

(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
2022年10月20日 (20.10.2022)



(10) 国际公布号
WO 2022/218277 A1

(51) 国际专利分类号:
C07K 16/22 (2006.01) *G01N 33/577* (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2022/086227

(22) 国际申请日: 2022年4月12日 (12.04.2022)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202110395938.8 2021年4月13日 (13.04.2021) CN

(71) 申请人: 广东东阳光药业有限公司
(SUNSHINE LAKE PHARMA CO., LTD.) [CN/CN];
中国广东省东莞市松山湖北部工业园,
Guangdong 523000 (CN)。

(72) 发明人: 刘亮(LIU, Liang); 中国广东省东莞市长安镇上沙振安路368号东阳光科技园, Guangdong 523871 (CN)。 林树珊(LIN, Shushan); 中国广东省东莞市长安镇上沙振安路368号东阳光科技园, Guangdong 523871 (CN)。 李静(LI, Jing); 中国广东省东莞市长安镇上沙振安路368号东阳光科技园, Guangdong 523871 (CN)。 王茜(WANG, Qian); 中国广东省东莞市长安镇上沙振安路368号东阳光科技园, Guangdong 523871 (CN)。 凌伊(LING, Yi); 中国广东省东莞市长安镇上沙振安路368号东阳光科技园, Guangdong 523871 (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, IT,

JM, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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: ANTIBODY AGAINST CARBOXYL TERMINAL OF FGF21, AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 一种抗FGF21羧基末端的抗体及其应用

(57) Abstract: The present invention relates to an antibody against a carboxyl terminal of FGF21, and the use thereof. An antigen binding site of the antibody is clear, and can specifically bind to the complete carboxyl terminal of FGF21. When FGF21 lacks three amino acids (YAS) at the carboxyl terminal, the antibody does not bind to the carboxyl terminal or has a very low capacity of binding to the carboxyl terminal; and only when the FGF21 or an FGF21-containing fusion protein is complete at the carboxyl terminal (comprising YAS), can the antibody specifically bind to the carboxyl terminal. On the basis of this, provided is a biological sample analysis method capable of distinguishing between a metabolite of FGF21 having a complete molecule at a carboxyl terminal and a metabolite of FGF21 losing 3 or more amino acids at a carboxyl terminal.

(57) 摘要: 涉及一种抗FGF21羧基末端的抗体及其应用, 该抗体的抗原结合位点清晰, 可以特异性结合FGF21的完整羧基末端; 当FGF21缺少羧基末端三个氨基酸(YAS)时, 该抗体与其不结合或结合能力极低; 仅当FGF21或包含FGF21的融合蛋白在羧基末端完整(包含YAS)的情况下, 该抗体可与之发生特异性结合。基于此, 提供了一种可以区别FGF21的羧基末端完整分子和羧基末端丢失3个或以上氨基酸的代谢物的生物样品分析方法。

WO 2022/218277 A1

一种抗 FGF21 羧基末端的抗体及其应用

技术领域

本发明涉及生物技术领域，具体涉及一种抗 FGF21 羧基末端的抗体及其应用。

背景技术

成纤维细胞生长因子 21 (FGF21) 由 181 个氨基酸组成，包含 β 三叶草样核心结构域及无规则的氨基端和羧基端结构。在一系列胰岛素抵抗动物模型中，重组 FGF21 的使用降低了血浆葡萄糖和胰岛素水平，降低了肝脏和循环中的甘油三酯和胆固醇水平，并改善了胰岛素敏感性、能量消耗、肝脂肪变性和肥胖 (Xie T, Leung P S. Fibroblast growth factor 21: a regulator of metabolic disease and health span[J]. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism, 2017, 313(3): E292-E302.)。FGF21 已经成为治疗人类 2 型糖尿病和相关代谢综合征的最有潜力的治疗剂。

有报道显示，FGF21 在羧基末端丢失 3 个氨基酸 (YAS, 酪氨酸-丙氨酸-丝氨酸) 后，其活性下降约 90% (Yie J, Hecht R, Patel J, et al. FGF21 N - and C - termini play different roles in receptor interaction and activation[J]. FEBS letters, 2009, 583(1): 19-24.)。因此，建立可以区别 FGF21 的羧基末端完整分子和羧基末端丢失 3 个或以上氨基酸的代谢物的生物样品分析方法对于准确描述 FGF21 或包含 FGF21 的融合蛋白药物在体内的药代动力学特征非常重要。

在生物大分子药物研发的过程中，建立可以区分完整蛋白/多肽分子和其降解的代谢产物的生物样品分析方法是存在一定挑战的。蛋白/多肽的生物样品分析方法主要是基于免疫分析技术，其本质是抗原和抗体的结合反应，因此，分析方法中所使用的抗体的特异性强弱将决定了该方法的特异性情况。尽管目前商业流通的各类抗体非常多，但通常具有不确定的抗原结合位点，比如抗 FGF21 抗体，仅知道可与 FGF21 结合，而具体的结合部位，与哪几个氨基酸结合并不清楚。因此，开发一种仅针对 FGF21 分子羧基末端 3 个氨基酸结合的、抗原结合位点清晰的单克隆抗体是非常必要的。

发明内容

本发明的目的在于提供一种抗 FGF21 羧基末端的抗体及其应用，该抗体的抗原结合位点清晰，可以特异性结合成纤维细胞生长因子 21 的羧基端；当 FGF21 缺少羧基末端三个氨基酸（YAS）时，本发明的抗体与其不结合或结合能力极低；仅当 FGF21 或包含 FGF21 的融合蛋白在羧基末端完整（包含 YAS）的情况下，本发明的抗体可与之发生特异性结合。

为此，第一方面，本发明提供一种抗 FGF21 羧基末端的抗体，其包含含有 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 氨基酸序列的轻链可变区以及含有 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 的重链可变区；其中，所述 LCDR1 的氨基酸序列为 RSSKSLLSNGITYLY（SEQ ID NO：1），所述 LCDR2 的氨基酸序列为 QMSSLAS（SEQ ID NO：2）或 QMSNLAS（SEQ ID NO：3），所述 LCDR3 的氨基酸序列为 AQTLELPT（SEQ ID NO：4），所述 HCDR1 的氨基酸序列为 GYTFTNY（SEQ ID NO：5），HCDR2 的氨基酸序列为 NTYTGK（SEQ ID NO：6），HCDR3 的氨基酸序列为 NYDYDVAY（SEQ ID NO：7）或 NYDYDIAY（SEQ ID NO：8）。

进一步，所述抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO：9 或者 SEQ ID NO：10 所示。

进一步，所述抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO：11 或者 SEQ ID NO：12 所示。

进一步，所述抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO：9 所示，所述抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO：11 所示；或者所述抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO：10 所示，所述抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO：12 所示。

