荧光信号变化可评估 GLP-1/GCGR 抗体双特异性蛋白对 GLP-1R 的激活活性。

3、测试样本：

① 阳性对照：度拉糖肽

② hu1803-9B，hu1803-9D。

4、实验步骤：

a. 用新鲜细胞培养基制取细胞悬液，以25000个细胞/孔加入90μl培养体系的96孔细胞培养板中，5%二氧化碳，37℃ 培养16小时。

b. 每孔分别加入10μl 配制好的待测蛋白，5%二氧化碳，37℃培养5小时。

c. 每孔加入加100μl检测液ONE Glo（Promega），室温避光放置7分钟。

d. 酶标仪Victor3上检测荧光，计算GLP-1/GCGR抗体双特异性蛋白对GLP-1R的结合激活的EC₅₀值。

表 17. 双特异性蛋白对 GLP-1R 的激活活性

蛋白	EC50 (nM)	E _{max} (%)
度拉糖肽	0.21	100
hu1803-9B	0.22	100
hu1803-9D	0.32	100

图 3 和表 17 显示 hu1803-9B 和 hu1803-9D 均能完全激活 GLP-1R，且与阳性对照度拉糖肽具有相当的功效和 EC50（激活最大活性的 50%所需的浓度），表明 hu1803-9B 和 hu1803-9D 均保留了 GLP-1 部分完全的生物活性。

5

表 18. 双特异性蛋白对人 GLP-1R 的激活活性

样本	EC50(nM)	E _{max} %
ch1805-D	0.11	108
ch1808-D	0.14	107
ch1817-D	0.30	106

表 18 显示 ch1805-D、ch1808-D、ch1817-D 嵌合抗体与 GLP1 肽连接均能完全激活 GLP-1R，且与阳性对照度拉糖肽具有相当的功效和 EC50（激活最大活性的 50%所需的浓度），表明不同 GCGR 抗体与 GLP1 肽以本公开的方式连接所形成的双特异性蛋白不影响 GLP1 肽的生物活性。

10

药代动力学评价

测试例 7: C57 小鼠体内药代动力学检测

实验用 C57 小鼠 4 只，雌性，12/12 小时光/暗调节，温度 24±3℃恒温，湿度 50-60%，自由进食饮水。购自杰思捷实验动物有限公司。实验当天对 C57 小鼠分别尾静脉注射等摩尔 hu1803-9D 和阳性对照药物度拉糖肽，给药剂量分别为 6 mg/kg 和 2.35mg/kg，注射体积为 10 ml/kg。

15

因本公开的 GLP-1/GCGR 抗体双特异性蛋白和阳性对照度拉糖肽均与小鼠有交叉活性，因此在小鼠体内药物代谢时间较短，选择的取血时间点为：第 1 天给药后 0h、1h、24h（第 2 天），第 3 天，于小鼠眼底静脉取血，每次 150 μl（采血前，提前向采血管中加入 1.5μl 的 DPP-4 抑制剂）；收集的血样在 4℃ 下置放半小时至凝集，然后 4℃ 下 14000× g 离心 5 分钟。收集上清（约 80μl），立即放置 -80℃ 贮存。

20

检测流程描述如下：

a. 1μg/mL 抗-GLP1（Novus, NBP1-05180）抗体铺板，4℃过夜。

25

b. 250 μl 1×PBST 洗涤 4 次，加入 200 μl 含 5% 脱脂牛奶的 PBS, 37℃封闭 3 小时。

c. 250 μl 1×PBST 洗涤 4 次，加入 100 μl 小鼠空白血清梯度稀释的待测药物，37℃孵育 2 小时。

- d. 250 μ l 1 $\times$ PBST 洗涤 3 次。
- e. 每孔加入 100 μ l 辣根过氧化物酶标记的二抗抗人 IgG Fc, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。
- f. 250 μ l 1 $\times$ PBST 洗涤 3 次。
- 5 g. 每孔加入 100 μ l TMB, 室温孵育 10 分钟后加入 100 μ l 1M H₂SO₄ 终止反应。
- h. 酶标仪上检测 450nm 测吸收值, Graphpad Prism5 分析数据。

表 19. 双特异性蛋白在小鼠中的 T1/2

受试药物	给药方式	T1/2 (h)
hu1803-9D	IV (6 mg/kg)	23.4
度拉糖肽	IV (2.35 mg/kg)	10

PK 分析结果表明, 本公开双特异性蛋白分子 hu1803-9D 在小鼠体内的半衰期约为 23.4 h , 为阳性对照药物半衰期的 2 倍。

10

体内活性生物学评价

测试例8: ob/ob小鼠体内药效实验

- 1、本实验应用的小鼠品系为糖尿病 ob/ob 小鼠和同龄野生型小鼠 (南京大学南京模式动物研究所), 目的为观察 GLP-1/GCGR 抗体双特异性蛋白连续多次给药后对 ob/ob 小鼠血糖、糖化血红蛋白、体重、摄食量等糖尿病相关指标的治疗作用。
- 15

实验进行前对模型组动物按照实验当天的随机和空腹体重、随机和空腹血糖将其分成 6 组, 分别为:

- 模型对照组、2.84mg/kg、1.42mg/kg GCGR 单抗组 (hu1803-9)、1.16mg/kg 阳性对照组 (度拉糖肽) 和 3mg/kg、1.5mg/kg hu1803-9D, 模型对照组小鼠皮下注射 (S.C.) 给予磷酸盐缓冲液, 各组小鼠每周 1 次皮下注射 (9:00 AM), 一共 4 次 (表 20)。
- 20

25

表 20. 试验分组及给药情况

组别	处理	剂量	给药频率	给药方式
1	ob/ob 小鼠模型对照组	PBS	每周一次 x 4 周	S.C.
2	GCGR 单抗低剂量组	1.42mpk	每周一次 x 4 周	S.C.
3	GCGR 单抗高剂量组	2.84mpk	每周一次 x 4 周	S.C.
4	阳性对照高剂量组	1.16mpk	每周一次 x 4 周	S.C.
4	hu1803-9D 低剂量组	1.5mpk	每周一次 x 4 周	S.C.
5	hu1803-9D 高剂量组	3mpk	每周一次 x 4 周	S.C.

2、实验步骤:

- a. 每周测定一次空腹和随机体重，每天测定一次摄食量和饮水量。
- b. 首次给药前及给药后第1、2、3、7天测随机血糖，后每周测一次随机血糖。首次给药前及给药后第3、7天测6 h空腹血糖，后每周测一次空腹血糖。
- c. 给药第26天，动物禁食6h(8:00-14:00)后，单次腹腔给予葡萄糖水溶液2g/kg，并将给糖时间记为0点，在给糖前0 min，给糖后15，30，60，90，120 min分别对动物进行血糖检测，根据时间对血糖数据绘制糖耐量曲线，计算曲线下面积(AUC)。
- d. 实验结束后，小鼠禁食6小时(8:00-14:00)后给予安乐死，心脏取血后全血分为两部分，一部分约30μl注入已加好抗凝剂离心管并存放于湿冰中用于糖化血红蛋白测定，另一部分静置后离心取血清用于TG、FFA、CHOL、HDL、LDL水平测定。
- e. 数据采用graphpad Prism 6 软件分析，采用Student-t test对数据进行统计学分析。

3、实验结果：

1) 长期用药对ob/ob小鼠随机血糖的影响：

如图4所示，整个试验期间，模型对照组ob/ob小鼠随机血糖维持在较高的水平，一周一次皮下注射不同剂量各组药物后，各组小鼠的随机血糖均有不同程度的下降，呈现良好的剂量效应且显著低于模型对照组。2.84mg/kg的hu1803-9给药和3mg/kg hu1803-9D给药的降糖效果显著优于其他各试验组，而3mg/kg hu1803-9D给药第3、6、14和30天的随机血糖效果更佳。

