一种融合蛋白

技术领域

本发明涉及生物技术领域，尤其涉及一种同时阻断降钙素基因相关肽（CGRP）通路和垂体腺苷酸环化酶激活肽（PACAP）通路的融合蛋白及其应用。

背景技术

偏头痛是一种血管神经性疾病，全世界有 11 亿患者，而且患者数量还在不断增加，当前全球发病率高达 12-15%，严重的慢性患者发病率是 1.4-2.2%，是全球 10 大致残疾病之一。偏头痛发病高峰年龄是 37 岁，女性比男性高三倍。发作时持续 3 到 72 小时，除一侧头痛外，还伴有怕光、怕声、恶心、呕吐等症状，慢性患者常常伴有心血管疾病、精神失常、抑郁、睡眠困难等问题。有 90%的患者工作、学习、社交都受到影响；30%的女性受到过偏头痛的影响；10%的儿童患有偏头痛。目前这个疾病的诊断和治疗都存在问题，只有 5%的患者得到了正确的诊断和治疗。治疗的方法有 CGRP 类靶向药物、5-HTr 激动剂、钙离子通道阻断剂、抗癫痫药、抗抑郁药、NSAID、神经阻断/刺激，以及其它非特异性药物。

偏头痛的发表原因不明确，故有原发性头痛之称。一般认为中枢神经系统的某种刺激，如 CSD（Cortical Depression Spreading，皮质抑制扩散）导致三叉神经的 C 纤维末端释放神经递质降钙素基因相关肽（Calcitonin Gene-Related Peptide，CGRP），垂体腺苷酸环化酶激活肽（Pituitary Adenylate Cyclase-activating Peptide，PACAP），Substance C 等，这些神经递质和 A δ 纤维上的受体结合，通过直接或者间接途径触发偏头痛。

目前已经知道涉及偏头痛的主要信号通路至少有两条：CGRP 和 PACAP。CGRP 和 PACAP 都是神经递质，在神经系统和全身其它组织都有分布，两者的受体都是 B 类 GPCR 神经递质，通过和受体特异性结合，导致细胞内 cAMP（环磷腺苷）浓度升高而达到传递信号的目的。

许多新药的开发目的在于阻断这两条通路的信号传递。CGRP 和其受体的拮抗剂已经成功地用于偏头痛的治疗和预防，目前在欧美上市的单抗有 Eptinezumab（Lunbeck）、Erenumab（Amgen）、Fremanezumab（Teva）和 Galcanezumab（Eli Lilly）四款。抗 CGRP 受体的小分子也有 Atogepant（AbbVie），Ubrogepent（AbbVie）和 Rimegepent（Pfizer）在欧美市场上市。相比之下，PACAP 和 PAC1 的拮抗剂尚在开发中。临床研究显示，给健康人输入 PACAP 会诱发偏头痛样的头痛发作。在慢性偏头痛患者的血中也发现高于健康人的 PACAP。这些研究都证明 PACAP 和偏头痛关系密切。

根据新英格兰杂志的最新统计，治疗偏头痛主要药物的响应率都很低。预防用的 CGRP 类单抗的响应率只要 20-24%，小分子 CGRP 受体拮抗剂则只有 10-14%左右。患者对药物响应率低的原因之一是偏头痛的发病涉及多条信号通路，因此，需要开发双功能或多功能药物以达到最大的治疗效果，给广大的偏头痛患者，尤其是难治性偏头痛患者带来有效的治疗手段。

发明内容

本发明提供了一种同时阻断 CGRP 和 PACAP 通路的融合蛋白，该融合蛋白可以提高治疗偏头痛药物的响应率。

在一方面，本发明提供了一种阻断降钙素基因相关肽（CGRP）通路的单域抗体，其中，上述单域抗体包含如氨基酸序列 SEQ ID NO: 2、7、12、17、22、27、32、37、42、47、52 或 57 所示的 CDR1 或其任何变体，如氨基酸序列 SEQ ID NO: 3、8、13、18、23、28、33、38、43、48、53 或 58 所示的 CDR2 或其任何变体和如氨基酸序列 SEQ ID NO: 4、9、14、19、24、29、34、39、44、49、54 或 59 所示的 CDR3 或其任何变体。

另一方面，本发明提供了一种融合蛋白，上述融合蛋白同时阻断降钙素基因相关肽（CGRP）通路和垂体腺苷酸环化酶激活肽（PACAP）通路，其中，上述融合蛋白包含至少一个单域抗体、至少一个 Fc 片段和至少一个垂体腺苷酸环化酶 1 的胞外域片段（PAC1 ECD）。

其中，上述融合蛋白包含一条肽链，上述肽链的结构为一个 PAC1 ECD 通过连接子与一个 Fc 片段的 C 端相连，上述 Fc 片段的 N 端与一个单域抗体的 C 端融合；

可选地，上述融合蛋白包含两条肽链，上述肽链的结构为一个 PAC1 ECD 通过连接子与一个 Fc 片段的 C 端相连，上述 Fc 片段的 N 端与一个单域抗体的 C 端融合，上述两条肽链的两个 PAC1 ECD 之间通过连接子连接；

可选地，上述融合蛋白包含三条肽链，上述肽链的结构为一个 PAC1 ECD 通过连接子与一个 Fc 片段的 C 端相连，上述 Fc 片段的 N 端与一个单域抗体的 C 端融合，上述三条肽链的三个 PAC1 ECD 之间通过连接子连接。

另一方面，本发明提供了编码上述单域抗体、融合蛋白的核酸。

另一方面，本发明提供了包含上述核酸的载体。

另一方面，本发明提供了包含上述核酸或载体的细胞。

另一方面，本发明提供了一种药物组合物或试剂盒，其包含上述单域抗体、融合蛋白以及药物上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

另一方面，本发明提供了一种上述单域抗体、融合蛋白、核酸、载体和/或细胞和/或药物组合物或试剂盒在制备用于治疗与 CGRP 和 PACAP 通路激活有关的疾病中的用途。

本发明提供的融合蛋白可以同时阻断两条信号通路，提高偏头痛患者对药物的响应率，给广大的偏头痛患者，尤其是难治性偏头痛患者带来有效的治疗手段。

附图说明

通过阅读参照以下附图所作的对非限制性实施例所作的详细描述，本发明的其他特征、目的和优点将会变得更明显。附图仅用于示出具体实施方式的目的，而并不认为是对本发明的限制。在附图中：

图 1 示出了 RC-Fc 的电泳结果图。

图 2 示出了本发明重建的 CGRP 受体胞外区保持结合其配体 CGRP 的能力，但不结合无关多肽 PACAP。

图 3 示出了不同 SK-N-MC 细胞数量下 CGRP 诱导 cAMP 的产生。

图 4 示出了 42wtFc、42hv10Fc、42hv11Fc、42hv12Fc 的电泳结果图。

图 5 示出了人源化和 Fc 融合后的 42 号 VHH 保留抑制细胞 cAMP 产生的能力。

图 6 示出了人 PAC1 的基因结构。其中，竖杠是外显子。

图 7 示出了 PAC1 的三种配体，包括 PACAP（PACAP38），PACAP27 和 VIP。

图 8 示出了 PAC1 ECD-Fc、PACs1 ECD-Fc 的电泳结果图。

图 9 示出了 PAC1 ECD-Fc 和 PAC1s ECD-Fc 体外结合 PACAP 能力的比较。

图 10 示出了 BY003 的结构。

图 11 示出了 BY003 的工作原理。

图 12 示出了 BY003 的电泳结果图。其中，从左至右依次为 42hv10FcNA-1×PAC1s ECD、42hv10FcNA-2×PAC1s ECD 和 42hv10FcNA-3×PAC1s ECD 的电泳结果图，分别对应一个、二个或三个 PAC1s ECD 的情况。

图 13 示出了三个 CGRPr 稳定细胞株的 CGRP 标准曲线。

图 14 示出了 BY003 抑制 CGRP 诱导的 CHO-hCGRPrC3 细胞 cAMP 的产生。

图 15 示出了六个 PAC1 稳定细胞株的 PACAP 标准曲线。

图 16 示出了 BY003 在细胞水平阻断 PACAP 信号传递。

具体实施方式

I. 定义

在本发明中，除非另有说明，否则本文中使用的科学和技术名词具有本领域技术人员所通常理解的含义。并且，本文中所用的蛋白质和核酸化学、分子生物学、细胞和组织培养、微生物学、免疫学相关术语和实验室操作步骤均为相应领域内广泛使用的术语和常规步骤。同时，为了更好地理解本发明，下面提供相关术语的定义和解释。

术语“融合”或“融合的”在用于氨基酸序列（例如肽、多肽或蛋白）时，是指例如通过化学键合或重组手段，将两个或更多个氨基酸序列组合成为非天然存在的单一氨基酸序列。融合氨基酸序列可通过两个编码多核苷酸序列的基因重组产生，并且可以通过将含有重组的多核苷酸的构建体引入宿主细胞的方法来表达。

术语“多肽”、“肽”和“蛋白”在本公开中可互换使用，其指氨基酸残基的聚合物，或多个氨基酸残基聚合物的集合体。其涵盖天然或人工蛋白质、蛋白质片段及具有蛋白质序列的多肽类似物。这些术语应用于其中的一个或多个氨基酸残基为对应的天然存在的氨基酸的人造化学模拟物的氨基酸聚合物，以及天然存在的氨基酸聚合物和非天然存在的氨基酸聚合物。多肽可以是单体的或多聚体的。

就抗体链多肽序列而言，短语“基本相同”可理解为表现出与参照多肽序列至少 60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更多的序列同一性的抗体链。就核酸序列而言，该术语可理解为表现出与参照核酸序列至少大于 60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的序列同一性的核苷酸序列。

序列“相同性”或“同一性”具有本领域公认的含义，并且可以利用公开的技术计算两

个核酸或多肽分子或区域之间序列相同性的百分比。可以沿着多核苷酸或多肽的全长或者沿着该分子的区域测量序列相同性(参见,例如:Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Pres, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; and Sequence Analysis Primer, Gribskov, M.and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991)。虽然存在许多测量两个多核苷酸或多肽之间的相同性的方法,但是术语"相同性"是技术人员公知的(Carrillo, H. & Lipman, D., SIAM J Applied Math 48:1073 (1988))。

术语"抗体",在本领域中也称为"免疫球蛋白"(Ig)是指从成对的重和轻多肽链构建的蛋白质;存在各种 Ig 同种型,包括 IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM。当抗体正确折叠时,每条链折叠成通过更线性的肽序列连接的许多不同的球状结构域。例如,免疫球蛋白轻链折叠成可变(VL)和恒定(CL)结构域,而重链折叠成可变(VH)和三个恒定(CH1、CH2、CH3)结构域。重链和轻链可变结构域(VH 和 VL)的相互作用导致抗原结合区(Fv)的形成。

术语"单域抗体"(single-domain antibody, sdAb)指只包含单一的抗体可变区(VH/VL)的抗体,同常规的抗体一样,单域抗体能够选择性地结合特定抗原。单域抗体的分子量仅为 12-15kDa,远小于由两条重链和两条轻链组成的普通抗体(150-160kDa)。术语"重链抗体"、"重链单域抗体"或"纳米单链抗体"包含单一可变结构域 VHH(variable domain of heavy chain of heavy-chainantibody)和两个恒定结构域(CH2 和 CH3)。重要的是,克隆的和分离的 VHH 结构域是具有原始重链抗体的完全的抗原结合能力的完全稳定的多肽。该类抗体相比于其他抗体轻链天然缺失。此类单域抗体是从骆驼科动物体内发现的。单域抗体具有结构稳定、分子小、溶解性好、耐受各类不良环境、易于人源化等优点,已经被广泛使用在小型化基因工程抗体研究、新药开发以及疾病的诊断治疗上。单域抗体的实例包括源自骆驼科动物的(羊驼和骆驼)和软骨鱼(例如,护士鲨)的单域抗体和源自重组方法来自人和小鼠抗体的单域抗体。如本文中所用,术语"单域抗体"包括通过噬菌体展示或其它技术直接从任何来源的 VH、VHH、VL 或 VNAR 库分离的那些 sdAb、来源于前述 sdAb 的 sdAb、重组产生的 sdAb 以及通过此类 sdAb 的进一步修饰(通过人源化、亲和力成熟、稳定化、增溶作用、骆驼化(camelization)或抗体工程的其它方法)产生的那些 sdAb。本公开还涉及了保留 sdAb 的抗原结合功能和特异性的同源物、衍生物或片段。