进一步，所述抗体为全长抗体、Fab 片段、F(ab)₂ 片段、双链 Fv 片段或单链 Fv 片段（scFv）。

进一步，所述抗体为单克隆抗体。

进一步，所述抗体还包括选自 kappa 或 lambda 亚型的轻链恒定区。

进一步，所述轻链恒定区为 kappa 亚型。

进一步，所述轻链恒定区包括如 SEQ ID NO：13 或 SEQ ID NO：14 所示的氨基酸序列。

进一步，所述抗体还包括选自 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 亚型的重链恒定区。

进一步，所述重链恒定区为 IgG1 亚型。

进一步，所述重链恒定区包括如 SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16 或 SEQ ID NO: 17 所示的氨基酸序列。

本发明的第二方面，提供一种核酸分子，其编码本发明所述的抗 FGF21 羧基末端的抗体或其抗原结合部分。

本发明的第三方面，提供一种载体，其包含本发明所述的核酸分子。

进一步，所述载体包括质粒、噬菌体、植物细胞病毒、哺乳动物细胞病毒或逆转录病毒。

本发明的第四方面，提供一种宿主细胞，其含有本发明所述核酸分子，或包含本发明所述的载体。

进一步，所述宿主细胞包括原核细胞、酵母细胞、昆虫细胞或哺乳动物细胞。

进一步，所述宿主细胞为哺乳动物细胞，例如 HEK293 细胞。

本发明的第五方面，提供一种检测试剂盒，包含本发明所述的抗体，本发明所述的核酸分子，或本发明所述的载体。本发明的第六方面，提供本发明所述的抗体在诊断或非诊断目的的免疫检测方面的应用；或本发明所述的抗体用于诊断或非诊断目的的免疫检测方面的用途。

进一步，所述免疫检测包括：检测 FGF21 羧基末端的完整性。

与现有技术相比，本发明的技术方案具有以下优点：

本发明提供的抗体的抗原结合位点清晰，可以特异性结合 FGF21 的完整羧基端；当 FGF21 缺少羧基末端三个氨基酸（YAS）时，本发明的抗体与其不结合或结合能力极低；仅当 FGF21 或包含 FGF21 的融合蛋白在羧基末端完整（包含 YAS）的情况下，本发明的抗体可与之发生特异性结合。基于此，本发明提供了一种可以区别 FGF21 的羧基末端完整分子和羧基端丢失 3 个或以上氨基酸的代谢物的生物样品分析方法。

附图说明

通过阅读下文优选实施方式的详细描述，各种其他的优点和益处对于本领域

域普通技术人员将变得清楚明了。附图仅用于示出优选实施方式的目的，而并不认为是对本发明的限制。在附图中：

图 1 经第二次亚克隆后筛选得到的六株单克隆抗体纯化电泳图；其中，泳道 M 为分子量 marker，泳道 1 为非还原电泳，泳道 2 为还原电泳；

图 2 为 MM21T 抗体的 SDS-PAGE 检测结果；其中，泳道 M 为分子量 marker，泳道 1 为还原电泳，泳道 2 为非还原电泳；

图 3 为 MM24T 抗体 SDS-PAGE 检测结果；其中，泳道 M 为分子量 Marker，泳道 1 为还原电泳，泳道 2 为非还原电泳。

具体实施方式

下面将参照附图更详细地描述本公开的示例性实施方式。虽然附图中显示了本公开的示例性实施方式，然而应当理解，可以以各种形式实现本公开而不应该被这里阐述的实施方式所限制。相反，提供这些实施方式是为了能够更透彻地理解本公开，并且能够将本公开的范围完整的传达给本领域的技术人员。

除非另外指明，本文的实施例采用本领域常规的分子生物学、微生物学、细胞生物学、生物化学以及免疫学技术。

除非另外指明，本申请中所用的术语具有本领域技术人员通常所理解的含义。

定义

如本文所用术语“抗体”是指能够经由至少一个位于免疫球蛋白分子的可变区中的抗原识别位点特异性结合到靶标的免疫球蛋白分子。本文所使用的“抗体”不仅包括完整的（即全长的）抗体，而且还包括其抗原结合片段（例如 Fab、Fab₂、Fv）、其变异体、包含抗体部分的融合蛋白、人源化抗体、嵌合抗体、双抗体、线性抗体、单链抗体、多特异性抗体（例如双特异性抗体）及任何其他包含所需特异性的抗原识别位点的免疫球蛋白分子的修改配置，包括抗体的糖基化变体、抗体的氨基酸序列变体及共价修饰的抗体。

通常，完整或全长的抗体包含两个重链和两个轻链。每个重链含有重链可变区（VH）和重链恒定区（CH）。每个轻链含有轻链可变区（VL）和轻链恒定区（CL）。全长的抗体可以是任何种类的抗体，例如 IgD、IgE、IgG、IgA 或 IgM（或上述的子类），但抗体不需要属于任何特定的类别。根据重链的恒定

域的抗体氨基酸序列，可以将免疫球蛋白指定为不同的类别。通常，免疫球蛋白有五种主要的类别：IgA、IgD、IgE、IgG 及 IgM，而且这些类别中有几个可以再被进一步区分成子类，例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 及 IgA2。

如本文所用术语“特异性结合”是指两个分子之间的非随机结合反应，例如抗体至抗原表位的结合。

如本文所用术语“抗原结合片段或抗原结合部分”是指负责结合抗原的完整抗体分子的一部分或区域。抗原结合部分可以包含重链可变区（VH）、轻链可变区（VL）或上述两者。VH 和 VL 中的每个通常含有三个互补决定区 CDR1、CDR2 及 CDR3

本领域技术人员公知，互补决定区（CDR，通常有 CDR1、CDR2 及 CDR3）是可变区中对抗体的亲和力和特异性影响最大的区域。对于给定抗体的可变区氨基酸序列，可以通过多种方式分析可变区氨基酸序列的中 CDR 氨基酸序列，例如在本文中利用在线软件 Abysis 根据 Chothia 确定 (<http://www.abysis.org/>)。

实施例 1 动物免疫

设计合成 4 条多肽，其中 3 条含有 FGF21 羧基末端的 3 个氨基酸（YAS），1 条不含有 YAS，其序列如表 1 所示。

表 1 合成多肽序列

类别	多肽名称	多肽序列	编号
免疫用多肽 A	SinoA8624	CLSMVGPSQGRSPSYAS	SEQ ID NO: 18
	SinoA8625	CGGGRSPSYAS	SEQ ID NO: 19
	SinoA8626	CGGSPSYAS	SEQ ID NO: 20
筛选用多肽 B	SinoA8627	CLSMVGPSQGRSPS	SEQ ID NO: 21

将免疫用多肽 A 分别进行偶联备用于动物免疫。

完成三次免疫后取血测定血清效价。免疫动物的实验分组见表 2 所示。

表 2 免疫动物信息

项目编号	免疫原信息	免疫动物编号	实验动物合格证编号
DY1-1	HPV16-SMCC-SinoA8624	SBI180064#D、SBI180064#E、SBI180064#F	11400500031890
		SBI180064-2#C、SBI180064-2#D、SBI180064-2#F、SBI180064-3#D、SBI180064-3#E、SBI180064-3#F	11400500033566

