



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118725134 A

(43) 申请公布日 2024. 10. 01

(21) 申请号 202410740803.4	C12N 1/21 (2006.01)
(22) 申请日 2016.11.08	C12N 5/10 (2006.01)
(30) 优先权数据	C12N 15/70 (2006.01)
62/252,549 2015.11.08 US	C12N 15/85 (2006.01)
(62) 分案原申请数据	C12N 5/20 (2006.01)
201680077834.X 2016.11.08	C12N 15/13 (2006.01)
(71) 申请人 豪夫迈·罗氏有限公司	A61K 39/395 (2006.01)
地址 瑞士	A61P 15/08 (2006.01)
(72) 发明人 D·R·邓希 J·宏格	A61P 3/00 (2006.01)
H·S·基姆 J·索诺达	A61P 3/04 (2006.01)
C·斯皮斯 A·G·伊	A61P 1/16 (2006.01)
(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所	A61P 3/06 (2006.01)
11247	A61P 9/12 (2006.01)
专利代理师 张莉 黄草生	A61P 3/10 (2006.01)
(51) Int.Cl.	A61P 25/28 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)	A61P 25/16 (2006.01)
C40B 40/10 (2006.01)	A61P 39/00 (2006.01)
C40B 40/08 (2006.01)	A61P 25/00 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)	C12R 1/19 (2006.01)
	权利要求书14页 说明书62页
	序列表(电子公布) 附图35页

(54) 发明名称
筛选多特异性抗体的方法

(57) 摘要
本发明公开的主题涉及多特异性抗体,例如双特异性抗体和双表位抗体,以及用于筛选所述抗体的方法,和可以用于筛选所述双特异性抗体和双表位抗体的新型抗体结构。本发明公开还提供双特异性抗KLB抗体和使用这些抗体治疗疾病的方法。

1. 一种分离的多特异性抗体,其包括第一抗原结合多肽,其中所述第一抗原结合多肽包括从N-末端至C-末端方向以以下顺序放置的VL结构域、接头、VH结构域、CH1结构域、CH2结构域和CH3结构域:VL-接头-VH-CH1-CH2-CH3。

2. 权利要求1的多特异性抗体,其中所述多特异性抗体不包括CL结构域。

3. 权利要求1的多特异性抗体,进一步包括CL结构域。

4. 权利要求3的多特异性抗体,其中CL结构域通过一个或多个二硫键连接第一抗原结合多肽。

5. 权利要求4的多特异性抗体,其中二硫键将CL结构域与第一抗原结合多肽的CH1结构域连接。

6. 权利要求1-5任一项的多特异性抗体,进一步包括第二抗原结合多肽,其中第二抗原结合多肽包括从N-末端至C-末端方向以以下顺序放置的VL结构域、接头、VH结构域、CH1结构域、CH2结构域和CH3结构域:VL-接头-VH-CH1-CH2-CH3。

7. 权利要求6的多特异性抗体,其中第二抗原结合多肽不包括CL结构域。

8. 权利要求6的多特异性抗体,其中多特异性抗体包括两个CL结构域。

9. 权利要求8的多特异性抗体,其中两个CL结构域是相同的。

10. 权利要求8或9的多特异性抗体,其中两个CL结构域中的一个通过一个或多个二硫键连接第一抗原结合多肽,而两个CL结构域中的另一个通过一个或多个二硫键连接第二抗原结合多肽。

11. 权利要求10的多特异性抗体,其中二硫键将CL结构域与第一抗原结合多肽和第二抗原结合多肽的CH1结构域连接。

12. 权利要求6-11任一项的多特异性抗体,其中第一和第二抗原结合多肽结合同一抗原上的两个不同表位。

13. 权利要求6-11任一项的多特异性抗体,其中第一和第二抗原结合多肽结合两个不同抗原。

14. 权利要求1-13任一项的多特异性抗体,其中接头包括一个或多个甘氨酸(G)和丝氨酸(S)残基。

15. 权利要求1-14任一项的多特异性抗体,其中接头具有约1至约50个氨基酸长。

16. 权利要求1-15任一项的多特异性抗体,其中接头为约20个氨基酸长。

17. 权利要求1-16任一项的多特异性抗体,其中接头包括G₄S重复。

18. 权利要求1-17任一项的多特异性抗体,其中接头包括SEQ ID NO:68的氨基酸序列。

19. 权利要求1-16任一项的多特异性抗体,其中接头是可断裂的。

20. 权利要求6-19任一项的多特异性抗体,其中第一抗原结合多肽的CH3结构域和第二抗原结合多肽的CH3结构域在界面相遇,其中所述界面被改变以促进多特异性抗体的形成。

21. 权利要求20的多特异性抗体,其中:

(a) 第一抗原结合多肽的CH3结构域的一个或多个氨基酸残基被一个或多个具有较大侧链体积的氨基酸残基替代,以在第一抗原结合多肽的CH3结构域的表面上产生与第二抗原结合多肽的CH3结构域相互作用的突起;和

(b) 第二抗原结合多肽的CH3结构域的一个或多个氨基酸残基被一个或多个具有较小侧链体积的氨基酸残基替代,以在第二抗原结合多肽的CH3结构域的表面上产生与第一抗

原结合多肽的CH3结构域相互作用的空穴。

22. 权利要求21的多特异性抗体,其中具有较大侧链体积的氨基酸残基选自精氨酸(R)、苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)和色氨酸(w)。