术语"连接子"指包含一个或多个氨基酸,典型地约 2-20 个氨基酸的肽。接头在本领域中是已知的或在本文中描述。在一些实施方案中,所述接头是柔性多肽。所述柔性多肽由柔性氨基酸组成,所述柔性氨基酸选自 Gly、Ser、Ala 和 Thr 中的至少一种。合适的非免疫原性接头肽是例如(G4S)n,(SG4)n 或 G4(SG4)n 肽接头,即肽选自 GGGGS、GGGGSGGGGS、SGGGGSGGGG、GGGGGSGGGGSSGGGGS、GGGGSGGGGSGGGGS、GGGGSGGGGSGGGG、GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS、GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS、GSGSGSGS、GGSGSGSG、GGSGSG、GGSG。

术语“CDR”指互补决定区（complementarity-determining region），已知抗体分子的每个重链和轻链具有 3 个 CDR。CDR 也称作高变区，且存在于抗体的每个重链和轻链的可变区中，在 CDR 的一级结构中具有非常高的变异性位点。本说明书中，重链的 CDR 由来自重链的氨基端序列的氨基端的 CDR1、CDR2、CDR3 表示，轻链的 CDR 由来自轻链的氨基端序列的氨基端的 CDR1、CDR2、CDR3 表示。这些位点在三级结构中彼此临近，并决定抗体所结合的抗原的特异性。

关于抗体或其抗原结合片段的“特异性结合”或“免疫特异性地结合”在本文中可交换使用，并且指抗体或抗原结合片段通过抗体和抗原的抗体结合位点之间的非共价相互作用与同种抗原形成一个或多个非共价键的能力。所述抗原可以是分离的抗原或存在于肿瘤细胞。通常，免疫特异性地结合（或特异性结合）抗原的抗体是以约或 1×10^{7}M-1 或 1×10^{8}M-1 或更大的亲和常数 Ka（或者 1×10-7M 或 1×10-8M 或更低的解离常数（Kd））结合所述抗原。亲和常数可以通过抗体反应的标准动力学方法来测定，例如，免疫测定、表面等离子共振（SPR）（Rich and Myszka (2000) Curr. Opin.Biotechnol 11:54; Englebienne (1998) Analyst. 123:1599）、等温滴定量热法（ITC）或本领域已知的其他动力学相互作用测定；还参见描述用于计算抗体的结合亲和力的示例性 SPR 和 ITC 方法的美国专利第 7，229，619 号）。用于实时检测和监测结合速率的仪器和方法是已知的，并且可商购（参见，BiaCore 2000, Biacore AB, Upsala, Sweden and GE Healthcare Life Sciences; Malmqvist (2000) Biochem.Soc.Trans. 27:335）。

术语“结合亲和力”或“亲和力”指分子（例如抗体）的单一结合位点与其结合配偶物（例如，抗原）之间非共价相互作用的总和的强度。除非另外指出，否则如本文所用，“结合亲和力”指反应结合对子的成员（例如，抗体和抗原）之间 1∶1 相互作用的固有结合亲和力。分子 X 对其配偶物 Y 的亲和力可以通常由解离常数(Kd)代表。亲和力可以由本领域已知的常见方法测量，包括本文所述的那些方法。低亲和力抗体通常缓慢结合抗原并且倾向于轻易解离，而高亲和力抗体通常较快地结合抗原并且倾向于更长地保持结合。测量结合亲和力的多种方法是本领域已知的。

关于本公开融合蛋白的生物活性所使用的术语“抑制”或“中和”指多肽基本上拮抗、阻止、防止、限制、减慢、破坏、消除、停止、降低或逆转例如受抑制者（包含但不限于，生物活性）的进展或严重程度的能力。

术语“核酸”和“核酸分子”指包含至少两个连接的核酸或核酸衍生物的寡聚体或聚合物，包括通常通过磷酸二酯键连接在一起的脱氧核糖核酸（DNA）和核糖核酸（RNA）。如本文所使用，术语“核酸分子”意欲包括 DNA 分子及 RNA 分子。核酸分子可为单链或双链，且可为 cDNA。

术语“载体”包括能够表达 DNA 的载体，所述 DNA 与诸如启动子区的能够影响这类 DNA 片段表达的调控序列可操作地连接。这类额外的片段可以包括启动子和终止子序列，并且任选地可以包括一个或多个复制起点、一个或多个选择标记、增强子、多腺苷酸化信号等。表达载体一般来源于质粒或病毒 DNA，或者可以包含这两者的元件。因此，表达载体指重组 DNA 或 RNA 构建体，例如质粒、噬菌体、重组病毒或其他载体，当引入适当的宿主细胞时，

导致克隆 DNA 的表达。适当的表达载体是本领域技术人员公知的，并且包括在真核细胞和/或原核细胞中可复制的表达载体以及保持游离的表达载体或者整合入宿主细胞基因组的表达载体。

术语“药物组合物”指这样的制剂，其以允许包含在其中的活性成分的生物学活性有效的形式存在，并且不包含对施用所述制剂的受试者具有不可接受的毒性的另外的成分。

术语“药学上可接受的载体”指与治疗剂一起施用的不干扰活性成分的生物活性的一种或多种非毒性材料，包括但不限于缓冲液、防腐剂、相容的载体、稀释剂、佐剂(例如弗氏佐剂(完全和不完全的))、赋形剂、媒介物以及任选地其他添加剂或包封物质。适用于本公开的药用载体可以是常规的药物制剂辅料；以及适用于递送所公开中和抗体的组合物和制剂。在一般情况下，载体的性质取决于所使用的施用的特定方式。例如，肠胃外制剂通常包括可注射液体，其包括药物学上和生理学上可接受的液体如水、生理盐水、平衡盐溶液、葡萄糖水、甘油等作为载体(vehicle)。对于固体组合物(例如粉末、丸剂、片剂、或胶囊的形式)，常规的无毒固体载体可包括，例如，药物级甘露醇、乳糖、淀粉、或硬脂酸镁。除了生物学上的中性载体外，被施用的药物组合物也可以包含少量无毒辅助物质，如润湿剂或乳化剂、防腐剂、和 pH 缓冲剂等，如醋酸钠或山梨醇单月桂酸酯。

术语“治疗”指患有疾病或疾病状况的个体表示所述个体的症状部分或全部缓解，或者在治疗后保持不变。因此，治疗包括预防、治疗和/或治愈。预防指防止潜在疾病和/或防止症状恶化或疾病发展。治疗还包括所提供的任何抗体或其抗原结合片段以及本文所提供的组合物的任何药学用途。

亦提供本文所述序列表中所述序列的“保守序列修饰”，即不消除由核苷酸序列编码或含有氨基酸序列的抗体与抗原的结合的核苷酸及氨基酸序列修饰。这些保守序列修饰包括保守核苷酸及氨基酸取代以及核苷酸及氨基酸添加及缺失。例如，可通过本领域已知的标准技术（例如定点诱变及 PCR 介导的诱变）将修饰引入本文所述的序列表中。保守序列修饰包括保守氨基酸取代，其中氨基酸残基被替换为具有类似侧链的氨基酸残基。具有类似侧链的氨基酸残基的家族是本领域中已有定义的。这些家族包括具有碱性侧链的氨基酸（例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸）、具有酸性侧链的氨基酸（例如天冬氨酸、谷氨酸）、具有不带电极性侧链的氨基酸（例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸）、具有非极性侧链的氨基酸（例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸）、具有 β 分枝侧链的氨基酸（例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸）及具有芳香族侧链的氨基酸（例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸）。因此，抗 BCMA 抗体中的预测的非必需氨基酸残基优选被来自同一侧链家族的另一氨基酸残基替代。鉴定不消除抗原结合的核苷酸及氨基酸保守取代的方法为本领域所熟知(例如，参见 Brummell et al., Biochem. 32: 1180-1187 (1993); Kobayashi et al., Protein Eng. 12(10): 879-884 (1999); Burks et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 94: 412-417 (1997))。在一些实施方案中，在一个或多个或全部三个重链 CDR 中的氨基酸改变不超过 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个、9 个或 10 个。优选地，上述氨基酸改变为氨基酸取代，优选保守取代。在一些实施方案中，抗体变体与亲本抗体在目的抗体序列区域上具有至少大于 60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、

95%、96%、97%、98%、99%或更高的序列同一性。示例性的取代如下表 1 所示：

表 1 氨基酸保守取代

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

II. 具体实施方案详述

在一方面，本发明提供了一种阻断降钙素基因相关肽（CGRP）通路的单域抗体，其中，上述单域抗体包含如氨基酸序列 SEQ ID NO: 2、7、12、17、22、27、32、37、42、47、52 或 57 所示的 CDR1 或其任何变体，如氨基酸序列 SEQ ID NO: 3、8、13、18、23、28、33、38、43、48、53 或 58 所示的 CDR2 或其任何变体和如氨基酸序列 SEQ ID NO: 4、9、14、19、24、29、34、39、44、49、54 或 59 所示的 CDR3 或其任何变体。

在一些优选的实施方式中，上述单域抗体包含如氨基酸序列 SEQ ID NO: 12 所示的 CDR1 或其任何变体，如氨基酸序列 SEQ ID NO: 13 所示的 CDR2 或其任何变体和如氨基酸序列 SEQ ID NO: 14 所示的 CDR3 或其任何变体。

在一些实施方式中，上述单域抗体包含如氨基酸序列 SEQ ID NO: 1、6、11、16、21、26、31、36、41、46、51、56、61、62 或 63 所示的可变区或其任何变体。

在一些优选的实施方式中，上述单域抗体包含如氨基酸序列 SEQ ID NO: 61、62 或 63 所示的可变区或其任何变体。

在一些优选的实施方式中，上述单域抗体包含如氨基酸序列 SEQ ID NO: 61 所示的可变

区或其任何变体。

在一些优选的实施方式中，在上述单域抗体中的氨基酸具有保守取代，保守取代氨基酸的数量不超过 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个、9 个或 10 个。

在一方面，本发明提供了一种融合蛋白，上述融合蛋白同时阻断降钙素基因相关肽（CGRP）通路和垂体腺苷酸环化酶激活肽（PACAP）通路，其中，上述融合蛋白包含至少一个单域抗体、至少一个 Fc 片段和至少一个垂体腺苷酸环化酶 1 的胞外域片段(PAC1 ECD)。

在一些实施方式中，上述融合蛋白包含一条肽链，上述肽链的结构为一个 PAC1 ECD 通过连接子与一个 Fc 片段的 C 端相连，上述 Fc 片段的 N 端与一个单域抗体的 C 端融合。

在一些实施方式中，上述融合蛋白包含两条肽链，上述肽链的结构为一个 PAC1 ECD 通过连接子与一个 Fc 片段的 C 端相连，上述 Fc 片段的 N 端与一个单域抗体的 C 端融合，上述两条肽链的两个 PAC1 ECD 之间通过连接子连接。

在一些实施方式中，上述融合蛋白包含三条肽链，上述肽链的结构为一个 PAC1 ECD 通过连接子与一个 Fc 片段的 C 端相连，上述 Fc 片段的 N 端与一个单域抗体的 C 端融合，上述三条肽链的三个 PAC1 ECD 之间通过连接子连接。

在一些实施方式中，上述单域抗体为结合 CGRP 受体的单域抗体。

在一些实施方式中，上述单域抗体包含如氨基酸序列 SEQ ID NO: 2、7、12、17、22、27、32、37、42、47、52 或 57 所示的 CDR1 或其任何变体，如氨基酸序列 SEQ ID NO: 3、8、13、18、23、28、33、38、43、48、53 或 58 所示的 CDR2 或其任何变体和如氨基酸序列 SEQ ID NO: 4、9、14、19、24、29、34、39、44、49、54 或 59 所示的 CDR3 或其任何变体。

在一些实施方式中，上述单域抗体包含如氨基酸序列 SEQ ID NO: 12 所示的 CDR1 或其任何变体，如氨基酸序列 SEQ ID NO: 13 所示的 CDR2 或其任何变体和如氨基酸序列 SEQ ID NO: 14 所示的 CDR3 或其任何变体。