DY1-2	HPV16-SMCC -SinoA8625	SBI180065#A、SBI180065#B、 SBI180065#C	11400500031 890
		SBI180065-2#D、SBI180065-2#E、 SBI180065-2#F	11400500033 566
DY1-3	HPV16-SMCC -SinoA8626	SBI180066#A、SBI180066#B、 SBI180066#C	11400500031 890
		SBI180066-2#A、SBI180066-2#D、 SBI180066-2#F、SBI180064-3#D、 SBI180064-3#E、SBI180064-3#F	11400500033 566

利用间接酶联免疫分析方法(间接 ELISA)，筛选对免疫用多肽 A 效价高，且对筛选用多肽 B 效价低的动物血清。具体步骤包括：分别用免疫用多肽 A、筛选用多肽 B (SinoA8627)、蛋白 A (SEQ ID NO: 22) 和蛋白 B (SEQ ID NO: 23) 包被酶标板，利用 HRP 标记山羊抗小鼠 IgG Fc 抗体 (ICL 公司，货号：GGPC-90P) 作为检测抗体，使用间接 ELISA 法测定血清效价。筛选出与免疫用多肽 A 和蛋白 A 反应信号强，且与筛选用多肽 B 和蛋白 B 反应信号弱的动物。血清效价检测结果如表 3-表 5 所示 (S: 信号值; S-B: 扣除本底后信号值)。

表 3 三免后一周小鼠血清 ELISA 检测结果

动物 编号	稀释 倍数	包被 SinoA86 24		稀释 倍数	包被 OVA-S MCC-SinoA8 624		稀释 倍数	包被蛋白 A		包被蛋白 B	
		(5µg/mL)			(1µg/mL)			(5µg/mL)		(5µg/mL)	
		S	S-B		S	S-B		S	S-B	S	S-B
SBI18 0064# D	500	2.445	2.397	16000	2.891	2.841	8000	0.152	0.088	0.047	0.001
	1000	2.412	2.364	32000	2.651	2.601	16000	0.132	0.068	0.051	0.005
SBI18 0064# E	500	2.251	2.203	16000	1.615	1.565	8000	0.118	0.054	0.056	0.010
	1000	2.171	2.123	32000	1.220	1.170	16000	0.100	0.036	0.050	0.004
SBI18 0064# F	500	2.654	2.606	16000	2.384	2.334	8000	0.409	0.345	0.074	0.028
	1000	2.557	2.509	32000	2.070	2.020	16000	0.322	0.258	0.062	0.016
SBI18 0064- 2#C	500	2.311	2.261	16000	1.854	1.804	500	2.762	2.682	0.801	0.751
	1000	1.631	1.581	32000	1.503	1.453	8000	1.265	1.185	0.299	0.249
	/	/	/	/	/	/	16000	0.953	0.873	0.232	0.182
SBI18 0064- 2#D	500	2.067	2.017	16000	1.953	1.903	500	2.353	2.273	2.543	2.493
	1000	1.934	1.884	32000	1.660	1.610	8000	1.086	1.006	1.182	1.132
	/	/	/	/	/	/	16000	0.836	0.756	0.887	0.837
SBI18	500	2.398	2.348	16000	2.067	2.017	500	0.980	0.900	0.722	0.672

0064-2#F	1000	2.170	2.120	32000	1.768	1.718	8000	0.363	0.283	0.263	0.213
	/	/	/	/	/	/	16000	0.279	0.199	0.204	0.154
SBI18 0064-3#D	500	2.069	2.019	16000	1.719	1.669	500	0.711	0.591	0.061	0.011
	1000	1.865	1.815	32000	1.306	1.256	8000	0.308	0.188	0.044	-0.007
	/	/	/	/	/	/	16000	0.224	0.104	0.044	-0.006
SBI18 0064-3#E	500	1.294	1.244	16000	2.589	2.539	500	1.277	1.157	0.063	0.013
	1000	1.102	1.052	32000	2.306	2.256	8000	0.466	0.346	0.044	-0.006
	/	/	/	/	/	/	16000	0.345	0.225	0.042	-0.008
SBI18 0064-3#F	500	2.405	2.355	16000	2.360	2.310	500	0.657	0.537	0.055	0.005
	1000	2.318	2.268	32000	2.079	2.029	8000	0.344	0.224	0.043	-0.007
	/	/	/	/	/	/	16000	0.250	0.130	0.040	-0.010
Blank	500	0.047	-0.003	16000	0.059	-0.001	8000	0.064	-0.016	0.046	-0.004
	1000	0.043	-0.008	32000	0.049	-0.011	16000	0.065	-0.015	0.042	-0.008

表 4 三免后一周小鼠血清 ELISA 检测结果

动物 编号	稀释 倍数	包被 SinoA86 25		稀释 倍数	包被 OVA-S MCC- SinoA 8625		稀释 倍数	包被蛋白 A		包被蛋白 B	
		(5µg/mL)			(1µg/mL)			(5µg/mL)		(5µg/mL)	
		S	S-B		S	S-B		S	S-B	S	S-B
SBI1 8006 5#A	500	0.884	0.840	16000	2.235	2.187	8000	0.174	0.108	0.051	0.005
	1000	0.703	0.659	32000	1.686	1.638	16000	0.132	0.066	0.054	0.008
SBI1 8006 5#B	500	0.236	0.192	16000	1.648	1.600	8000	0.079	0.013	0.051	0.005
	1000	0.213	0.169	32000	1.257	1.209	16000	0.327	0.261	0.052	0.006
SBI1 8006 5#C	500	0.581	0.537	16000	1.603	1.555	8000	0.150	0.084	0.047	0.001
	1000	0.433	0.389	32000	1.171	1.123	16000	0.122	0.056	0.046	0.000
SBI1 8006 5-2# D	500	0.118	0.068	16000	2.073	2.023	500	0.063	-0.017	0.051	0.001
	1000	0.062	0.012	32000	1.650	1.600	8000	0.055	-0.025	0.043	-0.007
	/	/	/	/	/	/	16000	0.063	-0.017	0.054	0.004
SBI1 8006 5-2#E	500	0.707	0.657	16000	1.881	1.831	500	0.062	-0.018	0.044	-0.007
	1000	0.525	0.475	32000	1.581	1.531	8000	0.060	-0.020	0.047	-0.003
	/	/	/	/	/	/	16000	0.066	-0.014	0.042	-0.008
SBI1	500	1.614	1.564	16000	2.027	1.977	500	0.196	0.116	0.056	0.006