2) 长期用药对ob/ob小鼠饥饿血糖的影响:如图5所示，整个试验期间，模型对照组ob/ob小鼠随机血糖维持在较高的水平，一周一次皮下注射不同剂量各组药物后，各组小鼠的饥饿血糖均有不同程度的下降，呈现良好的剂量效应且显著低于模型对照组。与随机血糖浓度试验相似，2.84mg/kg的hu1803-9给药和3mg/kg hu1803-9D给药的降糖效果显著优于其他各试验组，而3mg/kg hu1803-9D给药第3、6、13和30天的饥饿血糖效果更佳。

3) 长期用药对ob/ob小鼠糖化血红蛋白(HbA1c)的影响：

结果如表21所示，ob/ob小鼠一周一次皮下注射不同剂量各组药物30天后，糖化血红蛋白水平均有不同程度的下降，且显著低于模型对照组(P<0.05)，3mg/kg和1.5 mg/kg的hu1803-9D组糖化血红蛋白水平分别为5.5±0.2%和4.7±0.1%，呈明显的剂量效应关系；其中3mg/kg的hu1803-9D组低于等摩尔的1.16 mg/kg阳性对照度拉糖肽及2.84mg/kg 的GCGR单抗hu1803-9(P<0.05)。

表 21. 长期用药对 ob/ob 小鼠 HbA1c%的影响

组别	HbA1c (%)	下降百分比
----	--------------	-------

ob/ob 模型对照组	6.3±0.3	-
hu1803-9-1.42mpk	5.2±0.1	17.46%
hu1803-9-2.84mpk	5.2±0.1	17.46%
度拉糖肽-1.16mpk	5.6±0.1	11.1%
hu1803-9D-1.5mpk	5.5±0.2	12.7%
hu1803-9D-3mpk	4.7±0.1	25.4%

测试例 9: GCGR 抗体的竞争性 ELISA 实验

通过生物素标记的抗体与不同浓度的标准抗体竞争结合过表达 GCGR 的 CHO 细胞的 ELISA 实验来检测,对 GCGR 抗体与 GCGR 结合的表位分类。细胞板准备方法与测试例 1 相同,后续具体实验方法如下:

按生物素标记试剂盒说明书标记抗体 (Dojindo Molecular Technologies, Inc. LK03)。在 96 孔细胞板中,按 50μl/孔用样本稀释液稀释的不同浓度未生物素标记待测抗体,放于 37℃孵育 2 小时。孵育结束后用 PBST 洗板 3 次,加入 50μl/孔用样本稀释液稀释至 0.1μg/ml 的生物素标记抗体,37℃孵育 2 小时后用 PBST 洗板 3 次,加入 HRP 标记的羊抗人二抗 (JacksoW ImmWo Research, Cat Wo. 109-035-003),37℃孵育 1 小时。用 PBST 洗板 3 次后,加入 50μl/孔 TMB 显色底物 (KPL, Cat Wo. 52-00-03),于室温孵育 10 min,加入 50μl/孔 1M H₂SO₄ 终止反应,用酶标仪 (Thermo scientific Multiskan MK3) 在波长 450nm 处读取吸收值,用 GraphPad Prism 5 分析数据。

当生物素标记抗体竞争结合至细胞板上的浓度越低时,OD 值越低,反之信号越高。按公式 IC%=(待测抗体最高 OD_{450nm}-待测抗体最低 OD_{450nm})/(待测最高 OD_{450nm}-标记抗体最低 OD_{450nm}) 计算竞争效率,结果见下表 22。

表 22. 各抗体间竞争结合关系

	竞争抗体				
抗体	ch1808	hu1803-9	hu1810-12	ch1817	ch1822
ch1805	100%	100%	100%	-	-
ch1808	100%	46.60%	54.30%	-	-
hu1803-9	100%	100%	100%	-	-
hu1810-12	100%	100%	100%	-	-
ch1817	-	-	-	100%	100%
ch1822	-	-	-	75.40%	100%

结果显示, ch1817 与 ch1822 具有非常相近的表位, ch1808、hu1803-9 和 hu1810-12 具有非常相近的表位;而 ch1808、hu1803-9 和 hu1810-12 的表位推测在

ch1805 的表位范围内。

权利要求书

1. 一种抗 GCGR 的单克隆抗体或其抗原结合片段，其包含选自如下所示的重链可变区和轻链可变区的组合：

- 5 a) 重链可变区，其包含分别如 SEQ ID NO: 48、49 和 50 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 区，和
 轻链可变区，其包含分别如 SEQ ID NO: 51、52 和 53 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 区；或
 b) 重链可变区，其包含分别如 SEQ ID NO: 38、39 和 54 所示的 HCDR1、
10 HCDR2 和 HCDR3 区，和
 轻链可变区，其包含分别如 SEQ ID NO: 55、56 和 57 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 区。

2. 根据权利要求 1 所述的抗 GCGR 的单克隆抗体或其抗原结合片段，其包含
15 选自如下所示的重链可变区和轻链可变区的组合：

- i) 重链可变区，其包含分别如 SEQ ID NO: 14、15 和 16 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 区，和
 轻链可变区，其包含分别如 SEQ ID NO: 17、18 和 19 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 区；
20 ii) 重链可变区，其包含分别如 SEQ ID NO: 20、21 和 22 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 区，和
 轻链可变区，其包含分别如 SEQ ID NO: 23、24 和 25 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 区；
 iii) 重链可变区，其包含分别如 SEQ ID NO: 26、27 和 28 所示的 HCDR1、
25 HCDR2 和 HCDR3 区，和
 轻链可变区，其包含分别如 SEQ ID NO: 29、30 和 31 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 区；
 iv) 重链可变区，其包含分别如 SEQ ID NO: 32、33 和 34 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 区，和
30 轻链可变区，其包含分别如 SEQ ID NO: 35、36 和 37 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 区；
 v) 重链可变区，其包含分别如 SEQ ID NO: 38、39 和 40 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 区，和
 轻链可变区，其包含分别如 SEQ ID NO: 41、42 和 43 所示的 LCDR1、LCDR2
35 和 LCDR3 区；和
 vi) 重链可变区，其包含分别如 SEQ ID NO: 38、39 和 44 所示的 HCDR1、

HCDR2 和 HCDR3 区, 和

轻链可变区, 其包含分别如 SEQ ID NO: 45、46 和 47 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 区。

5 3. 根据权利要求 1 或 2 所述的抗 GCGR 的单克隆抗体或其抗原结合片段, 其是鼠源抗体或其抗原结合片段、嵌合抗体或其抗原结合片段、或人源化抗体或其抗原结合片段。

 4. 根据权利要求 3 所述的抗 GCGR 的单克隆抗体或其抗原结合片段, 所述人源化抗体包含源自人抗体的框架区或其框架区变体, 其中:

所述框架区变体在人抗体的轻链框架区和/或重链框架区上分别具有至多 10 个氨基酸的回复突变,

优选地, 所述氨基酸回复突变选自:

aa) 轻链可变区中包含 42G、44V、71Y 和 87F 中的一个或更多个回复突变,
15 和/或

重链可变区中包含 38K、48I、67A、69F、71A、73P、78A 和 93S 中的一个或更多个回复突变; 或者

ab) 轻链可变区中包含 38L、44V、59S、70E 和 71Y 中的一个或更多个回复突变, 和/或

20 重链可变区中包含 38K、48I、66K、67A、69L、73R、78M 和 94S 中的一个或更多个回复突变。

5. 根据权利要求 3 所述的抗 GCGR 的单克隆抗体或其抗原结合片段, 其包含选自如下所示的轻链可变区和重链可变区组合:

25 c) 重链可变区, 其序列如 SEQ ID NO: 2、61、62、63 和 64 任一所示或与 SEQ ID NO: 2、61、62、63 和 64 任一所示具有至少 90% 序列同一性; 和

轻链可变区, 其序列如 SEQ ID NO: 3、58、59 和 60 任一所示或与 SEQ ID NO: 3、58、59 和 60 任一所示具有至少 90% 序列同一性;

d) 重链可变区, 其序列如 SEQ ID NO: 4 所示或与 SEQ ID NO: 4 所示具有至少 90% 序列同一性; 和

30 轻链可变区, 其序列如 SEQ ID NO: 5 所示或与 SEQ ID NO: 5 所示具有至少 90% 序列同一性;

e) 重链可变区, 其序列如 SEQ ID NO: 6 所示或与 SEQ ID NO: 6 所示具有至少 90% 序列同一性; 和

35 轻链可变区, 其序列如 SEQ ID NO: 7 所示或与 SEQ ID NO: 7 所示具有至少 90% 序列同一性;

f) 重链可变区, 其序列如 SEQ ID NO: 8、68、69、70 和 71 任一所示或与 SEQ ID NO: 8、68、69、70 和 71 任一所示具有至少 90% 序列同一性; 和

轻链可变区, 其序列如 SEQ ID NO: 9、65、66 和 67 任一所示或与 SEQ ID NO: 9、65、66 和 67 任一所示具有至少 90% 序列同一性;

5 g) 重链可变区, 其序列如 SEQ ID NO: 10 所示或与 SEQ ID NO: 10 所示具有至少 90% 序列同一性; 和

轻链可变区, 其序列如 SEQ ID NO: 11 所示或与 SEQ ID NO: 11 所示具有至少 90% 序列同一性; 和

10 h) 重链可变区, 其序列如 SEQ ID NO: 12 所示或与 SEQ ID NO: 12 所示具有至少 90% 序列同一性; 和

轻链可变区, 其序列如 SEQ ID NO: 13 所示或与 SEQ ID NO: 13 所示具有至少 90% 序列同一性。

15 6. 根据权利要求 1 至 5 任一项所述的抗 GCGR 的单克隆抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体为全长抗体, 进一步包括抗体恒定区,

优选地, 所述重链恒定区选自人 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4 恒定区及其常规变体, 所述轻链恒定区选自人抗体 κ 和 λ 链恒定区及其常规变体,

更优选包含 SEQ ID NO: 72 所示的人抗体重链恒定区和 SEQ ID NO: 73 所示的人抗体轻链恒定区。

20

7. 根据权利要求 6 所述的抗 GCGR 的单克隆抗体或其抗原结合片段, 包括选自如下任一项所示的重链和轻链的组合:

25 j) 所述重链为 SEQ ID NO: 74、76 或 78 所示或与其具有至少 85% 序列同一性, 且所述轻链为 SEQ ID NO: 75、77 或 79 所示或与其具有至少 85% 序列同一性;

k) 所述重链为 SEQ ID NO: 80 所示或与其具有至少 85% 序列同一性, 且所述轻链为 SEQ ID NO: 81 所示或与其具有至少 85% 序列同一性;

l) 所述重链为 SEQ ID NO: 82 所示或与其具有至少 85% 序列同一性, 且所述轻链为 SEQ ID NO: 83 所示或与其具有至少 85% 序列同一性;

30 m) 所述重链为 SEQ ID NO: 84 所示或与其具有至少 85% 序列同一性, 且所述轻链为 SEQ ID NO: 85 所示或与其具有至少 85% 序列同一性;

n) 所述重链为 SEQ ID NO: 86 所示或与其具有至少 85% 序列同一性, 且所述轻链为 SEQ ID NO: 87 所示或与其具有至少 85% 序列同一性; 和

35 o) 所述重链为 SEQ ID NO: 88 所示或与其具有至少 85% 序列同一性, 且所述轻链为 SEQ ID NO: 89 所示或与其具有至少 85% 序列同一性。

8. 一种抗 GCGR 的单克隆抗体或其抗原结合片段，其中包含选自如下所示的重链可变区和轻链可变区组合：

ac) 重链可变区，其包含与 SEQ ID NO: 2 所示重链可变区具有相同序列的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 区，和

5 轻链可变区，其包含与 SEQ ID NO: 3 所示轻链可变区具有相同序列的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 区；

ad) 重链可变区，其包含与 SEQ ID NO: 4 所示重链可变区具有相同序列的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 区，和

10 轻链可变区，其包含与 SEQ ID NO: 5 所示轻链可变区具有相同序列的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 区；

ae) 重链可变区，其包含与 SEQ ID NO: 6 所示重链可变区具有相同序列的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 区，和

轻链可变区，其包含与 SEQ ID NO: 7 所示轻链可变区具有相同序列的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 区；

15 af) 重链可变区，其包含与 SEQ ID NO: 8 所示重链可变区具有相同序列的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 区，和

轻链可变区，其包含与 SEQ ID NO: 9 所示轻链可变区具有相同序列的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 区；

20 ag) 重链可变区，其包含与 SEQ ID NO: 10 所示重链可变区具有相同序列的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 区，和

轻链可变区，其包含与 SEQ ID NO: 11 所示轻链可变区具有相同序列的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 区；和

ah) 重链可变区，其包含与 SEQ ID NO: 12 所示重链可变区具有相同序列的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 区，和

25 轻链可变区，其包含与 SEQ ID NO: 13 所示轻链可变区具有相同序列的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 区。

9. 根据权利要求 1 至 8 任一项所述的抗 GCGR 的单克隆抗体或其抗原结合片段，其中所述抗原结合片段选自 Fab、Fab'、F(ab')₂、单链抗体、二聚化的 V 区（双抗体）和二硫键稳定化的 V 区（dsFv）。

10. 一种双特异性蛋白，其包含 GLP-1 肽和抗 GCGR 抗体或其抗原结合片段，所述 GLP-1 肽通过肽键或接头共价连接至所述的抗 GCGR 抗体或其抗原结合片段。

35

11. 根据权利要求 10 所述的双特异性蛋白，其中：

所述 GLP-1 肽的羧基端通过肽键或接头连接至所述抗 GCGR 的单克隆抗体或其抗原结合片段的重链可变区的氨基端；或者

所述 GLP-1 肽的羧基端通过肽键或接头连接至所述抗 GCGR 抗体或其抗原结合片段的轻链可变区的氨基端。

5

12. 根据权利要求 11 所述的双特异性蛋白，其中所述的抗 GCGR 抗体或其抗原结合片段是权利要求 1 至 9 任一项所述的抗 GCGR 的单克隆抗体或其抗原结合片段。

10

13. 根据权利要求 10 至 12 任一项所述的双特异性蛋白，其中：

所述 GLP-1 肽是 SEQ ID NO: 91 所示的 GLP-1 肽或其变体，

所述 GLP-1 肽变体为 SEQ ID NO: 91 所示 GLP-1 肽中包含 Q17E、I23V、K28R 和 G30R 中一个或更多个氨基酸突变，

优选地，所述 GLP-1 肽变体包含 Q17E 突变、或包含 Q17E 和 I23V 突变。

15

14. 根据权利要求 13 所述的双特异性蛋白，其中所述 GLP-1 肽变体的序列如 SEQ ID NO: 92、93、94、95、96、97、98 或 99 所示。