在一些优选的实施方式中，在一个或多个或全部三个上述 CDR 中的氨基酸具有保守取代，保守取代氨基酸的数量不超过 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个、9 个或 10 个。

在一些实施方式中，上述单域抗体包含如氨基酸序列 SEQ ID NO: 1、6、11、16、21、26、31、36、41、46、51、56、61、62 或 63 所示的可变区或其任何变体。

在一些优选的实施方式中，上述单域抗体包含如氨基酸序列 SEQ ID NO: 61、62 或 63 所示的可变区或其任何变体。

在一些更优选的实施方式中，上述单域抗体包含如氨基酸序列 SEQ ID NO: 61 所示的可变区或其任何变体。

在一些优选的实施方式中，在上述单域抗体中的氨基酸具有保守取代，保守取代氨基酸的数量不超过 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个、9 个或 10 个。

在一些实施方式中，上述 PAC1 ECD 选自 PAC 异构体：PAC1、PAC1s 或 PAC1vs 的 ECD。

在一些优选的实施方式中，上述 PAC1 ECD 为 PAC1s ECD。

在一些优选的实施方式中，上述 PAC1 ECD 包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 64 及与其具有 80%或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列。

在一些优选的实施方式中，上述 PAC1s ECD 包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 66 及与其具有 80%或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列。

在一些实施方式中，上述 Fc 片段包含来源于人免疫球蛋白的铰链区，恒定区 2（CH2）和恒定区 3（CH3）结构域。

在一些优选的实施方式中，上述 Fc 片段选自人 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4；更优选地，上述 Fc 片段选为人 IgG1。

在一些优选的实施方式中，上述 Fc 片段具有氨基酸取代；更优选地，上述氨基酸取代包括上述 Fc 片段上第 297 位的天冬酰胺 N 被丙氨酸 A 取代，其中，Fc 片段上各氨基酸位点采用 EU 抗体编号系统编号。

在一些优选的实施方式中，上述 Fc 片段包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 68 及与其具有 80%或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列。

在一些实施方式中，上述连接子为柔性多肽连接子。

在一些优选的实施方式中，上述柔性多肽连接子选自 GGGGS、GGGGSGGGGS、SGGGGSGGGG、GGGGGSGGGGSSGGGGS、GGGGSGGGGSGGGGS、GGGGSGGGGSGGGG、GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS、GGGGSGGGGSGGGGSGGGG、GSGSGSGS、GGSGSGSG、GGSGSG、GGSG。

在一些更优选的实施方式中，上述柔性多肽连接子为 GGGGS（SEQ ID NO: 79）。

另一方面，本发明提供了一种编码上述融合蛋白的核酸。

另一方面，本发明提供了包含上述核酸的载体。

另一方面，本发明提供了包含上述核酸或载体的细胞。

另一方面，本发明提供了一种药物组合物或试剂盒，其包含上述融合蛋白以及药物上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

另一方面，本发明提供了上述融合蛋白、核酸、载体和/或细胞和/或药物组合物或试剂盒在制备用于治疗与 CGRP 和 PACAP 通路激活有关的疾病中的用途。

在一些优选的实施方式中，上述疾病为偏头痛。

以上描述仅为本发明的较佳实施例以及对所运用技术原理的说明。本领域技术人员应当理解，本发明中所涉及的公开范围，并不限于上述技术特征的特定组合而成的技术方案，同时也应涵盖在不脱离上述公开构思的情况下，由上述技术特征或其等同特征进行任意组合而形成的其它技术方案。例如上述特征与本发明中公开的（但不限于）具有类似功能的技术特征进行互相替换而形成的技术方案。

实施例

实施例 1：合成抗 CGRP 受体的单域抗体

通过用 CGRP 受体的 ECD 免疫美洲驼，经过多轮筛选和人源化后获得抗 CGRP 受体的单域抗体的最佳序列 42hv10。

为获得高选择性和高亲和力的结合抗体，使用体外表达和纯化的 CGRP ECD 和人免疫球蛋白 G1(IgG1)的可结晶片段（Fc）融合的蛋白（简称 RC-Fc）作为免疫原来免疫美洲驼，然后从高滴度的美洲驼血中分离出淋巴细胞并提取其信使核糖核酸（mRNA）。用这些 mRNA 来构建噬菌体库，再用酶联方法（Enzyme-Linked Immunosorbent Assay – ELISA）分别筛选出能结合 RC-Fc 的含有单域抗体的阳性菌落和只能结合 Fc 的含有单域抗体的阳性菌落。这些菌落包括所有结合 CGRP ECD 和 Fc 的单域抗体，将只结合 Fc 的菌落排除，将剩下的 CGRP ECD 阳性且 Fc 阴性的菌落送去测序。通过序列分析和验证，获得了一批能特异性结合 CGRP ECD 的单域抗体。

1. RC-Fc 的制备

1.1 RC-Fc 的设计

RC-Fc 由 CGRP 受体：人 Ramp1 ECD、CLR ECD 和 Fc 融合而成。Ramp1 ECD 来自 Genbank ID NM_005855.4 核酸序列 132-404（SEQ ID NO: 69）。核酸序列如下：

tgccaggaggctaactacggtgccctcctccgggagctctgcctcacccagttccaggtagacatggaggccgtcggggagacgctgtggtgtgactggggcagg
accatcaggagctacagggagctggccgactgcacctggcacatggcggagaagctgggctgcttctggcccaatgcagaggtggacaggttcttcctggcagtg
catggccgctacttcaggagctgccccatctcaggcagggccgtgcgggacccgcccggcagc

相应的氨基酸序列来自于 NP_005846.1 27-117（SEQ ID NO: 70）。氨基酸序列如下：
CQEANYGALLRELCLTQFQVDMEAVGETLWCDWGRTIRSYRELADCTWHMAEKLGCFWPNAEVDRFF
LAVHGRYFRSCPISGRAVRDPPGS

CLR ECD 来自于 Genbank ID NM_001271751.2 核酸序列 407-782（SEQ ID NO: 71）。核酸序列如下：

agaattagaagagagtcctgaggactcaattcagttgggagttactagaaataaaatcatgacagctcaatatgaatgttaccaaaagattatgcaagaccccattcaac
aagcagaaggcgtttactgcaacagaacctgggatggatggctctgctggaacgatgttgcagcaggaactgaatcaatgcagctctgccctgattactttcaggactt
tgatccatcagaaaaagttacaaagatctgtgaccaagatggaaactggtttagacatccagcaagcaacagaacatggacaaattatacccagtgtaatgttaacacc
cacgagaaagtgaagactgcactaaatttgttttacctgaccataat

相应的氨基酸序列来自于 NP_001258680.1 氨基酸序列 23-146（SEQ ID NO: 72）。氨基酸序列如下：

ELEESPEDSIQLGVTRNKIMTAQYECYQKIMQDPIQQAEGVYCNRTWDGWLCWNDVAAGTESMQLCPD
YFQDFDPSEKVTKICDQDGNWFRHPASNRTWTNYTQCNVNTHEKVKTALNLFYLTI

Fc 部分来自 Genbank ID JX292763.1 核酸序列 661-1359（SEQ ID NO: 73）。克隆用核酸序列如下：

gagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctgggggggaccgtcagtcttcctcttccccccaaaacccaaggacaccct
catgatctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataat
gccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgggtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagt
gcaaggtctccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgg
gatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaa
ctacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgct
ccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaatga

相应的氨基酸序列 Genbank ID AFR78282.1 221-452 （SEQ ID NO: 74）如下：

EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

或者，Fc 部分来自 Genbank ID MW176619.1 核酸序列 663-1358（SEQ ID NO: 91）。克隆用核酸序列如下：

gagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctgggggggaccgtcagtcttcctcttcccccaaaacccaaggacaccct
catgatctcccggaccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataat
gccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtg
caaggtctccaacaaagccctcccagccccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccggg
aggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatccgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaac
tacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctatagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctc
cgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtccccgggtaaa

相应的氨基酸序列 Genbank ID QRG33954 221-452 （SEQ ID NO: 92）如下：

EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

由于 Ramp1 ECD 和 CLR ECD 氨基酸系列不同，在和 Fc 融合时需要通过 Knob in Hole (KiH)技术配对，Ramp1 ECD 的 C 端和具有 T366W 突变的 Fc N 端联系形成 R 链；CLR ECD 的 C 端则和具有 T366S、L368A 和 Y407V 突变的 Fc N 端融合形成 C 链。

RC-Fc Ramp1 ECD（RC-Fc R）链的氨基酸序列（SEQ ID NO: 75）如下：

CQEANYGALLRELCLTQFQVDMEAVGETLWCDWGRTIRSYRELADCTWHMAEKLGCFWPNAEVDRFF
LAVHGRYFRSCPISGRAVRDPPGSEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL**W**CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

其中，RC-Fc R 链所融合的 Fc 具有 T366W 突变，如下（SEQ ID NO: 76）所示：

EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
REEMTKNQVSL**W**CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

RC-Fc CLR ECD（RC-Fc C）链的氨基酸序列（SEQ ID NO: 77）如下：

ELEESPEDSIQLGVTRNKIMTAQYECYQKIMQDPIQQAEGVYCNRTWDGWLCWNDVAAGTESMQLCPD
YFQDFDPSEKVTKICDQDGNWFRHPASNRTWTNYTQCNVNTHEKVKTALNLFYLTIEPKSCDKTHTCPP
CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL**S**
C**A**VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL**V**SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN
HYTQKSLSLSPGK

其中，RC-Fc C 链所融合的 Fc 具有 T366S、L368A 和 Y407V 突变，如下（SEQ ID NO: 78）所示：

EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
REEMTKNQVSL**S**C**A**VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL**V**SKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

1.2 RC-Fc 的基因合成、表达和纯化

RC-Fc 质粒委托泰州生物科技有限公司（百英生物）进行合成，方法如下：合成的基因片段与 NotI（New England BioLabs Inc., NEB，R0189L）/XbaI（New England BioLabs Inc., NEB，R0145L）酶切回收（百英自制）后的 pcDNA3.4 载体(ThermoFisher Scientific，EL0011)连接。连接产物转化 Top10 感受态细胞，挑取阳性克隆扩大培养，用百英配制的质粒小提试剂盒(百英自制)小量抽提质粒测序。测序正确的克隆接种于 LB 培养基（百英自制）中扩大培养，用百英配制的试剂盒（百英自制）大量抽提质粒并再次测序验证。

采用转染试剂(百英自制)，将表达质粒转染 293 细胞后，恒温培养箱(精琪，IS-RDS6C5)培养 5 天后收获细胞培养物。将细胞培养物离心后取上清，过滤除去细胞碎片，收集澄清液。

使用 Protein A 亲和层析柱捕获目的蛋白。目的蛋白经过滤，用测定 A280 的方法确定最终产量，使用 NanoDrop One (ThermoFisher Scientific, ND-ONE-W)仪器读取 280 nm 吸光度值。将蛋白吸至透析袋放 1XPBS 的烧杯中透析，纯化产品通过电泳鉴定，电泳结果如图 1 所示。

2. RC-Fc 结合 CGRP 的验证

表达纯化后的 RC-Fc 融合蛋白经过验证能和其配体 CGRP 结合后才用于动物免疫，验证方是成都阿帕克生物有限公司的结合酶联（ELISA），具体如下。

链酶亲和素（Streptavidin）包被的 96 孔酶标板（ThermoFisher Scientific™，15126）经过 PBST（1xPBS (Absin, abs9266), 0.1% Tween 20 (Solarbio，T8220), pH=7.4）清洗 3 次后每孔加入 1000 ng 的 Biotin-CGRP（南京源肽生物科技有限公司，A03Biotin137, P200629-HS319172），室温孵育 2 小时。去掉 PBST，每孔加入 100 μL 用 PBST 系列稀释好的 RC-Fc 融合蛋白，于 37℃孵育 1 小时。用 PBST 将孵育了样品的酶标板洗涤 5 次，然后加入 100 μL 用封闭液稀释（PBST+3%脱脂奶粉（Solarbio, D8340)）1：5000 的对应二抗 Anti-human IgG-HRP（抗人免疫球蛋白 G-辣根过氧化物酶，杭州华安生物，HR1214），于 37℃孵育 1 小时。