8006 5-2#F	1000	1.306	1.256	32000	1.725	1.675	8000	0.108	0.028	0.046	-0.004
	/	/	/	/	/	/	16000	0.094	0.014	0.046	-0.004

表 5 三免后一周小鼠血清 ELISA 检测结果

动物 编号	稀释 倍数	包被 SinoA86 26		稀释 倍数	包被 OVA-S MCC- Sino A8626		稀释 倍数	包被蛋白 A		包被蛋白 B	
		(5 μ g/mL)			(1 μ g/mL)			(5 μ g/mL)		(5 μ g/mL)	
		S	S-B		S	S-B		S	S-B	S	S-B
SB11 8006 6#A	500	0.400	0.352	16000	1.340	1.294	8000	0.342	0.273	0.061	0.014
	1000	0.322	0.274	32000	0.907	0.861	16000	0.260	0.191	0.053	0.006
SB11 8006 6#B	500	0.261	0.213	16000	0.708	0.662	8000	0.067	-0.002	0.049	0.002
	1000	0.214	0.166	32000	0.524	0.478	16000	0.070	0.001	0.046	-0.001
SB11 8006 6#C	500	0.164	0.116	16000	1.114	1.068	8000	0.068	-0.001	0.043	-0.004
	1000	0.145	0.097	32000	0.797	0.751	16000	0.063	-0.006	0.046	-0.001
SB11 8006 6-2# A	500	0.236	0.186	16000	1.031	0.981	500	0.082	0.002	0.074	0.024
	1000	0.132	0.082	32000	0.811	0.761	8000	0.063	-0.017	0.045	-0.005
	/	/	/	/	/	/	16000	0.068	-0.012	0.045	-0.005
SB11 8006 6-2# D	500	0.093	0.043	16000	1.747	1.697	500	0.436	0.356	0.065	0.015
	1000	0.048	-0.003	32000	1.393	1.343	8000	0.192	0.112	0.044	-0.006
	/	/	/	/	/	/	16000	0.157	0.077	0.046	-0.004
SB11 8006 6-2#F	500	0.536	0.486	16000	1.860	1.810	500	0.165	0.085	0.066	0.016
	1000	0.330	0.280	32000	1.530	1.480	8000	0.104	0.024	0.044	-0.006
	/	/	/	/	/	/	16000	0.094	0.014	0.054	0.004
SB11 8006 6-3# D	500	0.560	0.510	16000	1.874	1.824	500	0.827	0.767	0.058	0.008
	1000	0.421	0.371	32000	1.452	1.402	8000	0.361	0.301	0.041	-0.009
	/	/	/	/	/	/	16000	0.260	0.200	0.042	-0.008
SB11 8006 6-3# E	500	0.043	-0.007	16000	2.461	2.411	500	0.079	0.019	0.058	0.008
	1000	0.046	-0.004	32000	2.174	2.124	8000	0.055	-0.005	0.042	-0.008
	/	/	/	/	/	/	16000	0.051	-0.009	0.037	-0.013
SB11 8006 6-3#F	500	0.230	0.180	16000	1.821	1.771	500	0.587	0.527	0.129	0.079
	1000	0.173	0.123	32000	1.385	1.335	8000	0.260	0.200	0.060	0.010
	/	/	/	/	/	/	16000	0.194	0.134	0.046	-0.004
Blank	500	0.043	-0.007	16000	0.049	-0.001	500	0.067	0.017	0.055	0.005
	1000	0.042	-0.008	32000	0.048	-0.002	8000	0.069	0.019	0.059	0.009

	/	/	/	/	/	/	16000	0.070	0.020	0.063	0.013
--	---	---	---	---	---	---	-------	-------	-------	-------	-------

实施例 2 融合杂交瘤细胞及筛选

根据表 3-5 的结果，选择编号为 SBI180064-2 #C 的小鼠进行注射多肽 SinoA8624 加强免疫；3 天后取脾进行融合，将融合后细胞用 HAT 培养基悬浮，按照每孔 6×10^4 个细胞接种于 96 孔细胞培养板，即共接种 30 块 96 孔细胞培养板。分别于融合后第 6 天、第 8 天，弃去培养板中培养基，添加新鲜 HAT 培养基，于融合后第 10 天取杂交瘤细胞培养上清进行主克隆筛选（结果见表 6 所示）。

表 6 主克隆首次筛选 ELISA 检测结果

序号	包被 SinoA8624		包被 SinoA8627		包被蛋白 A		包被蛋白 B	
	5µg/mL		5µg/mL		1µg/mL		1µg/mL	
	S	S-B	S	S-B	S	S-B	S	S-B
4-C6	2.634	2.567	0.053	-0.011	3.579	3.392	0.091	-0.076
2-A11	2.124	2.057	0.067	0.003	3.835	3.648	0.098	-0.070
24-A2	2.278	2.211	0.050	-0.015	3.775	3.588	0.099	-0.068
10-C8	1.033	0.966	0.053	-0.011	2.710	2.523	0.114	-0.053
5-C10	0.571	0.504	0.051	-0.013	2.757	2.570	0.109	-0.058
3-B2	2.098	2.031	0.057	-0.007	3.481	3.294	0.099	-0.068

将筛选所得阳性的细胞进行细胞计数，然后按照 0.75 细胞/孔接种到 96 孔细胞培养板，每个阳性细胞接种 0.5 块细胞培养板。培养 7 天后，显微镜下观察细胞状态，挑选并标记仅含有单个细胞团的孔，取培养上清进行 ELISA 筛选，筛选结果见表 7 和表 8 所示（S：信号值；S-B：扣除本底后信号值）。将筛选所得阳性细胞按上述步骤进行第二次有限稀释，直至获得稳定的阳性单克隆细胞。经间接 ELISA 筛选，获得表 8 中的 6 株杂交瘤细胞上清可以满足与 SinoA8624 及蛋白 A 结合，且与 SinoA8627 及蛋白 B 不结合。

表 7 第一次亚克隆 ELISA 检测结果

序号	包被 SinoA8624		包被 SinoA8627		包被蛋白 A		包被蛋白 B	
	5µg/mL		5µg/mL		1µg/mL		1µg/mL	
	S	S-B	S	S-B	S	S-B	S	S-B
4C6E6	2.019	1.900	0.062	-0.035	3.207	3.010	0.075	-0.034
2A11B9	1.183	1.064	0.099	0.002	3.384	3.187	0.081	-0.028
24A2F1	0.827	0.699	0.074	0.001	3.075	2.873	0.080	-0.028
10C8A7	2.266	2.170	0.122	-0.010	3.237	3.064	0.106	0.009

5C10G7	1.877	1.749	0.064	-0.034	3.155	2.927	0.060	-0.073
3B2B11	2.292	2.164	0.056	-0.042	3.108	2.880	0.106	-0.027

表 8 第二次亚克隆 ELISA 检测结果

编号	序号	包被 SinoA8624		包被 SinoA8627		包被蛋白 A		包被蛋白 B	
		5 μ g/mL		5 μ g/mL		1 μ g/mL		1 μ g/mL	
		S	S-B	S	S-B	S	S-B	S	S-B
MM21H	4C6E6C1	2.818	2.643	0.153	0.008	3.468	3.295	0.101	-0.014
MM22H	2A11B9H11	3.434	3.259	0.188	0.043	3.946	3.773	0.119	0.004
MM23H	24A2F1H3	3.584	3.476	0.124	0.045	3.762	3.590	0.106	-0.022
MM24H	10C8A7B7	2.855	2.644	0.061	-0.070	3.532	3.328	0.129	-0.063
MM25H	5C10G7H6	3.507	3.304	0.185	0.055	3.965	3.711	0.151	0.012
MM26H	3B2B11F11	3.238	3.035	0.067	-0.063	3.701	3.447	0.106	-0.033