20

15. 根据权利要求 14 所述的双特异性蛋白，所述双特异性蛋白包含第一多肽链和第二多肽链，所述第一多肽链包含权利要求 1 至 9 任一项所述抗 GCGR 的单克隆抗体的重链；所述第二多肽链包含权利要求 1 至 9 任一项所述抗 GCGR 的单克隆抗体的轻链；其中：

(ai) 所述第一多肽链包含：选自 SEQ ID NO: 100、101、102、103、104、105、106、107 和 108 任一所示的多肽，和

25

所述第二多肽链包含 SEQ ID NO: 79 所示的多肽；

(aj) 所述第一多肽链包含 SEQ ID NO: 109 所示的多肽，和

所述第二多肽链包含 SEQ ID NO: 81 所示的多肽；

(ak) 所述第一多肽链包含 SEQ ID NO: 110 所示的多肽，和所述第二多肽链包含 SEQ ID NO: 83 所示的多肽；

30

(al) 所述第一多肽链包含 SEQ ID NO: 111 所示的多肽，和所述第二多肽链包含 SEQ ID NO: 85 所示的多肽；

(am) 所述第一多肽链包含 SEQ ID NO: 112 所示的多肽，和所述第二多肽链包含 SEQ ID NO: 87 所示的多肽；或者

35

(an) 所述第一多肽链包含 SEQ ID NO: 113 所示的多肽，和所述第二多肽链包含 SEQ ID NO: 89 所示的多肽。

16. 一种 GLP-1 肽变体，所述 GLP-1 肽变体是在 SEQ ID NO: 91 所示的 GLP-1

肽基础上包含 Q17E、I23V、K28R 和 G30R 中一个或更多个氨基酸突变，优选地，所述 GLP-1 肽变体包含 Q17E 突变、或包含 Q17E 和 I23V 突变。

17. 根据权利要求 16 所述的 GLP-1 肽变体，所述 GLP-1 肽变体的序列如 SEQ
5 ID NO: 92、93、94、95、96、97、98 或 99 所示。

18. 一种药物组合物，其含有：

治疗有效量的根据权利要求 1 至 9 任一项所述的抗 GCGR 的单克隆抗体或其抗原结合片段，或根据权利要求 10 至 15 任一项所述的双特异性蛋白，或根据权利
10 要求 16 或 17 所述的 GLP-1 肽变体，以及

一种或多种药学上可接受的载体、稀释剂、缓冲剂或赋形剂。

19. 一种分离的核酸分子，其编码权利要求 1 至 9 任一项所述的抗 GCGR 的单克隆抗体或其抗原结合片段，或根据权利要求 10 至 15 任一项所述的双特异性
15 蛋白，或根据权利要求 16 或 17 所述的 GLP-1 肽变体。

20. 一种重组载体，其包含权利要求 19 所述的分离的核酸分子。

21. 一种宿主细胞，其转化有权利要求 20 所述的重组载体，所述宿主细胞选自原核细胞和真核细胞，优选为真核细胞，更优选哺乳动物细胞或昆虫细胞。
20

22. 一种制备权利要求 1 至 9 任一项所述的抗 GCGR 的单克隆抗体或其抗原结合片段，或权利要求 10 至 15 任一项所述的双特异性蛋白，或权利要求 16 或 17 所述的 GLP-1 肽变体的方法，所述方法包括：

25 培养权利要求 21 所述的宿主细胞形成权利要求 1 至 9 任一项所述的抗 GCGR 的单克隆抗体或其抗原结合片段，或权利要求 10 至 15 任一项所述的双特异性蛋白，或权利要求 16 或 17 所述的 GLP-1 肽变体，以及

从培养物回收所述单克隆抗体或其抗原结合片段、或双特异性蛋白、或 GLP-1 肽变体。
30

23. 一种检测样本中人 GCGR 的试剂，其包含权利要求 1 至 9 任一项所述的抗 GCGR 的单克隆抗体或其抗原结合片段。

24. 一种降低受试者血糖浓度的方法，所述方法包括：

35 向受试者施用治疗有效量的权利要求 1 至 9 任一项所述的抗 GCGR 的单克隆抗体或其抗原结合片段，或权利要求 10 至 15 任一项所述的双特异性蛋白，或权利要求 16 或 17 所述的 GLP-1 肽变体，或权利要求 18 所述的药物组合物，

优选地，所述治疗有效量为单位剂量中含有 0.1 至 3000mg 的权利要求 1 至 9 任一项所述的抗 GCGR 的单克隆抗体或其抗原结合片段，或权利要求 10 至 15 任一项所述的双特异性蛋白，或权利要求 16 或 17 所述的 GLP-1 肽变体。

5 25. 一种治疗代谢障碍的方法，所述方法包括：

向受试者施用治疗有效量的权利要求 1 至 9 任一项所述的抗 GCGR 的单克隆抗体或其抗原结合片段，或权利要求 10 至 15 任一项所述的双特异性蛋白，或权利要求 16 或 17 所述的 GLP-1 肽变体，或权利要求 18 所述的药物组合物；

10 优选地，所述代谢障碍选自：代谢综合征、肥胖症、葡萄糖耐量受损、糖尿病、糖尿病酮症酸中毒、高血糖症、高血糖高渗综合征、围术期高血糖症、高胰岛素血症、胰岛素抵抗综合征、空腹血糖受损、血脂异常、动脉粥样硬化和糖尿病前期状态。