用 PBST 将孵育了二抗的酶标板洗涤 5 次，每孔加入 100 μL TMB(Trimethylolpropane)单组分显色液(Solarbio, 20190402)，于 37℃孵育 7 分钟，每孔加入 100 μL 1M HCL(科隆化工)终止反应，最后用酶标仪(ThermoFisher Scientific, 51119080ET)在 450 nm 波长读取 OD 值。ODOD450 值用 GraphPad Prism9.3.1 的 Nonlinear Regression One Site Specific Binding 模式分析，得到 RC-Fc 结合 CGRP 的 Bmax 是 5.198，Kd 是 16.12 nM。而 RC-Fc 结合阴性对照多肽 PACAP 的 Bmax 是 0.069，Kd 无效。结果如图 2 所示，显示本实施例重建的 CGRP 受体胞外区保持结合其配体 CGRP 的能力，但不结合无关多肽 PACAP。

3. 用 RC-Fc 免疫美洲驼

免疫美洲驼，VHH 筛选过程委托成都阿帕克生物科技有限公司（阿帕克生物）进行。免疫前取血 10 mL，留为阴性血清对照，后将 0.5 mg RC-Fc 与 1 mL 完全弗氏佐剂（Complete Freund’s Adjuvant - CFA，Sigma，F5881）混匀后皮下注射。第 21 天将抗原 0.25 mg 与 1 mL 非全弗氏佐剂（Incomplete Freund’s Adjuvant - IFA，Sigma，F5506）混匀后皮下注射。第 28 天取血 10 mL 分离出血清。第 42 天将抗原 0.25 mg 与 1 mL IFA，混匀后皮下注射。第 49 天采 50mL 外周血分离淋巴细胞和血清。第 63 天将抗原 0.25 mg 与 1 mL IFA 混匀后皮下注射。第 70 天采 50 mL 外周血分离淋巴细胞和血清。

4. 梯度检测

用包被液（50 mM $NaHCO_3$ PH=9.6）将 RC-Fc 稀释到 2000 ng/ mL，加入 100 μL 到每个 96 孔酶标板的孔中，4℃过夜。用 PBST 将 4℃包被过夜的酶标板洗涤 5 次，拍干，每孔加入 300 μL 封闭液。

用 TBST 将血清做 1：2 系列稀释，首梯度血清为 1：2000，末梯度血清为 1：128000。抗原板经过 300 μL/孔 PBST 洗三次后，每孔加入 100 μL 稀释血清，37 度孵育 1 小时，300 μL/

孔 PBST 洗三次，每孔加入 100 μL 1:2000 的抗 M13 抗体（NB Biolab, 052-101-005），37℃孵育 1 小时，300 μL/孔 PBST 洗六次，加入 1：10000 稀释的抗 Alpaca-HRP（NEB, S001H），37℃30 分钟。将孵育了二抗的酶标板，用 PBST 洗涤 5 次，每孔加入 100 μL TMB 单组分显色液，37℃孵育 7 分钟，每孔加入 100 μL 1M HCL 终止反应，OD450 读数。

5. 构建建噬菌体文库

选择高梯度的外周血，按照淋巴细胞分离液（天津灏洋生物，LTS1077）使用说明分离 PBMC。用 RNAiso Plus（福际生物，RE-03111）试剂提取总 RNA，用 PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit（Takara，9109）转录 5 μg RNA 成 cDNA。将 cDNA 原液稀释 5 倍进行巢式 PCR 扩增，割胶回收 750 碱基对（BP）左右的单域抗体（VHH）片段进行第二轮 PCR 扩增，纯化后的 PCR 扩增产物即为目标 VHH 片段。目标 VHH 片段通过 SfiI 酶切点与载体 pComb3XSS（NEB ，P001）连接，电击之后立即向电击杯中加入 1 mL 2YT（含胰蛋白胨(Solarbio, T8490)，酵母提取物(Solarbio, Y8020）和氯化钠(科隆化工)的培养基，37℃预热）复苏，吸出电击产物并用 2YT 培养基洗净电击杯，共计获得 100 mL 复苏产物，37℃，180 rpm (转/分钟)，复苏 45 分钟，取 100 μL 梯度稀释至 10^{-3} 和 10^{-4} 测定库转化子数目，涂布于 90 mm 的平板上，其余离心，加入 8 mL 2YT 重悬，涂布于 8 块 200 mm 的平板上。第二天在测定库转化子数目的平板上获得带有目标 VHH 片段的细菌克隆。

6. 噬菌体文库包装

将细菌文库接入 2×300 mL 2YT+A (氨苄青霉（Solarbio，A1170）100 μg/ mL) + G (1%葡萄糖 (Solarbio, G8150)培养基中，至其初始 OD600 = 0.1-0.2，37℃、230 rpm 培养至 OD600=0.8 以上。根据 OD600 值加入辅助噬菌体 M13KO7 (NBbiolab, P006) 和 TG1 细菌（NBbiolab, P008)，（辅助噬菌体：细菌 =20:1）。加入 M13KO7 后，混匀，37℃静置 30 分钟，180 转/分钟缓摇 30 分钟，5000 rpm 离心 10 分钟，弃尽上清，用等体积 2YT+A+K (卡那霉素 (Solarbio, K1030) 50 μg/ml)培养基重悬沉淀，30℃，220 rpm 过夜。

将过夜培养物于 4℃, 10000 rpm 离心 20 分钟，收取上清，弃沉淀。更换离心筒，再于 4℃, 10000 rpm，离心 20 分钟，收取上清。

按上清体积的 1/5 加入 PEG8000 (Solarbio, P8260)/NaCl，混匀，冰浴沉淀 2 小时以上。离心 10000 rpm 20 分钟，弃上清，空离一次除尽上清。1mL 1×PBS 悬起沉淀，加入 1/5 体积的 PEG8000/NaCl 二次沉淀 1 小时。

离心 12000 rpm 10 分钟，弃上清，空离一次除尽上清。根据沉淀的量，加入 1×PBS 重悬沉淀，加 100%甘油至终浓度为 50%，混匀后分装到 1.5 mL EP（Eppendorf）管中，-80℃保存。

7. 筛选结合 RC-Fc 的阳性菌落（正筛）

用 PH 值为 9.6 的包被液将 RC-Fc 稀释至终浓度为 5 μg /mL，按 100 μL/孔加入酶标孔中，每个靶分子包被 8 孔（第二轮筛选包被 4 孔，第三轮筛选包被 2 孔），4℃包被过夜。后弃包被液，PBS 洗涤 3 次，每孔加入 300 μL 3% BSA-PBS 封闭液，37℃封闭 1 小时。后 PBS 洗涤

3 次，加入 100 μL 噬菌体文库，37℃孵育 1 小时。吸出未结合的噬菌体，用 PBST 洗涤 6 次，PBS 洗涤 2 次，加入 100 μL Gly-HCl 洗脱液，37℃孵育 8 分钟，洗脱特异性结合的噬菌体；将该洗脱液转移至 1.5 mL 无菌离心管中，迅速用 10 μL Tris-HCl 中和缓冲液中和，取 10 μL 进行梯度稀释，测定滴度，计算淘选回收率。

将洗脱物滴度的平板上，用灭菌牙签随机各挑取 24 个单克隆接种于 1 mL 2×YT-A 中，37℃，220 转/分钟振荡培养 8 小时。取 200 μL 上述培养物，按噬菌体 ：TG1 = 20：1 的比例加入 M13K07 噬菌体，于 37℃静置 15 分钟，后置 220 转/分钟振荡培养 45 分钟。补加 800 μL 体积的 2×YT-AK，30℃，剧烈振荡培养过夜。第二天于 12000 rpm 离心 2 分钟，取上清，用于单克隆 ELISA 鉴定。

8. 筛选结合 Fc 的阳性克隆（反筛）

将 Fc 蛋白（NBbiolab, 20200706）用 PH 值为 9.6 的包被液稀释至终浓度为 2 μg /mL，按 100 μL/孔加入酶标孔中，4℃包被过夜，后弃包被液，PBST 洗涤 3 次，每孔加入 200 μL 5% 脱脂牛奶，37℃封闭 1 小时，后 PBST 洗涤 3 次，每孔加入 50 μL 噬菌体培养菌液上清和 50 μL 5%脱脂牛奶，37℃孵育 1 小时。PBST 洗涤 6 次，加入辣根过氧化物酶标记的抗 M13 抗体（用 PBS 按 1:10000 稀释），100 μL/孔，37℃作用 1 小时。PBST 洗板 6 次。加入 TMB 显色液显色，100 μL/孔，37℃，7 分钟，加入终止液终止反应，50 μL/孔，于 450 nm 下测光密度。

9. 排除结合 Fc 的阳性克隆

将正筛的结果和反筛选的结果综合分析，目的是保留正筛阳性克隆，排除反筛阳性克隆。最后将正筛阳性和反筛阴性的克隆送成都擎科梓熙生物技术有限公司进行测序。

10. 结果序列分析

用 RC-Fc 免疫了 3 个美洲驼，用其中两个动物的外周血淋巴细胞 mRNA 建立噬菌体库，筛选测序后一共获得 567 条 VHH 序列（从动物 NB268 获得 311 条，从动物 NB269 获得 258 条）。经过序列比较确定有 74 条序列(NB268 有 16 条，NB269 有 58 条)是独特的。最后从这 74 条独特的 VHH 序列中选出 12 条菌液 OD450 值比较高，没有明显的热点氨基酸（如多余的胱氨酸，N-连接的糖化点）的 VHH 序列进行克隆、表达和纯化。这 12 条 VHH 的序列如下：

A10-268-5：

核苷酸序列（SEQ ID NO: 5）

caggtgcagctcgtggagtcgggcggaggattggtgcaggctgggggctctctgagactctcctgtgcagtctctggacgcacagtcactaccattaccatgggctgg
ttccgccaggctccagggaaggagcgtgaatttgtagcaagtattagctgggatggtcttagcacaggctatcaagactccgtgaagggccgattcaccatctccagag
acaacgccaagaacacggtgtatctgcaaatgaacagcctgaaacctgaggacacggccgtttattactgtgcagcgggcgacagtttatggtcatggtcgaaggttc
cagctaattatgcctactggggccaggggacccaggtcaccgtctcctca

氨基酸序列（SEQ ID NO: 1）

<----------FR1-IMGT----------><---CDR1--><---------FR2-IMGT---------><--CDR2---><----------
--

QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAVS**GRTVTTIT**MGWFRQAPGKEREFVAS**ISWDGLST**GYQDSVKGRF
TI

-----FR3--IMGT----------><---CDR3---><----------FR4-IMGT---------->

SRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYC**AAGDSLWS**WSKVPANYAYWGQGTQVTVSS

A10-268-18：

核苷酸序列（SEQ ID NO: 10）

caggtgcagctcgtggagtcgggggaggccaggtacaggctgggggctctctgagactctcctgtgcagcctctggacgcataagtagtagctatgacatgggctg
gctccgccaggctccagggaaggagcgtgagtttgtagcacggattacctggagtggtggtagcacatactatgcagactccgtgaagggccgattcaccatctccag
agacagcaccaagaagacggtgtatctgcaaatgaacagcctgaaacctgaggacacggccgtttattactgtgcagcaaaccgagcctttactggtcagtatgactac
tggggccaggggacccaggtcaccgtctcctca

氨基酸序列（SEQ ID NO: 6）

<----------FR1-IMGT----------><--CDR1--><-------FR2-IMGT----------><---CDR2-I--><----------
--

QVQLVESGGGQVQAGGSLRLSCAAS**GRISSSYD**MGWLRQAPGKEREFVAR**ITWSGGST**YYADSVKGRF
TI

----FR3-IMGT----------><-------CDR3--------><---FR4-IMGT-->

SRDSTKKTVYLQMNSLKPEDTAVYYC**AANRAFTGQYDY**WGQGTQVTVSS

A10-268-42：

核苷酸序列（SEQ ID NO: 15）

caggtgcagctcgtggagtctggaggaggattggtgcaggctggggactctctgagactctcctgtgcagcctctggacgcaccttcagtggatatgtcatgggctggt
tccgccaggctccagggaaggagcgtgagtttgtagcagctcttaggtggagtagtagtaacacaaactatgcggcgtccgtgaagggccgattcaccatctccagag
actacgccaaggacacggtgtatctgcaaatgaacagcctcaaacctgacgcacacggccgtttattactgtgcagcgaaacgggatcggccgtacggtagtacgtgg
accccagttgcagctgactatgacacttggggccaggggacccaggtcaccgtctcctca