实施例 3 单克隆抗体与小量培养与纯化

取表 8 所记载的六株杂交瘤细胞，分别将 1 mL 杂交瘤细胞转入 100 mL 培养瓶中，定期加入一定量的培养基进行细胞扩增，培养 10 天。培养液离心过滤取上清，经 Protein A 亲和层析纯化，具体步骤包括：

收集培养料液 6000 rpm 离心 20 min 后，用滤器过滤，取上清；

a、层析柱预处理：Protein A 亲和层析柱用超纯水冲洗，然后用平衡缓冲液平衡；

b、上样与平衡：料液上样 Protein A 亲和层析柱，上样完毕后，用平衡缓冲液淋洗至基线平稳；

c、洗脱：用 Elution3.0 洗脱，收集洗脱峰，用 2M Tris 中和；

d、Protein A 亲和层析柱再生；

e、纯化样品用脱盐至适当的缓冲液中；

f、纯化样品无菌过滤后留样，并用 SDS-PAGE 分析纯度，结果见图 1 所示。

实施例 4 与 HRP 标记的小鼠抗人 IgG4 Fc 抗体配对检测 FGF21-Fc 融合蛋白

取实施例 3 纯化得到的单克隆抗体作为包被抗体，以 HRP 标记的小鼠抗人 IgG4 Fc 抗体（Southern Biotech，货号 9200-05）为检测抗体，使用双抗夹心法 ELISA 分别检测蛋白 A 和蛋白 B，具体步骤包括：

(1) 包被：包被纯化后的小鼠单克隆抗体 2 μ g/mL，100 μ L/孔，4 $^{\circ}$ C 包被过

夜；

(2) 封闭：板内液体甩净拍干，加入 2% BSA，300 μL/孔，密封后室温孵育 1 h；

(3) 洗板：300 μL/孔洗涤液，洗板 2 次，最后一次拍干；

(4) 样品准备：将蛋白 A 及蛋白 B 分别稀释至 5 ng/mL、10 ng/mL，100 μL/孔加入至孔板中，空白对照加入样品稀释液，100 μL/孔，混合均匀，室温反应 2 h；

(5) 洗板：300 μL/孔洗涤液，洗板 3 次，最后一次拍干；

(6) 加入二抗：HRP 标记的小鼠抗人 IgG4 Fc 单抗（Southern biotech，货号 9200-05）按 1：2000 稀释使用，100 μL/孔，密封后室温孵育 1 h；

(7) 洗板：同步骤 5；

(8) 显色：将 A 液和 B 液按 1:1 混匀后，每孔加入 200 μL，室温避光孵育 20 min；

(9) 终止：每孔加入 50 μL 终止液，立即在 450 nm 波长处测量 OD 值，检测结果如表 9 所示（S：信号值；S-B：扣除本底后信号值）。

表 9 6 株单克隆抗体与 HRP 标记的小鼠抗人 IgG4 Fc 抗体
双抗夹心法 ELISA 检测结果

包被蛋白	包被浓度 (μg/mL)	Blank	蛋白 A (5ng/mL)		蛋白 A (10ng/mL)		蛋白 B (5ng/mL)		蛋白 B (10ng/mL)	
		S	S	S-B	S	S-B	S	S-B	S	S-B
MM21H	2	0.091	1.681	1.590	2.507	2.417	0.086	-0.005	0.087	-0.004
MM22H	2	0.368	0.581	0.213	0.790	0.422	0.343	-0.025	0.349	-0.019
MM23H	2	0.153	0.352	0.200	0.556	0.404	0.147	-0.006	0.152	-0.001
MM24H	2	0.111	1.596	1.486	2.513	2.402	0.106	-0.005	0.115	0.004
MM25H	2	0.402	1.192	0.790	1.847	1.445	0.388	-0.014	0.396	-0.006
MM26H	2	0.297	1.821	1.525	2.668	2.371	0.286	-0.011	0.303	0.006

根据表 9，MM21H、MM22H、MM23H、MM24H、MM25H、MM26H 均可以与检测抗体配对检测蛋白 A，且不受蛋白 B 干扰。选择响应较高且背景较低的 MM21H 和 MM24H 作为候选单克隆抗体株。

实施例 5 单克隆抗体测序

对实施例 4 筛选获得的候选单克隆抗体株 MM21H 和 MM24H 委托北京义翘

神州科技股份有限公司 (Sino Biological Inc.) 进行杂交瘤细胞株抗体亚型检测和测序。分别取培养的 MM21H 和 MM24H 杂交瘤细胞上清采用亚型检测试剂盒 (Southern Biotech) 进行亚型检测, 根据表 10 所示的 ELISA 检测结果, MM21H 和 MM24H 鼠源单克隆抗体亚型均为 IgG1/kappa。

表 10 单克隆抗体亚型检测结果

细胞株名称	检测 OD 值							亚型
	IgG1	IgG2a	Fc(2b)	IgG3	IgM	lambda	kappa	
MM24H	0.985	0.011	0.031	0.011	0.014	0.015	2.430	IgG1/kappa
MM21H	0.935	0.005	0.007	0.002	0.002	0.005	2.424	IgG1/kappa

分别将 MM21H 和 MM24H 杂交瘤细胞离心后, 弃上清, 采用 TriPure Isolation Reagent 试剂盒 (Roche) 提取细胞 RNA, 经反转录获得 cDNA, 以 cDNA 为模板, 依据测定的亚型采用特异引物 (Sino Biological Inc.) 进行 PrimeSTAR (TAKARA) 高保真 PCR, 将扩增获得的基因片段插入到表达载体 pcDNA 系列载体上, 克隆测序获得基因序列。将重组抗体分别命名为 MM21T 及 MM24T, 根据测序结果, MM21T 的轻链可变区包含以下三个互补决定区:

CDR-L1, 其氨基酸序列为 RSSKSLLSNGITYLY (SEQ ID NO: 1), 其编码核苷酸序列为 SEQ ID NO: 24;

CDR-L2, 其氨基酸序列为 QMSSLAS (SEQ ID NO: 2), 其编码核苷酸序列为 SEQ ID NO: 25;

CDR-L3, 其氨基酸序列为 AQTLELPT (SEQ ID NO: 4), 其编码核苷酸序列为 SEQ ID NO: 26。

根据测序结果, MM21T 的轻链的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 27; 其中, 第 1-19 位为信号肽, 第 20-130 位为轻链可变区, 第 131-237 位为轻链恒定区。

编码 MM21T 的轻链的核苷酸序列为 SEQ ID NO: 28。

MM21T 的重链可变区包含以下三个互补决定区:

CDR-H1, 其氨基酸序列为 GYTFTNY (SEQ ID NO: 5), 其编码核苷酸序列为 SEQ ID NO: 29;

CDR-H2, 其氨基酸序列为 NTYTGK (SEQ ID NO: 6), 其编码核苷酸序列为 SEQ ID NO: 30;