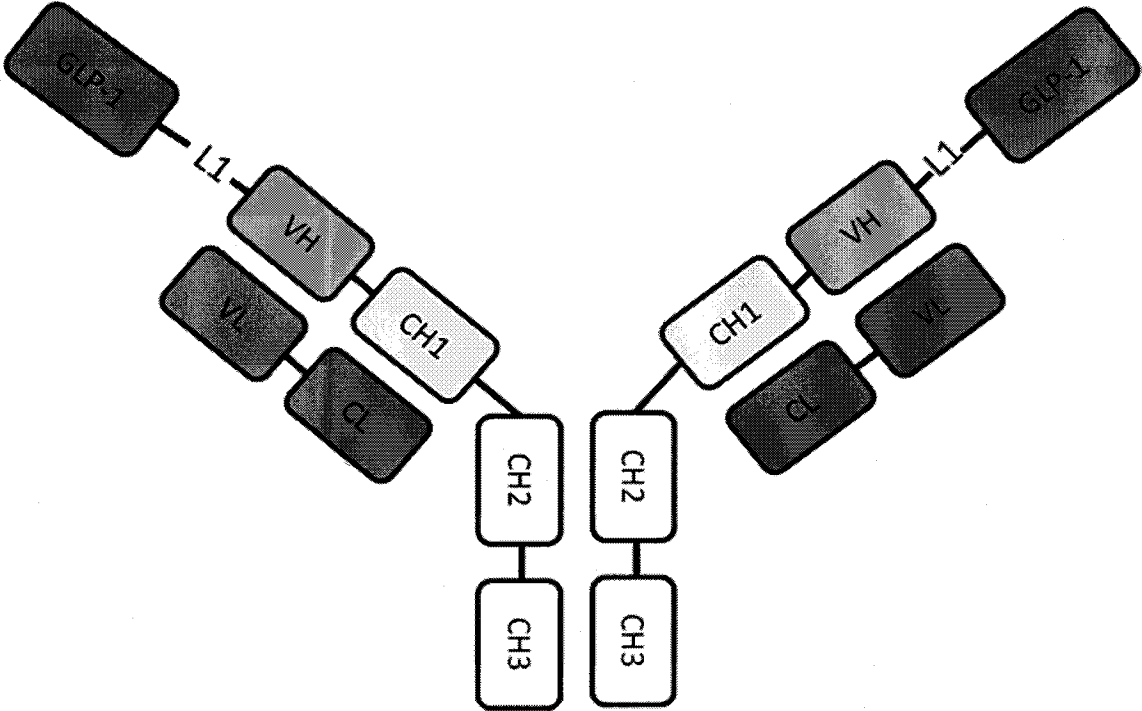


图 1

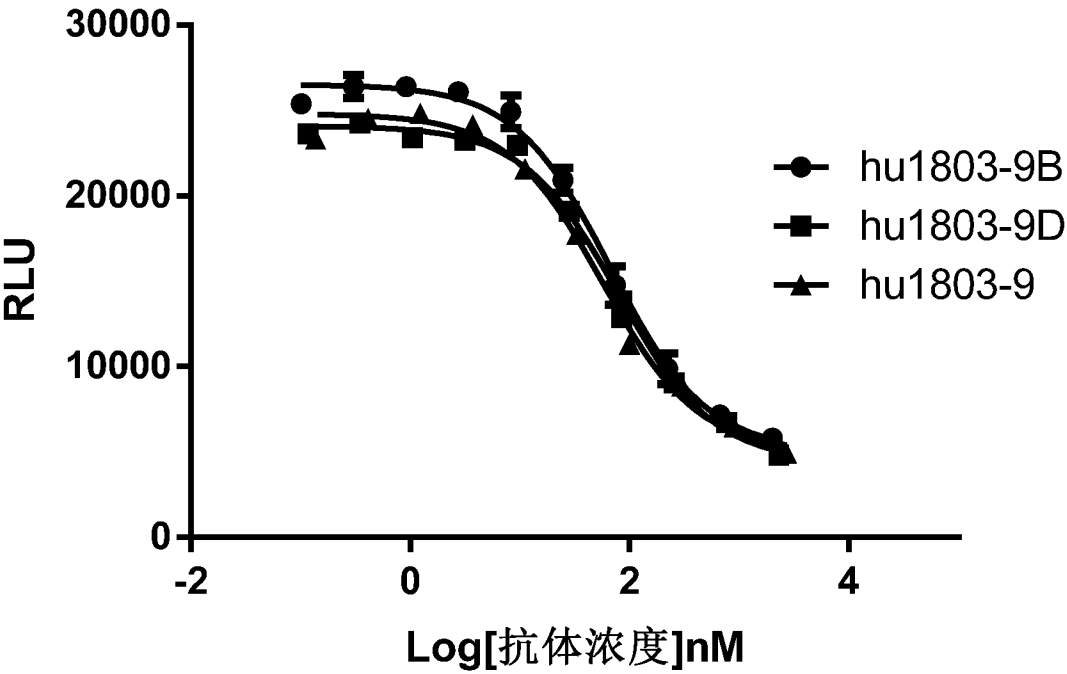


图 2

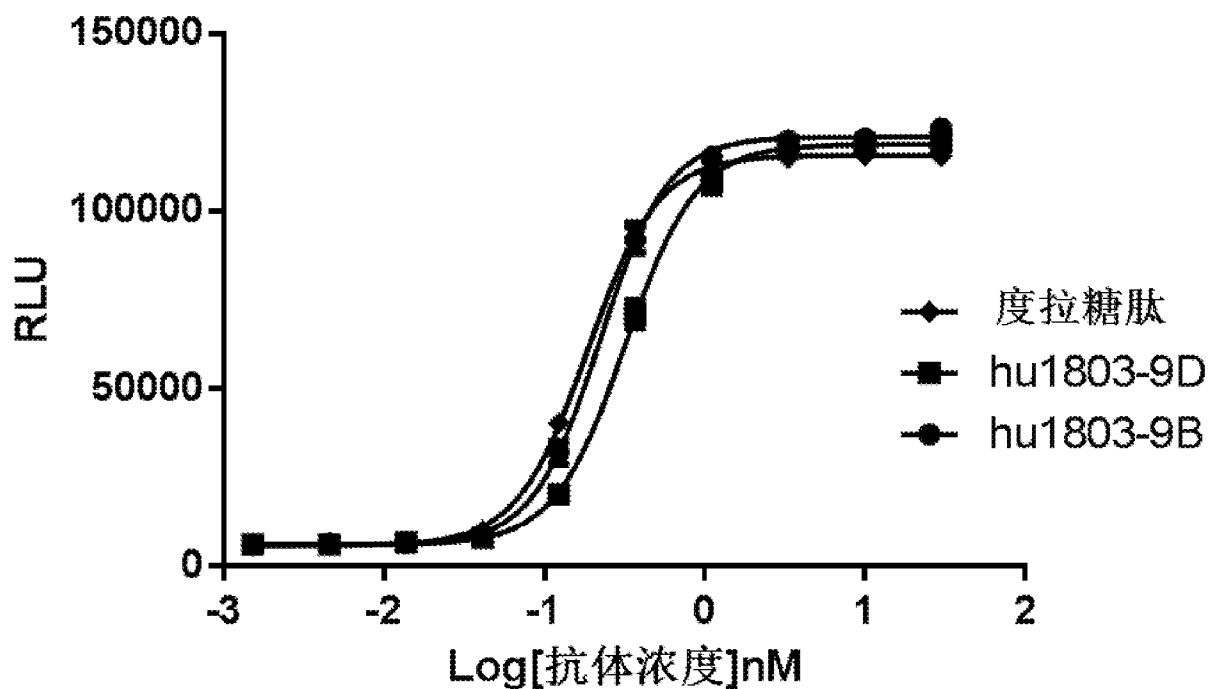


图 3

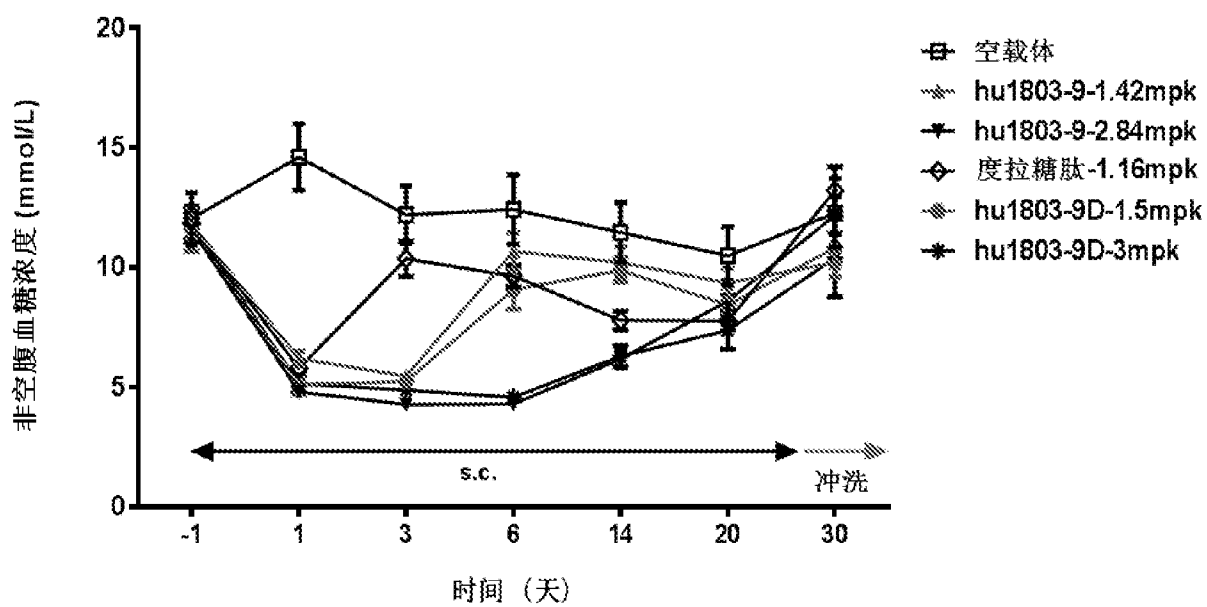
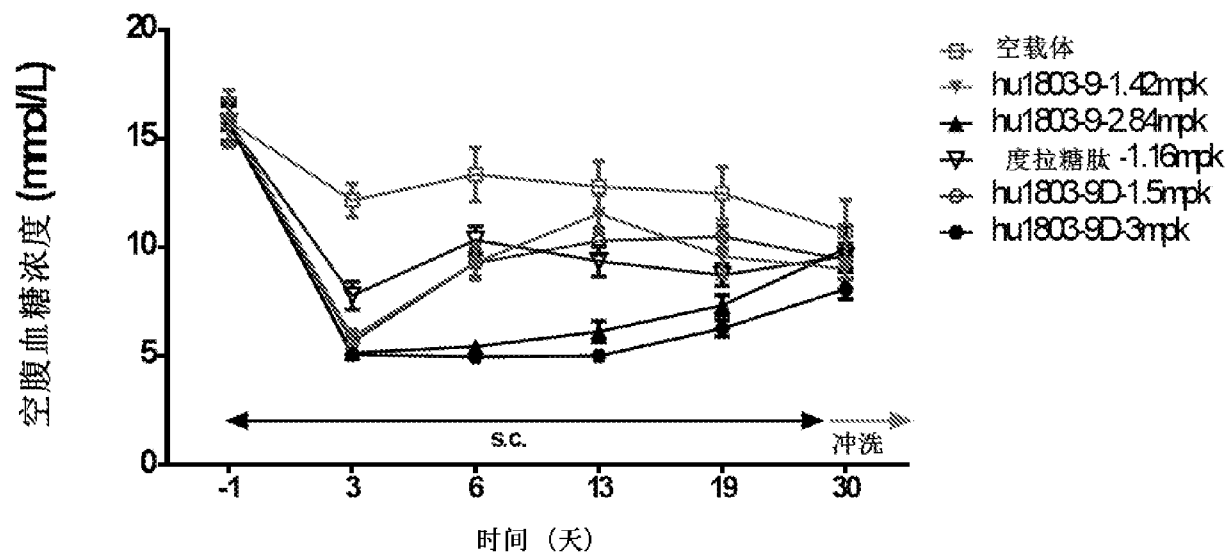


图 4



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/126903

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K 16/28(2006.01)i; C07K 16/00(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 3/10(2006.01)i; C12N 1/15(2006.01)i; C12N 15/09(2006.01)i; C12N 5/10(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, NCBI, 中国专利生物序列检索系统, Genbank, EMBL, STN和检索项: 胰高血糖素受体, GCGR, 抗体, 人源化, GLP-1肽, 双特异性, SEQ ID Nos: 2, 3, 58-64, 79, 100-108														
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; margin-top: 5px;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;">Category*</th> <th style="width: 70%;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="width: 20%;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">A</td> <td>CN 103314011 A (REGENERON PHARMACEUTICALS INC.) 18 September 2013 (2013-09-18) claims 1-22</td> <td style="text-align: center;">1-23 (in part)</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">A</td> <td>CN 108025060 A (BEIJING COSCI REMD BIO MED TECH COMPANY LTD) 11 May 2018 (2018-05-11) claims 1-32</td> <td style="text-align: center;">1-23 (in part)</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">A</td> <td>WO 2018140729 A1 (NGM BIOPHARMACEUTICALS INC.) 02 August 2018 (2018-08-02) claims 1-65</td> <td style="text-align: center;">1-23 (in part)</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	A	CN 103314011 A (REGENERON PHARMACEUTICALS INC.) 18 September 2013 (2013-09-18) claims 1-22	1-23 (in part)	A	CN 108025060 A (BEIJING COSCI REMD BIO MED TECH COMPANY LTD) 11 May 2018 (2018-05-11) claims 1-32	1-23 (in part)	A	WO 2018140729 A1 (NGM BIOPHARMACEUTICALS INC.) 02 August 2018 (2018-08-02) claims 1-65	1-23 (in part)
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.												
A	CN 103314011 A (REGENERON PHARMACEUTICALS INC.) 18 September 2013 (2013-09-18) claims 1-22	1-23 (in part)												
A	CN 108025060 A (BEIJING COSCI REMD BIO MED TECH COMPANY LTD) 11 May 2018 (2018-05-11) claims 1-32	1-23 (in part)												
A	WO 2018140729 A1 (NGM BIOPHARMACEUTICALS INC.) 02 August 2018 (2018-08-02) claims 1-65	1-23 (in part)												
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.														
<table style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> * Special categories of cited documents: “A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date “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) “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 </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> “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 “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 “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 “&” document member of the same patent family </td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents: “A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date “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) “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	“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 “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 “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 “&” document member of the same patent family										
* Special categories of cited documents: “A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date “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) “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	“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 “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 “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 “&” document member of the same patent family													