氨基酸序列（SEQ ID NO: 11）

<----------FR1-IMGT----------><---CDR1---><---------FR2-IMGT---------><--CDR2---><----------
-

QVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAAS**GRTFSGYV**MGWFRQAPGKEREFVAA**LRWSSSNT**NYAASVKGR
F

---------FR3-IMGT----------><----------CDR3----------><---FR4-IMGT--->

TISRDYAKDTVYLQMNSLKPDDTAVYYC**AAKRDRPYGSTWTPVAADYDT**WGQGTQVTVSS

A10-268-76：

核苷酸序列（SEQ ID NO: 20）

caggtgcagctcgtggagtctgggggaggattggtgcctgctgggggctctctgaacctctcctgtgcagcctctggacgcaccttcagtacctatgccatgggctggt
tccgccaggctccagggaaggagcgtgagtttgtcgcgactattaactgggataatggtcgcacatattatgcagactccgtgaagggccgattcaccatctccagaga
caacgcaaagaacatggtgtatctacaaatgaacagcctgaaacctgaggacacggccgtttattactgtgcagcagataagacggccatatttcgtacgagtgttgtgc
cagatgactatgactactggggccaggggacccaggtcaccgtctcctca

氨基酸序列（SEQ ID NO: 16）

<----------FR1-IMGT----------><---CDR1---><---------FR2-IMGT---------><---CDR2---><----------
--

QVQLVESGGGLVPAGGSLNLSCAAS**GRTFSTYA**MGWFRQAPGKEREFVAT**INWDNGRT**YYADSVKGR
FT

----------FR3-IMGT----------><----CDR3----><---FR4-IMGT-->

ISRDNAKNMVYLQMNSLKPEDTAVYYCAADKTAIFRT**SVVPDDYDY**WGQGTQVTVSS

A10-268-103：

核苷酸序列（SEQ ID NO: 25）

caggtgcagctcgtggagtctggaggaggattggtgcaggctgggggctctctgagactctcctgtgtagcgtctggacgcaccttcagtagctatgccatgggctggt
tccgccaggctccagggaaggagcgtgagtttgtgtcaggtattaccgagagtggtgctaccacacgctatgcagactccatgaggggccgattcatcatctccagag
acaacgcccagaacacggtatatctggaaatgaacagcctgaaacctgaggactcggccgtttattactgtgcagcgagtcggttcgggattactgtaccgactgctaa
aggggcctataactactggggccaggggacccaggtcaccgtctcctca

氨基酸序列（SEQ ID NO: 21）

<----------FR1-IMGT----------><---CDR1---><--------FR2-IMGT-------><---CDR2---><----------
-

QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVAS**GRTFSSYA**MGWFRQAPGKEREFVS**GITESGATT**RYADSMRGRFI
I

----------FR3-IMGT----------><----CDR3---><---FR4-IMGT-->

SRDNAQNTVYLEMNSLKPEDSAVYYCAASRFGITVP**TAKGAYNY**WGQGTQVTVSS

A10-268-273：

核苷酸序列（SEQ ID NO: 30）

gaggtgcagctggtggagtccggaggaggattggtgcagccgggggactctctcacactttcctgcgcagcctctggacgcgccaagaatcgctatgtcatgggctg
gttccgccaggctccagggaaggagcgtgagtttgtagcagctcttaggtggagtagtagtaacacaaactatgcggcgtccgtgaagggccgattcaccatctccag
agactacgccaaggacacggtgtatctgcaaatgaacagcctcaaacctgacgacacggccgtttattactgtgcagcgaaacgggatcggccgtacggtagtacgt
ggaccccagttgcagctgactatgacacttggggccaggggacccaggtcaccgtctccgca

氨基酸序列（SEQ ID NO: 26）

<----------FR1-IMGT----------><----CDR1----><--------FR2-IMGT--------><----CDR2---><----------
-

EVQLVESGGGLVQPGDSLTLSCAAS**GRAKNRYV**MGWFRQAPGKEREFVA**ALRWSSSNT**NYAASVKGR
F

----------FR3-IMGT----------><-------CDR3-------><---FR4-IMGT--->

TISRDYAKDTVYLQMNSLKPDDTAVYYCAAKRDRPYGS**TWTPVAADYDT**WGQGTQVTVSA

A10-269-56：

核苷酸序列（SEQ ID NO: 35）

gaggtgcagctggtggagtcgggggggaggcttggtgcaggctgggggtctctgagactctcctgtgcagcctctggaagcaccttcagtggccgttacatgggctg
gttccgtcagggtcaagggaaggagcgtgagtttgtagcagcttcaatgtggagtggtactgcaatatcgtacgcagactccgtgaagggccgattcaccatctccaga
gacaacgccaaggccacgatgtatctgcaaatgagcagcctgaaagatgaggacacggccgtttattactgcgcagcaggaggattgtggaatctcaagctttcagac
gcagggtattatgaatactggggccaggggacccaggtcaccgtctcctca

氨基酸序列（SEQ ID NO: 31）

<----------FR1-IMGT----------><---CDR1--><----------FR2-IMGT--------><---CDR2---><----------
--

EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAS**GSTFSGRY**MGWFRQGQGKEREFVAA**SMWSGTAI**SYADSVKGR
FT

----------FR3-IMGT----------><---CDR3---><---FR4-IMGT-->

ISRDNAKATMYLQMSSLKDEDTAVYYCAAGGLWNLKL**SDAGYYEY**WGQGTQVTVSS

A10-269-62：

核苷酸序列（SEQ ID NO: 40）

gaggtgcagctggtggagtccggtggaggcttggtgcagactgggggtctctgagactctcctgtgcagcctctggaagcctcttcagtagcagtgacatggcctgg
taccgccaggttccagggaagcagcgcgagttggtcgcacgtattaatttttttgggtccacaatttatgcggacgtcgtagagggccgattcaccatctccagacacaa
tgcagagagcacggtgtacctgcaaatgaacagcctgaaagctgaggacactggcgtctattattgtaatatgcggtcacgcattacggaaacggagtactggggcca
ggggacccaggtcaccgtctcctca

氨基酸序列（SEQ ID NO: 36）

<----------FR1-IMGT----------><--CDR1--><----------FR2-IMGT---------><-CDR2-><----------
--

EVQLVESGGGLVQTGGSLRLSCAAS**GSLFSSSD**MAWYRQVPGKQRELVAR**INFFGSTI**YADVVEGRFTIS
R

-----FR3-IMGT----------><------CDR3-----><---FR4-IMGT--->

HNAESTVYLQMNSLKAEDTGVYYC**NMRSRITETEY**WGQGTQVTVSS

A10-269-165：

核苷酸序列（SEQ ID NO: 45）

caggtgcagctcgtggagtcaggtggaggcttggtgcaggctgggggtctctgagactctcctgtgcagcctcaagaacatggttcagtatcggtgccatgggctgg
taccgccaggctccagggaagcagcgcgagttggtcgcaacaattactagtggtagtagcacgacatatgcagacgccgtgaagggccgattcaccgtctccagag
acaacgccgagaacacggtatatctgcaaatgaacagcctgaaacccgaggacacagccgtctattactgctatacaaagtcccgacgtaagccgtgggacctagag
aatgactactggggccaggggacccaggtcaccgtctcctca

氨基酸序列（SEQ ID NO: 41）

<----------FR1-IMGT----------><---CDR1---><---------FR2-IMGT---------><--CDR2--><----------
--

QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAS**RTWFSIGA**MGWYRQAPGKQRELVAT**ITSGSSTT**YADAVKGRFT
V

--------FR3-IMGT----------><----------CDR3---------><---FR4-IMGT--->

SRDNAENTVYLQMNSLKPEDTAVYYC**YTKSRRKPWDLENDY**WGQGTQVTVSS

A10-269-172：

核苷酸序列（SEQ ID NO: 50）

gaggtgcaggtggtggagtcgggaggaggcttggtgcaggctgggggtctctgagactctcctgtgtatcgtctgaaagcagcttcagtatcaacaccatgcgctgg
taccgccaggctccagggaaggagcgggaattggtggcgtctattaatagtgctagtagcacatactatggagacgccgtgaagggccgattcaccatctccagagtt
aacgccaagaacacggtgtatctgcaaatgaacagcctgaaacctgaggacacagccgtctatttctgtaatactcactcagtgttagcgtcaagggattactggggcc
aggggacccaggtcaccgtctcctca

氨基酸序列（SEQ ID NO: 46）

<----------FR1-IMGT----------><--CDR1--><--------FR2-IMGT--------><---CDR2---><----------
-

EVQVVESGGGLVQAGGSLRLSCVSS**ESSFSINT**MRWYRQAPGKERELVAS**INSASSTY**YGDAVKGRFTIS
R

---FR3-IMGT----------><------CDR3------><---FR4-IMGT-->

VNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYFC**NTHSVLASRDY**WGQGTQVTVSS

A10-269-238：

核苷酸序列（SEQ ID NO: 55）

caggtgcagctcgtggagtccggtggaggcttggtgcagcctgggggttctctgagactctcctgtgcagcctctggattcaccttcggaaactatgacatgagctggg
tccgccaggctccaggaaaggggcccgagtgggtctcaggtattgcgcccgcaggtactatcacacgctatgcagactccgtgaaaggccgattcaccatctccaga
gacaacgccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgaaacctgaggacacggccgtgtatcgctgtgcaaaaggggctagctggggccaggggacccag
gtcaccgtgtcctca

氨基酸序列（SEQ ID NO: 51）

<----------FR1-IMGT----------><---CDR1---><----------FR2-IMGT--------><--CDR2--><----------
--

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFTFGNYD**MSWVRQAPGKGPEWVSG**IAPAGTIT**RYADSVKGRF
TI

--------FR3-IMGT----------><CDR3><---FR4-IMGT--->

SRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYRC**AKGAS**WGQGTQVTVSS

A10-269-385：

核苷酸序列（SEQ ID NO: 60）

gaggtgcagctggtggagtccggaggaggcttggtgcaggctgggggtctctgagagtctcctgtcaagcctctgaaatcagtttcagtttccatgccatgggctggt
accgccaggctccagggaagcagcgcgagttggtcgcacgtattactagtattggcaggacaacttatgcagacttcgtgaagggccgattcaccatctccagaggca
acgccaagaacacggtgtatctgcaaatgaacagcctgaaacctgaagacacagccgtctactactgtaatgcagagccagggagggtgaattatgagtactggggc
caggggacccaggtcaccgtctcctca

氨基酸序列（SEQ ID NO: 56）

<----------FR1-IMGT----------><--CDR1--><----------FR2-IMGT---------><-CDR2-><----------

EVQLVESGGGLVQAGGSLRVSCQAS**EISFSFHA**MGWYRQAPGKQRELVAR**ITSIGRT**TYADFVKGRFTIS
R

---------FR3-IMGT----------><------CDR3-------><--FR4-IMGT-->

GNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYC**NAEPGRVNYEY**WGQGTQVTVSS

11. A10-268 and A10-269 的克隆，表达和纯化

A10 是 CGRP 受体靶点代号，NB268 和 NB269 是两个美洲驼的编号。表达和纯化工作由百英生物实施，VHH 序列的 C 端连接上 6 个组氨酸（6xHis）用于纯化。合成的基因片段与 NotI（NEB，R0189L）/XbaI（NEB, R0145L）酶切回收（百英自制）的 pcDNA3.4 载体连接(ThermoFisher Scientific, EL0011)。连接产物转化 Top10 感受态细胞，挑取阳性克隆扩大培养，用百英配制的质粒小提试剂盒(百英自制)小量抽提质粒测序。测序正确的克隆接种于 LB 培养基（百英自制）中扩大培养，用百英配制的试剂盒（百英自制）大量抽提质粒并再次测序验证。采用转染试剂（百英自制），将表达质粒转染 293 细胞后，恒温培养箱（精琪，IS-RDS6C5）培养 5 天后收获细胞培养物，将细胞培养物离心后取上清，过滤除去细胞碎片，收集澄清液。使用 Ni2 亲和层析柱捕获目的蛋白。目的蛋白经过滤，用测定 A280 的方法确定最终产量，使用 NanoDrop One 仪器读取 280 nm 吸光度值。将蛋白吸至透析袋放 1XPBS 的烧杯中透析，纯化产品用 SDS-PAGE 电泳鉴定。表达的 12 个蛋白如表 2 所示。