CDR-H3, 其氨基酸序列为 NYDYDVAY (SEQ ID NO: 7), 其编码核苷酸

酸序列为 SEQ ID NO: 31。

根据测序结果，MM21T 的重链的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 32；其中，第 1-19 位为信号肽，第 20-137 位为重链可变区，第 138-461 位为重链恒定区。

编码 MM21T 的重链的核苷酸序列为 SEQ ID NO: 33。

MM24T 的轻链可变区包含以下三个互补决定区：

CDR-L1'，其氨基酸序列为 RSSKSLLSNGITYLY (SEQ ID NO: 1)，其编码核苷酸序列为 SEQ ID NO: 24；

CDR-L2'，其氨基酸序列为 QMSNLAS (SEQ ID NO: 3)，其编码核苷酸序列为 SEQ ID NO: 34；

CDR-L3'，其氨基酸序列为 AQTLELPT (SEQ ID NO: 4)，其编码核苷酸序列为 SEQ ID NO: 26。

根据测序结果，MM24T 的轻链的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 35；其中，第 1-19 位为信号肽，第 20-130 位为轻链可变区，第 131-237 位轻链恒定区。

编码 MM24T 的轻链的核苷酸序列为 SEQ ID NO: 36。

MM24T 的重链可变区包含以下三个互补决定区：

CDR-H1'，其氨基酸序列为 GYTFTNY (SEQ ID NO: 5)，其编码核苷酸序列为 SEQ ID NO: 29；

CDR-H2'，其氨基酸序列为 NTYTGK (SEQ ID NO: 6)，其编码核苷酸序列为 SEQ ID NO: 37；

CDR-H3'，其氨基酸序列为 NYDYDIAY (SEQ ID NO: 8)，其编码核苷酸序列为 SEQ ID NO: 38。

根据测序结果，MM24T 的重链的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 39；其中，第 1-19 位为信号肽，第 20-137 位为重链可变区，第 138-461 位为重链恒定区。

编码 MM24T 的重链的核苷酸序列为 SEQ ID NO: 40。

实施例 6 重组抗体 MM21T 及 MM24T 的表达与纯化

用 293 无血清 CD 培养基 (货号 SMM 293-TI) 传代培养 HEK293 细胞，将实施例 5 构建得到的含目的抗体轻链和重链基因的表达质粒与转染试剂 TF1 混合后加入 HEK293 细胞中，转染后第 1、3、5 天添加 293 无血清加料液 (货号: M293-SUPI-100)。细胞培养 7 天后进行蛋白纯化。HEK293 培养料液离心后，

用滤器过滤，取上清，随后使用 Protein A 亲和层析柱对收集的细胞培养液进行纯化，并收集吸收峰。获取的蛋白样本采取 SDS-PAGE 和 UV OD280 的方法对蛋白表达过程进行监控以及对产品进行 QC 检测。

SDS-PAGE 的检测结果如图 2-图 3 所示，通过 SDS-PAGE 分析可知，可使用 Protein A 亲和纯化法从 HEK293 培养上清液中纯化得到目标抗体。通过非还原胶分析抗体的分子量在 150~200KDa 区间，符合抗体分子量的特性。非还原胶上靠近抗体主条带下方条带可能是由于不同程度糖基化造成的分子量和移动方式差异，同时，非还原胶上~100KDa 处条带可能是由于抗体重链过量表达造成，但总体占比<5%。

实施例 7 MM24T 重组抗体的活性检测

使用 ELISA 方法检测 MM24T 重组抗体的活性，分别包被 0.1、1、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的蛋白 A 及蛋白 B，抗体点样浓度 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，验证 MM24T 能够与蛋白 A 结合与蛋白 B 不结合，且与 MM24H 结合能力情况一致，检测结果如表 11 所示（设置有两个平行试验，表中 OD450 的结果取平均值）。

表 11 MM24T 重组表达抗体活性检测验证

2nd Ab		Rabbit Anti-Mouse IgG F(ab)2/HRP-0.09 $\mu\text{g}/\text{mL}$					
Coating		Protein A-0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$		Protein A-1 $\mu\text{g}/\text{mL}$		Protein A-5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	
sample(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)		OD450	OD450-Blank	OD450	OD450-Blank	OD450	OD450-Blank
Blank		0.048	/	0.080	/	0.116	/
MM24T	MB13DE2701	0.590	0.542	3.107	3.027	3.095	2.979
MM24H	HK12DE0423	0.516	0.468	3.067	2.987	3.099	2.983
2nd Ab		Rabbit Anti-Mouse IgG F(ab)2/HRP-0.09 $\mu\text{g}/\text{mL}$					
Coating		Protein B-0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$		Protein B-1 $\mu\text{g}/\text{mL}$		Protein B-5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	
sample(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)		OD450	OD450-Blank	OD450	OD450-Blank	OD450	OD450-Blank
Blank		0.049	/	0.083	/	0.122	/
MM24T	MB13DE2701	0.056	0.006	0.084	0.000	0.116	-0.007
MM24H	HK12DE0423	0.067	0.018	0.099	0.016	0.127	0.005

实施例 8 MM21T 重组抗体的活性检测

使用 ELISA 方法检测 MM21T 重组抗体的活性，分别包被 0.1、1、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的蛋白 A 及蛋白 B，抗体点样浓度 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，验证 MM21T 能够与蛋白 A 结合与蛋白 B 不结合，检测结果如表 12 所示（设置有两个平行试验，表中 OD450 的结果取平均值）。

表 12 MM21T 重组表达抗体活性检测验证

2nd Ab		Rabbit Anti-Mouse IgG F(ab) ₂ /HRP-0.09 μ g/mL			
Coating		Protein A-0.1 μ g/mL		Protein A-1 μ g/mL	
sample(1 μ g/ml)		OD450	OD450-Blank	OD450	OD450-Blank
Blank		0.050	/	0.073	/
MM21T	HB14JL2101	2.398	2.348	3.241	3.168
2nd Ab		Rabbit Anti-Mouse IgG F(ab) ₂ /HRP-0.09 μ g/mL			
Coating		Protein B-0.1 μ g/mL	Protein B-1 μ g/mL	Protein B-5 μ g/mL	
sample(1 μ g/ml)		OD450	OD450-Blank	OD450	OD450-Blank
Blank		0.050	/	0.069	/
MM21T	HB14JL2101	0.051	0.001	0.071	0.002
				0.076	0.005

以上所述，仅为本发明较佳的具体实施方式，但本发明的保护范围并不局限于此，任何熟悉本技术领域的技术人员在本发明揭露的技术范围内，可轻易想到的变化或替换，都应涵盖在本发明的保护范围之内。因此，本发明的保护范围应以所述权利要求的保护范围为准。

1. 一种抗 FGF21 羧基末端的抗体，其特征在于，其包含含有 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 氨基酸序列的轻链可变区以及含有 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 的重链可变区；其中，所述 LCDR1 的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 1，所述 LCDR2 的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 3，所述 LCDR3 的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 4，所述 HCDR1 的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 5，HCDR2 的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 6，HCDR3 的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 7 或 SEQ ID NO: 8。

2. 如权利要求 1 所述的抗体，其特征在于，所述抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9 或者 SEQ ID NO: 10 所示。