Date of the actual completion of the international search 24 February 2020		Date of mailing of the international search report 16 March 2020												
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088 China Facsimile No. (86-10)62019451		Authorized officer Telephone No.												

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **24, 25**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
[1] PCT Rule 39.1(iv) – methods for treatment of the human or animal body by surgery or therapy.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

- [1] Invention 1: an anti-GCGR monoclonal antibody m1803, the amino acid sequences of the heavy chain and light chain variable regions of the antibody respectively being SEQ ID NOs: 2 and 3; 12 humanised antibodies thereof (the amino acid sequences of the heavy chain and light chain variable regions thereof respectively being SEQ ID NOs: 61 and 58, 61 and 59, 61 and 60, 62 and 58, 62 and 59, 62 and 60, 63 and 58, 63 and 59, 63 and 60, 64 and 58, 64 and 59, and 64 and 60); 9 dual-specificity proteins containing GLP-1 peptide and the anti-GCGR antibody (the amino acid sequences of the first peptide chain and the second peptide chain respectively being SEQ ID NOs: 100 and 79, 101 and 79, 102 and 79, 103 and 79, 104 and 79, 105 and 79, 106 and 79, 107 and 79, and 108 and 79); a corresponding pharmaceutical composition, nucleic acid, carrier, preparation method and reagent for detecting human GCGR in a sample.
- [2] Invention 2: an anti-GCGR monoclonal antibody m1805, the amino acid sequences of the heavy chain and light chain variable regions of the antibody respectively being SEQ ID NOs: 4 and 5; a dual-specificity protein containing GLP-1 peptide and the anti-GCGR antibody (the amino acid sequences of the first peptide chain and the second peptide chain respectively being SEQ ID NOs: 109 and 81); a corresponding pharmaceutical composition, nucleic acid, carrier, preparation method and reagent for detecting human GCGR in a sample.
- [3] Invention 3: an anti-GCGR monoclonal antibody m1808, the amino acid sequences of the heavy chain and light chain variable regions of the antibody respectively being SEQ ID NOs: 6 and 7; a dual-specificity protein containing GLP-1 peptide and the anti-GCGR antibody (the amino acid sequences of the first peptide chain and the second peptide chain respectively being SEQ ID NOs: 110 and 83); a corresponding pharmaceutical composition, nucleic acid, carrier, preparation method and reagent for detecting human GCGR in a sample.
- [4] Invention 4: an anti-GCGR monoclonal antibody m1810, the amino acid sequences of the heavy chain and light chain variable regions of the antibody respectively being SEQ ID NOs: 8 and 9; 12 humanised antibodies thereof (the amino acid sequences of the heavy chain and light chain variable regions thereof respectively being SEQ ID NOs: 68 and 65, 68 and 66, 68 and 67, 69 and 65, 69 and 66, 69 and 67, 70 and 65, 70 and 66, 70 and 67, 71 and 65, 71 and 66, and 71 and 67); a dual-specificity protein containing GLP-1 peptide and the anti-GCGR antibody (the amino acid sequences of the first peptide chain and the second peptide chain respectively being SEQ ID NOs: 111 and 85); a corresponding pharmaceutical composition, nucleic acid, carrier, preparation method and reagent for detecting human GCGR in a sample.
- [5] Invention 5: an anti-GCGR monoclonal antibody m1817, the amino acid sequences of the heavy chain and light chain variable regions of the antibody respectively being SEQ ID NOs: 10 and 11; a dual-specificity protein containing GLP-1 peptide and the anti-GCGR antibody (the amino acid sequences of the first peptide chain and the second peptide chain respectively being SEQ ID NOs: 112 and 87); a corresponding pharmaceutical composition, nucleic acid, carrier, preparation method and reagent for detecting human GCGR in a sample.