表 2 表达的 12 个蛋白及相应浓度

#	VHH名称	编号	浓度(mg/ml)
1	A10-268-5	B828601	3.02
2	A10-268-18	B828602	3.02
3	A10-268-42	B828603	3.02
4	A10-268-76	B828604	2.19
5	A10-268-103	B828605	2.40
6	A10-268-273	B828606	2.15
7	A10-269-56	N220505101	2.50
8	A10-269-62	N220505102	2.00
9	A10-269-165	N220505103	0.40
10	A10-269-172	N220505104	1.20
11	A10-269-238	N220505106	1.50
12	A10-269-385	N220505107	0.90

实施例 2：抗 RC-Fc VHH 的验证

1. 抗 RC-Fc VHH 的 ELISA 验证

RC-Fc VHH 结合免疫抗原

用包被液（50 mM NaHCO3 pH=9.6）将免疫抗原 RC-Fc 稀释到 2000 ng/mL，用 100 μL 包被 96-孔酶标板（ThermoFisher Scientific, 449824），于 4℃孵化过夜。用 PBST 将 4℃过夜的酶标板洗涤 5 次，拍干，加入 200 μL 封闭液，37℃封闭 2 小时。去掉 PBST，每孔加入 100 μL 用 PBST 系列稀释好的 VHH 蛋白，于 37℃孵育 1 小时。用 PBST 将孵育了样品的酶标板洗涤 5 次，然后加入 100 μL 用封闭液稀释 1：5000 的对应二抗 Mouse Anti-His-HRP (鼠抗组氨酸-过氧化物酶，南京金斯瑞，A00186)，于 37℃孵育 1 小时。

用 PBST 将孵育了二抗的酶标板洗涤 5 次，每孔加入 100 μL TMB 单组分显色液(Solarbio, 20190402)，于 37℃孵育 7 分钟，每孔加入 100 μL 1M HCL(科隆化工)终止反应，最后用酶标仪 OD450 读数，结果用 GraphPad Prism 9.3.1 软件中的 Nonlinear regression log (agonist) vs. response (three parameters)模型分析，得出的 Binding EC_{50} 值见表 3。

表 3 表达的 12 个蛋白及其对应的 Binding EC_{50} 值

#	VHH名称	编号	Binding EC_{50} (nM)				
			Exp1	Exp2	Exp3	Ave	Stdev
1	A10-268-5	B828601	0.143	0.184	0.08	**0.136**	**0.052**
2	A10-268-18	B828602	0.068	0.314	0.049	**0.144**	**0.148**
3	A10-268-42	B828603	0.025	0.15	0.021	**0.065**	**0.073**
4	A10-268-76	B828604	0.024	0.144	0.028	**0.065**	**0.068**
5	A10-268-103	B828605	0.372	0.114	0.265	**0.250**	**0.130**
6	A10-268-273	B828606	0.046	0.345	0.036	**0.142**	**0.176**
7	A10-269-56	N220505101	不结合	不结合	不结合	**n/a**	**n/a**
8	A10-269-62	N220505102	0.035	0.030	0.028	**0.031**	**0.004**
9	A10-269-165	N220505103	0.097	0.057	0.480	**0.211**	**0.234**
10	A10-269-172	N220505104	0.056	0.051	0.042	**0.050**	**0.007**
11	A10-269-238	N220505106	0.091	0.073	0.081	**0.082**	**0.009**
12	A10-269-385	N220505107	0.052	0.073	0.061	**0.062**	**0.011**

2. 抗 RC-Fc VHH 的细胞验证

2.1 SK-N-MC 细胞株和培养

原代 Neuroblastoma 细胞株 SK-N-MC 来自 ATCC (HTB-10, lot: 70036281)。培养基是 DMEM/F-12 (Gibco, C11330500BT)+10% FBS，简称 SK 细胞培养基。

2.2 SK-N-MC 细胞 cAMP 浓度测试

SK-N-MC 细胞产生的 cAMP 浓度用 Cisbio 的 cAMP-GS Dynamic Kit(Cisbio, 62AM4PEB)试剂盒测试，除特别说明外，操作方法按试剂盒说明进行。测试培养基是 DMEM/F1-12 + 10% FBS + 1 mM IBMX（Solarbio, I10010），测试酶标板用白色 384 孔板。

2.2.1 SK-N-MC 细胞数量的确定和 CGRP 标准曲线的获得

实验当天，用 0.25% Trypsin-EDTA(Gibco, 25200-056)从培养瓶里分离出细胞，用 PBS 洗涤一次，计数，用测试培养基将细胞稀释到适当浓度，用每测试孔 10000、7500、5000、2500 个细胞测试。

在 ProxiPlate-384 Plus 测试板(PerkinElmer, 6008280)的孔中先后加入 5 μL 细胞液和 5 μL 用刺激液（Stimulation Buffer+500 μM IBMX）稀释的 CGRP （南京源肽生物科技有限公司，货号：A03-137，批号：yuanpeptide-997792）。CGRP 最终浓度范围是 0 nM 或 0.001-50 nM。

加入 CGRP 后，置测试板于 37℃温箱中孵育 15 分钟，然后加入 5 μL cAMP-d2 和 5 μL Anti-cAMP-Cryptate 终止反应。测试板置室温 60 分钟后用荧光酶标仪(BMG LabTech, Model: PHERAstar FSX)的 665/620 滤镜读数。得出的数值用 Microsoft Excel 按下面的公式计算比值(Ratio)：

$$\text{Ratio} = \frac{\text{Signal 665 nm}}{\text{Signal 620 nm}} \times 10{,}000$$

算出的比值用 GraphPad Prism 9.3.1 软件中的 Nonlinear regression log (agonist) vs. response (three parameters) 模型分析，结果如图 3 所示，显示每孔细胞数从 2500 到 10000 都可用，因此选用每孔 2500 个细胞用于以后的实验。

3. 评估抗部分抗 CGRP 受体 VHH 抑制细胞 cAMP 的产生的能力

A10-268-5、A10-268-18、A10-268-42、A10-268-76、A10-268-103、A10-268-273 被于细胞功能测试。实验当天，用 0.25% Trypsin-EDTA 从培养瓶里分离出 SK-N-M 细胞，用 PBS 洗涤一次，计数，用测试培养基将细胞稀释到 500 万/mL 的细胞液，30 分钟内用。

在测试板的孔中先后加入 5 μL 细胞液和 5 μL 用刺激液做了 5 倍系列稀释的抗 RC-Fc 单域抗体（最终浓度 0 nM 或 0.0001-100 nM），置 37℃温箱中孵育 30 分钟。

加入 5 μL 用刺激液稀释的 CGRP（最终浓度是 5 nM），置测试板于 37℃温箱中孵育 15 分钟，然后加入 5 μL cAMP-d2 和 5 μL Anti-cAMP-Cryptate 终止反应。测试板置室温 60 分钟后用荧光酶标仪的 665/620 滤镜读数，得出的数值算出 665/620 比值后，用 GraphPad Prism 9.3.1 软件中的 Nonlinear regression log (inhibitor) vs. response (three parameters) 模型分析，结果见表 4。表中的 IC_{50} 值可见有 4 个 VHH 具有抑制 SK-N-MC 细胞产生 cAMP 的能力，活性依次为：A10-268-273 > A10-268-42 > A10-268-103 > A10-268-18。选出 A10-268-42 作为先导 VHH 进入下一步评估。

表 4 6 个用于细胞功能测试的 VHH 及其对应的 IC_{50} 值

#	VHH名称	编号	IC_{50} (nM)
1	A10-268-5	B828601	> 10,000
2	A10-268-18	B828602	492
3	A10-268-42	B828603	39.67
4	A10-268-76	B828604	> 10,000
5	A10-268-103	B828605	279
6	A10-268-273	B828606	23.55

4. A10-268-42 的人源化、克隆、表达和纯化

用 IMGT 排序法划分 A10-268-42 (42wt) 的 4 个 framework 区和 3 个 CDR 区。用 AlphaFold2 来预测 42wt 的 3D 结构，用自主开发的方法获得这个结构的基数。然后通过 IGBLAST 应用（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/）将 42wt 的序列和 100 个人的 IGHV3 序列对比，找出 A10-268-42 的 4 个 Framework 中的 14 个非人氨基酸。将这 14 个氨基酸分成 13 组 (42hv1 到 42hv13)，每一组中有 1-10 个氨基酸变成人氨基酸。这 13 个带有不同程度人源化氨基酸组合的 VHH 都经过 AlphaFold2 预测结构，这些 3D 结构和 42wt 结构对比，选择相似程度最近的 3 个组合（42hv10、42hv11、42hv12），加上 42wt 本身，将上述 4 个 VHH 和第 297 位氨基酸由 N 突变为 A 的 Fc 融合表达，最后通过细胞 cAMP 实验比较这个 4 个蛋白的功能。

42wt、42hv10、42hv11、42hv12 的 C 端分别和 Fc 的 N 端连接成融合蛋白（42wtFc、42hv10Fc、42hv11Fc、42hv12Fc），基因合成，表达纯化委托百英生物实施，方法同上，蛋白电泳图见图 4。

42hv10、42hv11、42hv12 的序列如下所示：

42hv10（SEQ ID NO: 61）：

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GRTFSGYV**MGWFRQAPGKGLEFVAA**LRWSSSNT**NYAASVKGRFTISRDYAK DTVYLQMNSLRAEDTAVYYC**AAKRDRPYGSTWTPVAADYDT**WGQGTLVTVSS

42hv11（SEQ ID NO: 62）：

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GRTFSGYV**MGWFRQAPGKGLEFVAA**LRWSSSNT**NYADSVKGRFTISRDYAK DTVYLQMNSLRAEDTAVYYC**AAKRDRPYGSTWTPVAADYDT**WGQGTLVTVSS

42hv12（SEQ ID NO: 63）：

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GRTFSGYV**MGWFRQAPGKGLEFVAA**LRWSSSNT**NYADSVKGRFTISRDNAK DTVYLQMNSLRAEDTAVYYC**AAKRDRPYGSTWTPVAADYDT**WGQGTLVTVSS

第 297 位氨基酸由 N 突变为 A 的 Fc 片段（SEQ ID NO: 68）

EPKSADKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

5. A10-268-42 人源化后（42hv10Fc）的细胞 cAMP 抑制能力的验证

实验当天，用 0.25% Trypsin-EDTA 从培养瓶里分离出 Neuroblastoma，用 PBS 洗涤一次，计数，用测试培养基将细胞稀释到 500 万/mL 的细胞液，30 分钟内用。

在 ProxiPlate-384 Plus 测试板的孔中先后加入 5 μL 细胞液和 5 μL 用刺激液稀释做 5 倍系列稀释的的 42wtFc、42hv10Fc、42hv11Fc、42hv12Fc 蛋白和对照抗体 Erenumab (百英生物，A03EB)，浓度范围从 0.0003 到 100 nM，置于 37℃孵育 30 分钟。

加入 5 μL 用刺激液稀释的 CGRP（最终浓度是 5 nM），置测试板于 37℃温箱中孵育 15 分钟，然后加入 5 μL cAMP-d2 和 5 μL Anti-cAMP-Cryptate 终止反应。测试板置室温 60 分钟后用荧光酶标仪的 665/620 滤镜读数，得出的数值算出 665/620 比值后，用 GraphPad Prism 9.3.1 软件中的 Nonlinear regression log (inhibitor) vs. response (three parameters) 模型分析，结果见图 5。从图 5 可以看出，42hv10、42hv11、42hv12 三个组合的人源化都获得了成功，抑制细胞 cAMP 产生的能力都优于对照抗体 Erenumab。基于以上结果，选出 IC_{50} 比原型好一倍的 42hv10 进行下一步开发。