3. 如权利要求 1 所述的抗体，其特征在于，所述抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11 或者 SEQ ID NO: 12 所示。

4. 如权利要求 1 所述的抗体，其特征在于，所述抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9 所示，并且所述抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11 所示；或者所述抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 10 所示，并且所述抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 12 所示。

5. 如权利要求 1-4 任一项所述的抗体，其特征在于，所述抗体为全长抗体、Fab 片段、F(ab)₂ 片段、双链 Fv 片段或单链 Fv 片段；优选地，所述抗体为单克隆抗体。

6. 如权利要求 1-4 任一项所述的抗体，其特征在于，所述抗体还包括选自 kappa 或 lambda 亚型的轻链恒定区；优选地，所述轻链恒定区为 kappa 亚型；优选地，所述轻链恒定区包括如 SEQ ID NO: 13 或 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列。

7. 如权利要求 1-4 任一项所述的抗体，其特征在于，所述抗体还包括选自 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 亚型的重链恒定区；优选地，所述重链恒定区为 IgG1 亚型；优选地，所述重链恒定区包括如 SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16 或 SEQ ID NO: 17 所示的氨基酸序列。

8. 一种核酸分子，其编码权利要求 1-7 任一项所述的抗体或其抗原结合部分。

9. 一种载体，其包含权利要求 8 所述的核酸分子；

优选地，所述载体包括质粒、噬菌体、植物细胞病毒、哺乳动物细胞病毒或逆转录病毒。

10. 一种宿主细胞，其含有权利要求 8 所述的核酸分子，或包含权利要求 9 所述的载体；

优选地，所述宿主细胞包括原核细胞、酵母细胞、昆虫细胞或哺乳动物细胞；

优选地，所述宿主细胞为哺乳动物细胞；

优选地，所述宿主细胞为 HEK293 细胞。

11. 一种检测试剂盒，包含权利要求 1-7 任一项所述的抗体，权利要求 8 所述的核酸分子，或权利要求 9 所述的载体。

12. 权利要求 1-7 任一项所述的抗体在诊断或非诊断目的的免疫检测方面的应用；

优选地，所述免疫检测包括：检测 FGF21 羧基末端的完整性。

13. 权利要求 1-7 任一项所述的抗体用于诊断或非诊断目的的免疫检测方面的用途；

优选地，所述免疫检测包括：检测 FGF21 羧基末端的完整性。

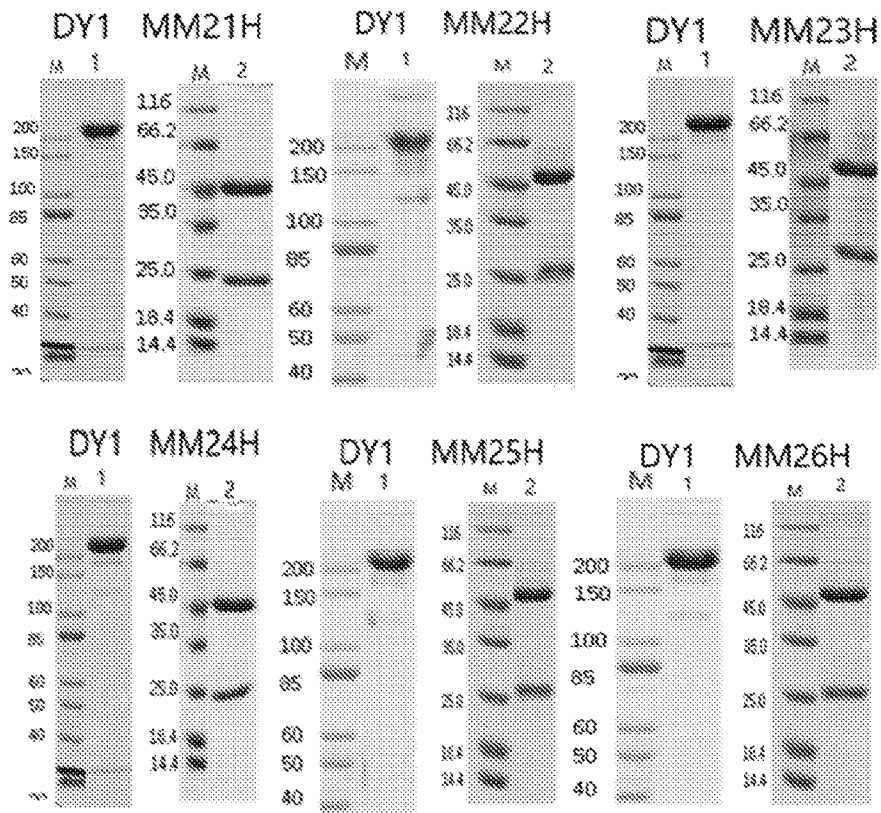


图 1

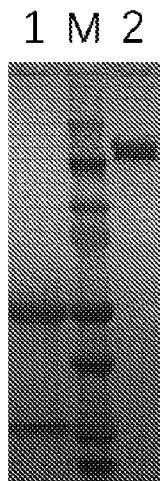


图 2

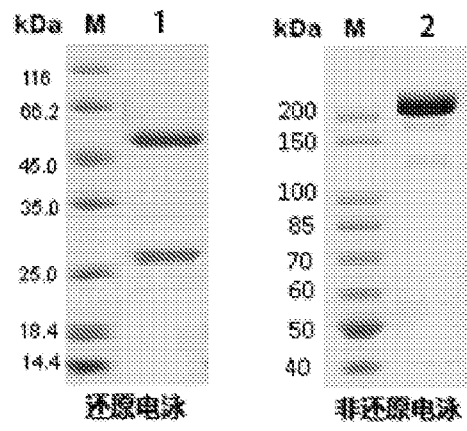


图 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/086227

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C07K 16/22(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; G01N 33/577(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 G01N		
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, CNTXT, SIPOABS, DWPI, VEN, WOTXT, USTXT, EPTXT, CNKI, 万方数据库, baidu学术, PUBMED, ELSEVIER, SPRINGER, ISI web of knowledge, sciencedirect, NCBI, Genbank, EMBL, STN, 中国专利生物序列检索系统: 成纤维细胞生长因子21, fibroblast growth factor 21, FGF21, FGF-21, 羧基端, 羧基末端, C末端, C-末端, C端, C terminal, C-terminal, C-terminus, carboxyl terminal, 抗体, antibody, 单克隆抗体, mab, 广东东阳光药业有限公司, SUNSHINE LAKE, inventor, SEQ ID NOS: 1-17		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2014/0206023 A1 (GAO, P. et al.) 24 July 2014 (2014-07-24) entire document	1-13
A	CN 112005119 A (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.) 27 November 2020 (2020-11-27) entire document	1-13
A	CN 110128525 A (GUANGDONG HEC PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 16 August 2019 (2019-08-16) entire document	1-13
A	COPPAGE, A.L. et al. "Human FGF-21 Is a Substrate of Fibroblast Activation Protein" <i>PLOS ONE</i> , Vol. 11, No. 3, 10 March 2016 (2016-03-10), e0151269, pages 1-10	1-13
A	UMBERGER, T.S. et al. "Novel sandwich immunoassays for the measurement of total and active FGF21" <i>Bioanalysis</i> , Vol. 6, No. 24, 23 December 2014 (2014-12-23), pp. 3283-3293	1-13
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* 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 29 June 2022		Date of mailing of the international search report 07 July 2022
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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/086227

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ZHAO, Y. et al. "Highly selective and sensitive measurement of active forms of FGF21 using novel immunocapture enrichment with LC-MS/MS" <i>Bioanalysis</i> , Vol. 10, No. 1, 14 December 2017 (2017-12-14), pp. 1-11	1-13
.....		