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

- [6] Invention 6: an anti-GCGR monoclonal antibody m1822, the amino acid sequences of the heavy chain and light chain variable regions of the antibody respectively being SEQ ID NOs: 12 and 13; a dual-specificity protein containing GLP-1 peptide and the anti-GCGR antibody (the amino acid sequences of the first peptide chain and the second peptide chain respectively being SEQ ID NOs: 113 and 89); a corresponding pharmaceutical composition, nucleic acid, carrier, preparation method and reagent for detecting human GCGR in a sample.
- [7] The corresponding technical feature shared by inventions 1-6, "an anti-GCGR monoclonal antibody", is disclosed by document 1 (CN 103314011 A, 18 September 2013, see claims 1-8). Therefore, the technical solutions set forth in claims 1-23 do not belong to a single general inventive concept, do not have a technical relationship, do not have a same or corresponding special technical feature, lack unity, and thus do not satisfy the criteria of PCT Rules 13.1 and 13.2.
1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
 2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
 3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
 4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: **Claims 1-23 (in part, i.e. the anti-GCGR monoclonal antibody m1803 and the humanised antibodies thereof, and the dual-specificity protein composed of GLP-1, i.e. SEQ ID NOs: 2, 3, 58-64, 79 and 100-108).**

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2019/126903

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)
CN	103314011	A	18 September 2013	US	10233250 B2	19 March 2019
				SG	10201500198T A	30 March 2015
				BR	112013012782 A2	13 September 2016
				CA	2818426 A1	31 May 2012
				KR	20190023110 A	07 March 2019
				KR	101952786 B1	04 March 2019
				KR	102048666 B1	26 November 2019
				CN	103314011 B	25 November 2015
				MX	2013005757 A	05 July 2013
				NZ	610734 A	29 May 2015
				AR	083972 A1	10 April 2013
				US	2015337045 A1	26 November 2015
				EP	2643355 A2	02 October 2013
				TW	201305209 A	01 February 2013
				AU	2011331998 B2	21 July 2016
				WO	2012071372 A3	03 January 2013
				EA	029669 B1	30 April 2018
				US	9127068 B2	08 September 2015
				IL	226399 D0	31 July 2013
				WO	2012071372 A2	31 May 2012
				JP	6100697 B2	22 March 2017
				US	2012128679 A1	24 May 2012
				JP	2014501512 A	23 January 2014
				US	2019144552 A1	16 May 2019
				US	2017129960 A1	11 May 2017
				IL	226399 A	29 February 2016
				US	2013344538 A1	26 December 2013
				SG	10201906478V A	27 August 2019
				EP	2643355 B1	23 October 2019
				EA	201370126 A1	30 December 2013
				MX	336943 B	08 February 2016
				TW	I586686 B	11 June 2017
				US	8545847 B2	01 October 2013
				US	9587029 B2	07 March 2017
				CL	2013001468 A1	21 March 2014
				KR	20140009264 A	22 January 2014
				UY	33748 A	31 May 2012
				SG	190398 A1	28 June 2013
				AU	2011331998 A1	09 May 2013
CN	108025060	A	11 May 2018	EP	3151855 A2	12 April 2017
				BR	112016028726 A2	07 November 2017
				AU	2015273199 A1	19 January 2017
				EP	3151855 A4	15 November 2017
				CA	2950695 A1	17 December 2015
				MX	2016016210 A	20 July 2017
				WO	2015189698 A2	17 December 2015
				WO	2015189698 A3	10 March 2016
				KR	20170023066 A	02 March 2017
				US	2017240641 A1	24 August 2017
				JP	2017522368 A	10 August 2017

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2019/126903

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2018140729	A1	02 August 2018	CA	3048913	A1	02 August 2018
				IL	267638	D0	29 August 2019
				PE	20191404	A1	04 October 2019
				CL	2019002081	A1	20 December 2019
				SG	11201906682 Y	A	27 August 2019
				EP	3573651	A1	04 December 2019
				US	2018273629	A1	27 September 2018
				KR	20190113815	A	08 October 2019
				CN	110520151	A	29 November 2019
				AU	2018213374	A1	11 July 2019

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2019/126903

A. 主题的分类 C07K 16/28(2006.01)i; C07K 16/00(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 3/10(2006.01)i; C12N 1/15(2006.01)i; C12N 15/09(2006.01)i; C12N 5/10(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, NCBI, 中国专利生物序列检索系统, Genbank, EMBL, STN和检索项: 胰高血糖素受体, GCGR, 抗体, 人源化, GLP-1肽, 双特异性, SEQ ID Nos: 2、3、58-64、79、100-108														
C. 相关文件 <table border="1"> <thead> <tr> <th>类 型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>CN 103314011 A (瑞泽恩制药公司) 2013年 9月 18日 (2013 - 09 - 18) 权利要求1-22</td> <td>1-23 (部分)</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 108025060 A (瑞美德生物医药科技有限公司) 2018年 5月 11日 (2018 - 05 - 11) 权利要求1-32</td> <td>1-23 (部分)</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2018140729 A1 (NGM BIOPHARMACEUTICALS INC) 2018年 8月 2日 (2018 - 08 - 02) 权利要求1-65</td> <td>1-23 (部分)</td> </tr> </tbody> </table>			类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	A	CN 103314011 A (瑞泽恩制药公司) 2013年 9月 18日 (2013 - 09 - 18) 权利要求1-22	1-23 (部分)	A	CN 108025060 A (瑞美德生物医药科技有限公司) 2018年 5月 11日 (2018 - 05 - 11) 权利要求1-32	1-23 (部分)	A	WO 2018140729 A1 (NGM BIOPHARMACEUTICALS INC) 2018年 8月 2日 (2018 - 08 - 02) 权利要求1-65	1-23 (部分)
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求												
A	CN 103314011 A (瑞泽恩制药公司) 2013年 9月 18日 (2013 - 09 - 18) 权利要求1-22	1-23 (部分)												
A	CN 108025060 A (瑞美德生物医药科技有限公司) 2018年 5月 11日 (2018 - 05 - 11) 权利要求1-32	1-23 (部分)												
A	WO 2018140729 A1 (NGM BIOPHARMACEUTICALS INC) 2018年 8月 2日 (2018 - 08 - 02) 权利要求1-65	1-23 (部分)												
☐ 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 2020年 2月 24日		国际检索报告邮寄日期 2020年 3月 16日												
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		授权官员 王翔宇 电话号码 62411992												

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☒ 权利要求： 24、25
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] PCT细则39.1(iv) — 处置人体或者动物体的外科手术方法或治疗方法
2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：
3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