实施例 3：合成垂体腺苷酸环化酶 1 的胞外域（PAC1 ECD）

1. PAC1 ECD、PAC1s ECD-Fc 融合蛋白的基因合成、克隆、表达和纯化

PAC1 的全名是 Pituitary Adenylate Cyclase 1，中文名是垂体腺苷酸环化酶 1，编码基因是 ADCYAP1R1。PAC1 是一个膜蛋白，属于 B 类 G 蛋白偶联受体（Class B GPCR），在动物体内广泛表达，但主要分布在内分泌器官和神经系统。PAC1 和其配体垂体腺苷酸环化酶激活多肽（PACAP，也称 PACAP38）构成一个信号系统，在调节生长、组织修复、情绪、代谢、神经保护等方面起到重要作用。

ADCYAP1R1 共有 18 个外显子（Exon），其中的 10 个（exons 2, 3, 7-13, 18）是固定表达的，其它的通过选择性剪接（Alternative splicing）表达而形成多个同源异构体，后统一称为异构体（Isoforms）。PAC1 的胞外区（ECD）氨基端（N 端）由第 2-6 个外显子编码，7 个穿膜区（包括胞外和胞内部分）由第 7-17 外显子编码，羧基端（C 端）的非翻译部分由第 18 个外显子编码。

在人体内 PAC1 的 N 端胞外区（ECD）包括三种异构体：PAC1，PAC1s 和 PAC1vs（图 6）。如果全部第 2-6 个外显子都表达是 PAC1，如果第 5、6 个外显子被剪掉是 PAC1s，如果第 4、5、6 个外显子被剪掉则是 PAC1vs。

PAC1 的配体包括 PACAP(PACAP38)、PACAP27 和 VIP(Vasoactive Intestinal Polypeptide)（图 7）。PAC1 和 PACAP 的亲和力在单数纳摩尔（nM）范围内，但对 VIP 的亲和力差了 100-1000 倍。PAC1s 虽然少了第 5、6 个外显子，却保留和其配体 PACAP 的亲和力，而和 VIP 的亲和力有所增加。PAC1vs 和配体 PACAP38 和 PACAP27 的亲和力大大降低，但保留

了和 VIP 的亲和力。

PACAP 夹子（PACAP Trap）是由 PAC1 ECD 改造而来。PAC1 ECD 是离开细胞膜的可溶性 PAC1 胞外区，本发明发现其在体外也保留了结合 PACAP 的能力。而且没有外显子 5 和 6 的 PAC1 ECD，即 PAC1s ECD 具有更强的结合 PACAP 的能力，因此 PAC1s ECD 被用来构建 PACAP Trap。

PAC1 ECD 来自 Genbank ID NM_001199635.2 核酸序列 506-907（SEQ ID NO: 65），氨基酸序列 24-155（SEQ ID NO: 64）。

核酸序列为：

cattctgactgcatcttcaagaaggagcaagccatgtgcctggagaagatccagagggccaatgagctgatgggcttcaatgattcctctccaggctgtcctgggatg
tgggacaacatcacgtgttggaagcccgcccatgtgggtgagatggtcctggtcagctgccctgagctcttccgaatcttcaacccagaccaagtctgggagaccga
aaccattggagagtctgattttggtgacagtaactccttagatctctcagacatgggagtggtgagccggaactgcacggaggatggctggtcggaacccttccctcat
tactttgatgcctgtgggtttgatgaatatgaatctgagactggggaccaggattattactacctgtcagtgaaggcc

氨基酸序列为：

MHSDCIFKKEQAMCLEKIQRANELMGFNDSSPGCPGMWDNITCWKPAHVGEMVLVSCPELFRIFNPDQ
VWETETIGESDFGDSNSLDLSDMGVVSRNCTEDGWSEPFPHYFDACGFDEYESETGDQDYYYLSVKA

PAC1s ECD 克隆用的核酸序列来自 Genbank ID NM_001199637.2 506-844（SEQ ID NO: 67）为：

Atgcattctgactgcatcttcaagaaggagcaagccatgtgcctggagaagatccagagggccaatgagctgatgggcttcaatgattcctctccaggctgtcctgg
gatgtgggacaacatcacgtgttggaagcccgcccatgtgggtgagatggtcctggtcagctgccctgagctcttccgaatcttcaacccagaccaagcagacatgg
gagtggtgagccggaactgcacggaggatggctggtcggaacccttccctcattactttgatgcctgtgggtttgatgaatatgaatctgagactggggaccaggatta
ttactacctgtcagtgaaggccct

PAC1s ECD 的氨基酸序列为（或者加上：来自 UniProt ID P41586-3 21-124）（SEQ ID NO: 66）为：

MHSDCIFKKEQAMCLEKIQRANELMGFNDSSPGCPGMWDNITCWKPAHVGEMVLVSCPELFRIFNPDQ
DMGVVSRNCTEDGWSEPFPHYFDACGFDEYESETGDQDYYYLSVKA

PAC1 ECD, PAC1s ECD 的 C 端和 Fc 的 N 端融合表达成为 PAC1 ECD-Fc, PACs1 ECD-Fc。基因合成和表达委托百英生物实施，方法同上，SDS-PAGE 电泳鉴定见图 8。

2. PAC1 ECD-Fc、PAC1s ECD-Fc 结合 PACAP 能力的 ELISA 评估

链酶亲和素（Streptavidin）包被的 96 孔酶标板（ThermoFisher Scientific™，15126）经过 PBST (0.1% Tween 20，pH=7.4) 清洗 3 次后每孔加入 1000 ng 的 Biotin-PACAP，室温孵育 2 小时。去掉 PBST，每孔加入 100 μL 用 PBST 系列稀释好的 PAC1 ECD-Fc，PAC1s ECD-Fc 或者阴性对照 RC-Fc 融合蛋白，于 37℃孵育 1 小时。用 PBST 将孵育了样品的酶标板洗涤 5 次，然后加入 100 μL 用封闭液稀释 1：5000 的对应二抗 Anti-human IgG-HRP (抗人免疫球蛋白 G-辣根过氧化物酶，杭州华安生物，HR1214)，于 37℃孵育 1 小时。

用 PBST 将孵育了二抗的酶标板洗涤 5 次，每孔加入 100 μL TMB(Trimethylolpropane)单组分显色液(Solarbio, 20190402)，于 37℃孵育 7 分钟，每孔加入 100 μL 1M HCL (科隆化工) 终止反应，最后用酶标仪 OD450 读数，结果用 Nonlinear regression log (agonist) vs. response (three parameters) 模型分析，结果见图 9。图中可见 PAC1s ECD-Fc 结合 PACAP 的能力是 PAC1 ECD-Fc 的 40 倍，CGRP 受体的胞外区 RC-Fc 则没有结合能力。

实施例 4：42hv10FcNA-PAC1s ECD（BY003）双功能融合蛋白的构建

1. BY003 的克隆、表达和纯化

BY003 包括 3 个分子的融合：42hv10, FcNA (Fc 的第 297 位氨基酸由 N 突变为 A)和 PAC1s ECD。42hv10 的 C 端和 FcNA 的 N 端连接，FcNA 的 C 端通过连接子 GGGGS（SEQ ID NO: 79）和 PAC1s ECD 连接。PAC1s ECD 可以是一个，二个或三个。在多个 PAC1s ECD 的情形下，PAC1s ECD 之间通过 GGGGS 连接。两个 PAC1s ECD 构成的 BY003 结构如图 10 所示，BY003 的工作原理如图 11 所示。

委托百英生物进行基因合成，方法同上，SDS-PAGE 电泳鉴定见图 12。

2. BY003 中抗 42hv10 的细胞功能验证（抑制 CGPR 诱导的 CHO-CGRPrC3 细胞产生 cAMP）

在本实施例中，细胞功能的验证指标是 BY003 抑制 cAMP 产生的能力。

2.1 表达 CGRP 受体的细胞株的建立和培养

稳定表达人源 Ramp1 ECD 和 CLR ECD 的 CHO（简称 CHO-hCGRPr 或 CHO-A10 细胞）细胞池来自于泰州百英生物科技有限公司，货号是 CHOK1-C21738001。培养基是 DMEM/F-12+10% FBS + 1x 青链霉素混合液(Solarbio, P1400) + 10 μg/mL 嘌呤霉素(Solarbio, P8230) + 50 ug/ml 潮霉素 B (Solarbio, H8080)，简称 CHO-hCGRPr 培养基。

将 CHO-hCGRPr 细胞池用 CHO-hCGRPr 培养基稀释到 5 个细胞/mL，然后移 100 μL 稀释后的细胞液到两块 96 孔细胞培养板（Thermo Scientific, 167008）的孔中，于 CO2 培养箱中培养到能分清单个细胞群落。将 6 个群落从 96 孔板移到一块 6 孔细胞培养板 (Corning, 3516) 中。细胞长到 90%满孔后再移到 T-75（Corning, 430541U）细胞培养瓶中。细胞长满后即可用于功能测试和液氮冻存。

细胞 cAMP 浓度用 Cisbio 的 cAMP -GS Dynamic Kit（Cisbio, 62AM4PEB) 试剂盒测试，除特别说明外，操作方法按试剂盒说明进行。测试培养基是 DMEM/F1-12 + 10% FBS + 1 mM IBMX)，测试酶标板用白色 384 孔板。

2.2 单克隆稳定细胞株 CGRP 标准曲线的获得

从上面 6 个单细胞克隆中选出克隆 1、2 和 3 来评估它们产生 cAMP 的能力，同时加入未转染 CGRP 受体的 CHOK1 母细胞株（ECACC, 85051005）作为对照。实验当天，用 0.25% Trypsin-EDTA (Gibco, 25200-056)从培养瓶里分离出细胞，用 PBS 洗涤一次，计数，用测试培养基将细胞稀释到 500 万/mL 的细胞液，30 分钟内使用。

在 ProxiPlate-384 Plus 测试板的孔中先后加入 5 μL 细胞液和 5 μL 用刺激液（Stimulation Buffer+500 uM IBMX）稀释的 CGRP（南京源肽生物科技有限公司，A03-137，批号：yuanpeptide-997792)。CGRP 最终浓度范围是 0 nM 或 0.000001-100 nM，10 倍系列稀释。

加入 CGRP 后，置测试板于 37℃温箱中孵育 15 分钟，然后加入 5 μL cAMP-d2 和 5 μL

Anti-cAMP-Cryptate 终止反应。测试板置室温 60 分钟后用荧光酶标仪 (BMG LabTech, Model: PHERAstar FSX) 的 665/620 滤镜读数。得出的数值用 Microsoft Excel 算出 665/620 比值，最后用 GraphPad Prism 9.3.1 软件中的 Nonlinear regression log (agonist) vs. response (three parameters) 模型分析，结果见图 13。基于该结果，选择 3 号细胞株用于以后的实验，此株就被称为 CHO-CGRPrC3。

2.3 评估 BY003 抑制 CGPR 诱导的 CHO-CGRPrC3 细胞产生 cAMP 的能力

实验当天，用 0.25% Trypsin-EDTA 从培养瓶里分离出 CHO-hCGRPrC3 细胞，用 PBS 洗涤一次，计数，用测试培养基将细胞稀释到 500 万/mL 的细胞液，30 分钟内用。

在 ProxiPlate-384 Plus 测试板的孔中先后加入 5 μL 细胞液和 5 μL 用刺激液稀释做 5 倍系列稀释的的 BY003 和对照抗体 Erenumab (百英生物, A03EB), 浓度范围从 0.0003 到 100 nM，置于 37℃孵育 30 分钟。

加入 5 μL 用刺激液稀释的 CGRP（最终浓度是 1.4 nM），置测试板于 37℃温箱中孵育 15 分钟，然后加入 5 μL cAMP-d2 和 5 μL Anti-cAMP-Cryptate 终止反应。测试板置室温 60 分钟后用荧光酶标仪的 665/620 滤镜读数，得出的数值算出 665/620 比值后，用 GraphPad Prism 9.3.1 软件中的 Nonlinear regression log (inhibitor) vs. response (three parameters) 模型分析，结果见图 14。图中可见 BY003 抑制 CHO-hCGRPrC3 细胞产生 cAMP 的能力比 Erenumab 强 2.5 倍。