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - on paper or in the form of an image file.
 - b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/086227

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
US	2014/0206023	A1	24 July 2014	None			
CN	112005119	A	27 November 2020	EP	3775930	A1	17 February 2021
				BR	112020019756	A2	26 January 2021
				AU	2019247778	A1	19 November 2020
				IL	277726	D0	30 November 2020
				US	2021025890	A1	28 January 2021
				TW	202011029	A	16 March 2020
				WO	2019195514	A1	10 October 2019
				KR	20200140852	A	16 December 2020
				JP	2021520492	A	19 August 2021
				CA	3092388	A1	10 October 2019
CN	110128525	A	16 August 2019	AU	2019218147	A1	23 July 2020
				US	2021196794	A1	01 July 2021
				TW	201934571	A	01 September 2019
				EP	3749683	A1	16 December 2020
				JP	2021512634	A	20 May 2021
				WO	2019154189	A1	15 August 2019

<p>A. 主题的分类</p> <p>C07K 16/22 (2006.01)i; C12N 15/13 (2006.01)i; G01N 33/577 (2006.01)i</p> <p>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</p>																				
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C07K C12N G01N</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>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))</p> <p>CNABS, CNTXT, SIPOABS, DWPI, VEN, WOTXT, USTXT, EPTXT, CNKI, 万方数据库, baidu学术, PUBMED, ELSEVIER, SPRINGER, ISI web of knowledge, sciencedirect, NCBI, Genbank, EMBL, STN, 中国专利生物序列检索系统:成纤维细胞生长因子 21, fibroblast growth factor 21, FGF21, FGF-21, 羧基端, 羧基末端, C末端, C-末端, C端, C terminal, C-terminal, C-terminus, carboxyl terminal, 抗体, antibody, 单克隆抗体, mab, 广东东阳光药业有限公司, SUNSHINE LAKE, 发明人, SEQ ID NOs: 1-17</p>																				
<p>C. 相关文件</p> <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>US 2014/0206023 A1 (GAO, P. 等) 2014年7月24日 (2014 - 07 - 24) 全文</td> <td>1-13</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 112005119 A (豪夫迈 罗氏有限公司) 2020年11月27日 (2020 - 11 - 27) 全文</td> <td>1-13</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 110128525 A (广东东阳光药业有限公司) 2019年8月16日 (2019 - 08 - 16) 全文</td> <td>1-13</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>COPPAGE, A.L. 等. "Human FGF-21 Is a Substrate of Fibroblast Activation Protein" PLOS ONE, 第11卷, 第3期, 2016年3月10日 (2016 - 03 - 10), e0151269, 第1-10页</td> <td>1-13</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>UMBERGER, T.S. 等. "Novel sandwich immunoassays for the measurement of total and active FGF21" Bioanalysis, 第6卷, 第24期, 2014年12月23日 (2014 - 12 - 23), 第3283-3293页</td> <td>1-13</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	US 2014/0206023 A1 (GAO, P. 等) 2014年7月24日 (2014 - 07 - 24) 全文	1-13	A	CN 112005119 A (豪夫迈 罗氏有限公司) 2020年11月27日 (2020 - 11 - 27) 全文	1-13	A	CN 110128525 A (广东东阳光药业有限公司) 2019年8月16日 (2019 - 08 - 16) 全文	1-13	A	COPPAGE, A.L. 等. "Human FGF-21 Is a Substrate of Fibroblast Activation Protein" PLOS ONE, 第11卷, 第3期, 2016年3月10日 (2016 - 03 - 10), e0151269, 第1-10页	1-13	A	UMBERGER, T.S. 等. "Novel sandwich immunoassays for the measurement of total and active FGF21" Bioanalysis, 第6卷, 第24期, 2014年12月23日 (2014 - 12 - 23), 第3283-3293页	1-13
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																		
A	US 2014/0206023 A1 (GAO, P. 等) 2014年7月24日 (2014 - 07 - 24) 全文	1-13																		
A	CN 112005119 A (豪夫迈 罗氏有限公司) 2020年11月27日 (2020 - 11 - 27) 全文	1-13																		
A	CN 110128525 A (广东东阳光药业有限公司) 2019年8月16日 (2019 - 08 - 16) 全文	1-13																		
A	COPPAGE, A.L. 等. "Human FGF-21 Is a Substrate of Fibroblast Activation Protein" PLOS ONE, 第11卷, 第3期, 2016年3月10日 (2016 - 03 - 10), e0151269, 第1-10页	1-13																		
A	UMBERGER, T.S. 等. "Novel sandwich immunoassays for the measurement of total and active FGF21" Bioanalysis, 第6卷, 第24期, 2014年12月23日 (2014 - 12 - 23), 第3283-3293页	1-13																		
<p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p> <p>* 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</p>																				
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2022年6月29日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2022年7月7日</p>																		
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>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</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>授权官员</p> <p>郝佳</p> <p>电话号码 86-(10)-53961967</p>																		

C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	ZHAO, Y. 等. "Highly selective and sensitive measurement of active forms of FGF21 using novel immunocapture enrichment with LC-MS/MS" Bioanalysis, 第10卷, 第1期, 2017年12月14日 (2017 - 12 - 14), 第1-11页	1-13

第1栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1. c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列列表进行的:
- a. 作为国际申请的一部分提交的:
- 附件C/ST. 25文本文件形式
 - 纸件或图形文件形式
- b. 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:
- c. 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:
- 附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))
 - 纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b)和行政规程第713段)
2. 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。
3. 补充意见:

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/086227

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
US	2014/0206023	A1	2014年7月24日	无			
CN	112005119	A	2020年11月27日	EP	3775930	A1	2021年2月17日
				BR	112020019756	A2	2021年1月26日
				AU	2019247778	A1	2020年11月19日
				IL	277726	D0	2020年11月30日
				US	2021025890	A1	2021年1月28日
				TW	202011029	A	2020年3月16日
				WO	2019195514	A1	2019年10月10日
				KR	20200140852	A	2020年12月16日
				JP	2021520492	A	2021年8月19日
				CA	3092388	A1	2019年10月10日
CN	110128525	A	2019年8月16日	AU	2019218147	A1	2020年7月23日
				US	2021196794	A1	2021年7月1日
				TW	201934571	A	2019年9月1日
				EP	3749683	A1	2020年12月16日
				JP	2021512634	A	2021年5月20日
				WO	2019154189	A1	2019年8月15日