第III栏 缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明，即：

- [1] 发明1：抗GCGR单克隆抗体m1803，所述抗体的重链和轻链可变区的氨基酸序列分别是SEQ ID No： 2和3；其12种人源化抗体（其重链和轻链可变区的氨基酸序列分别是SEQ ID Nos： 61、58，61、59，61、60，62、58，62、59，62、60，63、58，63、59，63、60，64、58，64、59，64、60）；包含GLP-1肽和抗GCGR抗体的双特异性蛋白9种（第一肽链和第二肽链的氨基酸序列分别是：SEQ ID Nos： 100、79，101、79，102、79，103、79，104、79，105、79，106、79，107、79，108、79）；相应的药物组合物、核酸、载体、制备方法以及检测样本中人GCGR的试剂。
- [2] 发明2：抗GCGR单克隆抗体m1805，所述抗体的重链和轻链可变区的氨基酸序列分别是SEQ ID No： 4和5；包含GLP-1肽和抗GCGR抗体的双特异性蛋白（第一肽链和第二肽链的氨基酸序列分别是：SEQ ID Nos： 109、81）；相应的药物组合物、核酸、载体、制备方法以及检测样本中人GCGR的试剂。
- [3] 发明3：抗GCGR单克隆抗体m1808，所述抗体的重链和轻链可变区的氨基酸序列分别是SEQ ID No： 6和7；包含GLP-1肽和抗GCGR抗体的双特异性蛋白（第一肽链和第二肽链的氨基酸序列分别是：SEQ ID No： 110、83）；相应的药物组合物、核酸、载体、制备方法以及检测样本中人GCGR的试剂。
- [4] 发明4：抗GCGR单克隆抗体m1810，所述抗体的重链和轻链可变区的氨基酸序列分别是SEQ ID No： 8和9；其12种人源化抗体（其重链和轻链可变区的氨基酸序列分别是SEQ ID Nos： 68、65，68、66，68、67，69、65，69、66，69、67，70、65，70、66，70、67，71、65，71、66，71、67）；包含GLP-1肽和抗GCGR抗体的双特异性蛋白（第一肽链和第二肽链的氨基酸序列分别是：SEQ ID Nos： 111、85）；相应的药物组合物、核酸、载体、制备方法以及检测样本中人GCGR的试剂。
- [5] 发明5：抗GCGR单克隆抗体m1817，所述抗体的重链和轻链可变区的氨基酸序列分别是SEQ ID No： 10和11；包含GLP-1肽和抗GCGR抗体的双特异性蛋白（第一肽链和第二肽链的氨基酸序列分别是：SEQ ID Nos： 112、87）；相应的药物组合物、核酸、载体、制备方法以及检测样本中人GCGR的试剂。
- [6] 发明6：抗GCGR单克隆抗体m1822，所述抗体的重链和轻链可变区的氨基酸序列分别是SEQ ID No： 12和13；包含GLP-1肽和抗GCGR抗体的双特异性蛋白（第一肽链和第二肽链的氨基酸序列分别是：SEQ ID Nos： 113、89）；相应的药物组合物、核酸、载体、制备方法以及检测样本中人GCGR的试剂。
- [7] 由于发明1-6之间相应的技术特征“抗GCGR单克隆抗体”已经被文献1所公开（CN103314011 A 20130918，参见权利要求1-8）。因此，权利要求1-23之间所要求保护的技术方案不属于一个总的发明构思，技术上无相互关联，没有相同或者相应的特定技术特征，不具备单一性，因此不符合PCT细则13.1和13.2的规定。

第III栏

缺乏发明单一性的意见(续第I页第3项)

1. ☐ 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费, 本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。
2. ☐ 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索, 本单位未通知缴纳任何加费。
3. ☐ 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费, 本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求, 具体地说, 是权利要求:
4. ☒ 申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此, 本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明; 包含该发明的权利要求是: 权利要求1-23(部分, 即抗GCGR单克隆抗体m1803及其人源化抗体、和GLP-1组成的双特异性蛋白, 即SEQ ID Nos: 2、3、58-64、79、100-108)

对异议的意见

- ☐ 申请人缴纳了附加检索费, 同时提交了异议书, 适用时, 缴纳了异议费。
- ☐ 申请人缴纳了附加检索费, 同时提交了异议书, 但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。
- ☐ 缴纳附加检索费时未提交异议书。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2019/126903

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)
CN	103314011	A	2013年 9月 18日	US	10233250	B2	2019年 3月 19日
				SG	10201500198T	A	2015年 3月 30日
				BR	112013012782	A2	2016年 9月 13日
				CA	2818426	A1	2012年 5月 31日
				KR	20190023110	A	2019年 3月 7日
				KR	101952786	B1	2019年 3月 4日
				KR	102048666	B1	2019年 11月 26日
				CN	103314011	B	2015年 11月 25日
				MX	2013005757	A	2013年 7月 5日
				NZ	610734	A	2015年 5月 29日
				AR	083972	A1	2013年 4月 10日
				US	2015337045	A1	2015年 11月 26日
				EP	2643355	A2	2013年 10月 2日
				TW	201305209	A	2013年 2月 1日
				AU	2011331998	B2	2016年 7月 21日
				WO	2012071372	A3	2013年 1月 3日
				EA	029669	B1	2018年 4月 30日
				US	9127068	B2	2015年 9月 8日
				IL	226399	D0	2013年 7月 31日
				WO	2012071372	A2	2012年 5月 31日
				JP	6100697	B2	2017年 3月 22日
				US	2012128679	A1	2012年 5月 24日
				JP	2014501512	A	2014年 1月 23日
				US	2019144552	A1	2019年 5月 16日
				US	2017129960	A1	2017年 5月 11日
				IL	226399	A	2016年 2月 29日
				US	2013344538	A1	2013年 12月 26日
				SG	10201906478V	A	2019年 8月 27日
				EP	2643355	B1	2019年 10月 23日
				EA	201370126	A1	2013年 12月 30日
				MX	336943	B	2016年 2月 8日
				TW	1586686	B	2017年 6月 11日
				US	8545847	B2	2013年 10月 1日
				US	9587029	B2	2017年 3月 7日
				CL	2013001468	A1	2014年 3月 21日
				KR	20140009264	A	2014年 1月 22日
				UY	33748	A	2012年 5月 31日
				SG	190398	A1	2013年 6月 28日
				AU	2011331998	A1	2013年 5月 9日
CN	108025060	A	2018年 5月 11日	EP	3151855	A2	2017年 4月 12日
				BR	112016028726	A2	2017年 11月 7日
				AU	2015273199	A1	2017年 1月 19日
				EP	3151855	A4	2017年 11月 15日
				CA	2950695	A1	2015年 12月 17日
				MX	2016016210	A	2017年 7月 20日
				WO	2015189698	A2	2015年 12月 17日
				WO	2015189698	A3	2016年 3月 10日
				KR	20170023066	A	2017年 3月 2日
				US	2017240641	A1	2017年 8月 24日
				JP	2017522368	A	2017年 8月 10日

国际申请号
PCT/CN2019/126903

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)
W0	2018140729	A1	2018年 8月 2日	CA	3048913	A1	2018年 8月 2日
				IL	267638	D0	2019年 8月 29日
				PE	20191404	A1	2019年 10月 4日
				CL	2019002081	A1	2019年 12月 20日
				SG	11201906682Y	A	2019年 8月 27日
				EP	3573651	A1	2019年 12月 4日
				US	2018273629	A1	2018年 9月 27日
				KR	20190113815	A	2019年 10月 8日
				CN	110520151	A	2019年 11月 29日
				AU	2018213374	A1	2019年 7月 11日