3. BY003 中抗42hv10的细胞功能验证(抑制PACAP诱导的CHO-hPAC1细胞产生cAMP)

3.1 表达人源 PAC1 稳定细胞株的建立和培养

稳定表达人源 PAC1 ECD 和 PAC1s ECD CHO（简称 CHO-A05 和 CHO-A05s 细胞）的细胞池来自于泰州百英生物科技有限公司，货号是 CHOK1-A05 和 CHOK1-A05s)。培养基是 DMEM/F-12+10% FBS + 1x 青链霉素混合液 (Solarbio, P1400) + 10 μg/mL 嘌呤霉素 (Solarbio, P8230)，简称 CHO-PAC1 培养基。

将 CHO-A05 和 CHO-A05s 细胞池用 CHO-PAC1 培养基稀释到 5 个细胞/mL, 然后移 100 μL 稀释后的细胞液到两块 96 孔细胞培养板（Thermo Scientific, 167008）的孔中，于 CO_2 培养箱中培养到能分清单个群落。将 6 个群落从 96 孔板移到一块 6 孔细胞培养板(Corning, 3516)中。细胞长到 90%满孔后再移到 T-75（Corning, 430541U）细胞培养瓶中。细胞长满后即可用于测试和液氮冻存。

3.2 单克隆 CHO-A05 细胞株 cAMP 标准曲线的获得

实验当天，用 0.25% Trypsin-EDTA 从培养瓶里分离出 6 个单克隆 CHO-A05 细胞和未转染 PAC1 的 CHOK1 母细胞株（ECACC, 85051005），用 PBS 洗涤一次，计数，用测试培养基将细胞稀释到 500 万/mL 的细胞液，30 分钟内用。

在 ProxiPlate-384 Plus 测试板的孔中先后加入 5 μL 细胞液和 5 μL 用刺激液（Stimulation Buffer+IBMX）稀释的 PACAP（南京源肽生物科技有限公司，A05-138，批号：

Yuanpeptide-194972)。PACAP 的最终浓度范围是 0.0001 到 100 nM。

加入 PACAP 后，置测试板于 37℃温箱中孵育 15 分钟，然后加入 5 μL cAMP-d2 和 5 μL Anti-cAMP-Cryptate 终止反应。测试板置于室温 60 分钟后用荧光酶标仪(BMG LabTech, Model: PHERAstar FSX)的 665/620 滤镜读数。得出的数值用 Microsoft Excel 算出 665/620 比值，最后用 GraphPad Prism 9.3.1 软件中的 Nonlinear regression log (agonist) vs. response (three parameters)分析，结果见图 15。基于该结果，选择 4 号细胞株用于以后的实验，此细胞株被称为 CHO-hPAC1C4。

3.3 评估抗 BY003 抑制 CHO-hPAC1C4 细胞产生 cAMP 的能力

细胞 cAMP 浓度用 Cisbio 的 cAMP Kit 试剂盒测试，除特别说明外，操作方法按试剂盒说明进行。测试培养基是 DMEM/F1-12 + 10% FBS + 1 mM IBMX)，测试酶标板用白色 384 孔板。

由于 BY003 是双功能蛋白，既作用于 CGRP 受体，又作用于 PACAP，所以在实验测试板中加入 CHO-hCGRPrC3 和 CHO-hPAC1C4 细胞。实验前一天，用 0.25% Trypsin-EDTA 从培养瓶里分离出以上两种细胞，用 PBS 洗涤一次，计数，用测试培养基将细胞稀释到 400 万/mL 的细胞液，两种细胞液混合后，转移 10 μL 混合液到 384-孔细胞培养板(Corning, 3765)，置 37℃CO_2 培养箱过夜。

实验当天，去掉培养基，在测试板的孔中加入 5 μL 用刺激液进行了系列稀释的 BY003 单域抗体（最终浓度是 0 nM 或 0.1-1000 nM)，置 37℃温箱中孵育 30 分钟。

加入 5 μL 用刺激液稀释的 PACAP（最终浓度是 0.7 nM)，加入 PACAP 后，置测试板于 37℃温箱中孵育 15 分钟，然后加入 5 μL cAMP-d2 和 5 μL Anti-cAMP-Cryptate 终止反应。测试板置于室温 60 分钟后用荧光酶标仪(BMG LabTech, Model: PHERAstar FSX)的 665/620 滤镜读数。得出的数值用 Microsoft Excel 算出 665/620 比值，最后用 GraphPad Prism 9.3.1 软件中的 Nonlinear regression log (inhibitor) vs. response (three parameters)分析，结果见图 16

针对目前偏痛治疗和预防领域未被满足的临床需求，本发明提供了一种同时阻断 CGRP 通路和 PACAP 通路的融合蛋白。通过使用抗 CGRP 受体的单域 VHH 和天然的 PAC1 可溶性 EDC 融合的方法，同时阻断 CGRP 和 PACAP 两条与偏头痛密切相关的信号通路。本发明成功地构建了 BY003 分子，并证明 BY003 能在细胞水平阻断 CGRP 和 PACAP 诱导的 cAMP 的产生。

权 利 要 求 书

1. 一种阻断降钙素基因相关肽（CGRP）通路的单域抗体，其中，所述单域抗体包含如氨基酸序列 SEQ ID NO: 2、7、12、17、22、27、32、37、42、47、52 或 57 所示的 CDR1 或其任何变体，如氨基酸序列 SEQ ID NO: 3、8、13、18、23、28、33、38、43、48、53 或 58 所示的 CDR2 或其任何变体和如氨基酸序列 SEQ ID NO: 4、9、14、19、24、29、34、39、44、49、54 或 59 所示的 CDR3 或其任何变体；

优选地，所述单域抗体包含如氨基酸序列 SEQ ID NO: 12 所示的 CDR1 或其任何变体，如氨基酸序列 SEQ ID NO: 13 所示的 CDR2 或其任何变体和如氨基酸序列 SEQ ID NO: 14 所示的 CDR3 或其任何变体。

2. 如权利要求 1 所述的单域抗体，其中，所述单域抗体包含如氨基酸序列 SEQ ID NO: 1、6、11、16、21、26、31、36、41、46、51、56、61、62 或 63 所示的可变区或其任何变体；

优选地，所述单域抗体包含如氨基酸序列 SEQ ID NO: 61、62 或 63 所示的可变区或其任何变体；

更优选地，所述单域抗体包含如氨基酸序列 SEQ ID NO: 61 所示的可变区或其任何变体；

优选地，在所述单域抗体中的氨基酸具有保守取代，保守取代氨基酸的数量不超过 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个、9 个或 10 个。

3. 一种融合蛋白，所述融合蛋白同时阻断降钙素基因相关肽（CGRP）通路和垂体腺苷酸环化酶激活肽（PACAP）通路，其中，所述融合蛋白包含至少一个单域抗体、至少一个 Fc 片段和至少一个垂体腺苷酸环化酶 1 的胞外域片段（PAC1 ECD）。

4. 如权利要求 3 所述的融合蛋白，其中，所述融合蛋白包含一条肽链，所述肽链的结构为一个 PAC1 ECD 通过连接子与一个 Fc 片段的 C 端相连，所述 Fc 片段的 N 端与一个单域抗体的 C 端融合；

可选地，所述融合蛋白包含两条肽链，所述肽链的结构为一个 PAC1 ECD 通过连接子与一个 Fc 片段的 C 端相连，所述 Fc 片段的 N 端与一个单域抗体的 C 端融合，所述两条肽链的两个 PAC1 ECD 之间通过连接子连接；

可选地，所述融合蛋白包含三条肽链，所述肽链的结构为一个 PAC1 ECD 通过连接子与一个 Fc 片段的 C 端相连，所述 Fc 片段的 N 端与一个单域抗体的 C 端融合，所述三条肽链的三个 PAC1 ECD 之间通过连接子连接。

5. 如权利要求 3 或 4 所述的融合蛋白，其中，所述单域抗体为结合 CGRP 受体的单域抗体；

优选地，所述单域抗体包含如氨基酸序列 SEQ ID NO: 2、7、12、17、22、27、32、37、42、47、52 或 57 所示的 CDR1 或其任何变体，如氨基酸序列 SEQ ID NO: 3、8、13、18、23、28、33、38、43、48、53 或 58 所示的 CDR2 或其任何变体和如氨基酸序列 SEQ ID NO: 4、9、14、19、24、29、34、39、44、49、54 或 59 所示的 CDR3 或其任何变体；

更优选地，所述单域抗体包含如氨基酸序列 SEQ ID NO: 12 所示的 CDR1 或其任何变体，如氨基酸序列 SEQ ID NO: 13 所示的 CDR2 或其任何变体和如氨基酸序列 SEQ ID NO: 14 所示的 CDR3 或其任何变体；

优选地，在一个或多个或全部三个所述 CDR 中的氨基酸具有保守取代，保守取代氨基

酸的数量不超过 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个、9 个或 10 个。

6. 如权利要求 3-5 任一项所述的融合蛋白，其中，所述单域抗体包含如氨基酸序列 SEQ ID NO: 1、6、11、16、21、26、31、36、41、46、51、56、61、62 或 63 所示的可变区或其任何变体；

优选地，所述单域抗体包含如氨基酸序列 SEQ ID NO: 61、62 或 63 所示的可变区或其任何变体；

更优选地，所述单域抗体包含如氨基酸序列 SEQ ID NO: 61 所示的可变区或其任何变体；

优选地，在所述单域抗体中的氨基酸具有保守取代，保守取代氨基酸的数量不超过 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个、9 个或 10 个。

7. 如权利要求 3-6 任一项所述的融合蛋白，其中，所述 PAC1 ECD 选自 PAC 异构体：PAC1、PAC1s 或 PAC1vs 的 ECD；

优选地，所述 PAC1 ECD 为 PAC1s ECD；

优选地，所述 PAC1 ECD 包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 64 及与其具有 80%或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列；

优选地，所述 PAC1s ECD 包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 66 及与其具有 80%或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列。

8. 如权利要求 3-7 任一项所述的融合蛋白，其中，所述 Fc 片段包含来源于人免疫球蛋白的铰链区，恒定区 2（CH2）和恒定区 3（CH3）结构域；

优选地，所述 Fc 片段选自人 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4；更优选地，所述 Fc 片段选为人 IgG1；

优选地，所述 Fc 片段具有氨基酸取代；更优选地，所述氨基酸取代包括所述 Fc 片段上第 297 位的天冬酰胺 N 被丙氨酸 A 取代，其中，Fc 片段上各氨基酸位点采用 EU 抗体编号系统编号；

更优选地，所述 Fc 片段包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 68 及与其具有 80%或以上同一性的氨基酸序列，优选具有 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性的氨基酸序列，更优选具有 98%或 99%以上同一性的氨基酸序列。

9. 如权利要求 3-8 任一项所述的融合蛋白，其中，所述连接子为柔性多肽连接子；

优选地，所述柔性多肽连接子选自 GGGGS（SEQ ID NO: 79）、GGGGSGGGGS（SEQ ID NO: 80）、SGGGGSGGGG（SEQ ID NO: 81）、GGGGGSGGGGSSGGGGS（SEQ ID NO: 82）、GGGGSGGGGSGGGGS（SEQ ID NO: 83）、GGGGSGGGGSGGGG（SEQ ID NO: 84）、GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS（SEQ ID NO: 85）、GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS（SEQ ID NO: 86）、GSGSGSGS（SEQ ID NO: 87）、GGSGSGSG（SEQ ID NO: 88）、GGSGSG（SEQ ID NO: 89）、GGSG（SEQ ID NO: 90）；

更优选地，所述柔性多肽连接子为 GGGGS（SEQ ID NO: 79）。

10. 编码权利要求 1 或 2 所述的单域抗体、权利要求 3-9 任一项所述的融合蛋白的核酸。

11. 包含权利要求 10 所述核酸的载体。

12. 包含权利要求 10 所述核酸或权利要求 11 所述载体的细胞。

13. 一种药物组合物或试剂盒，其包含权利要求 1 或 2 所述的单域抗体和/或权利要求 3-9 任一项所述的融合蛋白以及药物上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

14. 权利要求 1 或 2 所述的单域抗体、权利要求 3-9 任一项所述的融合蛋白、权利要求 10 所述的核酸、权利要求 11 所述的载体和/或权利要求 12 所述的细胞和/或权利要求 13 所述的药物组合物或试剂盒在制备用于治疗与 CGRP 和 PACAP 通路激活有关的疾病中的用途；

优选地，所述疾病为偏头痛。