23. 权利要求21的多特异性抗体,其中具有较小侧链体积的氨基酸残基选自丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)和缬氨酸(V)。

24. 权利要求1-23任一项的多特异性抗体,其中抗体是IgG、IgA或IgE同种型。

25. 权利要求1-24任一项的多特异性抗体,其中抗体是IgG同种型。

26. 权利要求25的多特异性抗体,其中抗体是IgG₁、IgG₂或IgG₄同种型。

27. 权利要求1-26任一项的多特异性抗体,其中多特异性抗体是激动剂多特异性抗体或拮抗剂多特异性抗体。

28. 权利要求1-27任一项的多特异性抗体,其中多特异性抗体是双特异性抗体。

29. 权利要求28的多特异性抗体,其中双特异性抗体是激动剂双表位抗体。

30. 一种分离的双表位激动剂抗体,其包括第一抗原结合多肽和第二抗原结合多肽,其中第一和第二抗原结合多肽各自包括从N-末端至C-末端方向以以下顺序放置的VL结构域、接头、VH结构域、CH1结构域、CH2结构域和CH3结构域:VL-接头-VH-CH1-CH2-CH3。

31. 权利要求30的双表位激动剂抗体,其中第一和第二抗原结合多肽结合同一抗原上的两个不同表位。

32. 权利要求30或31的双表位激动剂抗体,其中双表位抗体不包括CL结构域。

33. 权利要求30或31的双表位激动剂抗体,进一步包括两个CL结构域。

34. 权利要求33的双表位激动剂抗体,其中两个CL结构域是相同的。

35. 权利要求33或34的双表位激动剂抗体,其中两个CL结构域中的一个通过一个或多个二硫键连接第一抗原结合多肽,而两个CL结构域中的另一个通过一个或多个二硫键连接第二抗原结合多肽。

36. 权利要求35的双表位激动剂抗体,其中二硫键将CL结构域与第一抗原结合多肽和第二抗原结合多肽的CH1结构域连接。

37. 权利要求30-36任一项的双表位激动剂抗体,其中接头包括一个或多个甘氨酸(G)和丝氨酸(s)残基。

38. 权利要求30-37任一项的双表位激动剂抗体,其中接头具有约1至约50个氨基酸长。

39. 权利要求30-38任一项的双表位激动剂抗体,其中接头为约20个氨基酸长。

40. 权利要求30-39任一项的双表位激动剂抗体,其中接头包括G₄S重复。

41. 权利要求30-40任一项的双表位激动剂抗体,其中接头包括SEQ ID NO:68的氨基酸序列。

42. 权利要求30-39任一项的双表位激动剂抗体,其中接头是可断裂的。

43. 权利要求30-42任一项的双表位激动剂抗体,其中第一抗原结合多肽的CH3结构域和第二抗原结合多肽的CH3结构域在界面相遇,其中所述界面被改变以促进多特异性抗体的形成。

44. 权利要求30-43任一项的双表位激动剂抗体,其中:

(a) 第一抗原结合多肽的CH3结构域的一个或多个氨基酸残基被一个或多个具有较大侧链体积的氨基酸残基替代,以在第一抗原结合多肽的CH3结构域的表面上产生与第二抗

原结合多肽的CH3结构域相互作用的突起;和

(b) 第二抗原结合多肽的CH3结构域的一个或多个氨基酸残基被一个或多个具有较小侧链体积的氨基酸残基替代,以在第二抗原结合多肽的CH3结构域的表面上产生与第一抗原结合多肽的CH3结构域相互作用的空穴。

45. 权利要求44的双表位激动剂抗体,其中具有较大侧链体积的氨基酸残基选自精氨酸(R)、苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)和色氨酸(W)。

46. 权利要求44的双表位激动剂抗体,其中具有较小侧链体积的氨基酸残基选自丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)和缬氨酸(v)。

47. 权利要求30-46任一项的双表位激动剂抗体,其中抗体是IgG、IgA或IgE同种型。

48. 权利要求30-47任一项的双表位激动剂抗体,其中抗体是IgG同种型。

49. 权利要求30-48任一项的双表位激动剂抗体,,其中抗体是IgG₁、IgG₂或IgG₄同种型。

50. 一种分离的核酸,其包括编码权利要求1-29任一项的多特异性抗体或权利要求30-49任一项的双表位激动剂抗体的序列。

51. 一种载体,其包括权利要求50的核酸。

52. 一种宿主细胞,其表达权利要求1-29任一项的多特异性抗体或权利要求30-49任一项的双表位激动剂抗体。

53. 一种宿主细胞,其包括权利要求50的核酸或权利要求51的载体。

54. 权利要求53的宿主细胞,进一步包括编码CL结构域的核酸。

55. 一种生产多特异性抗体的方法,包括在足以产生多特异性抗体的条件下培养权利要求52、53或54的宿主细胞。

56. 一种生产双表位激动剂抗体的方法,包括在足以产生多特异性抗体或双表位激动剂抗体的条件下,培养权利要求52、53或54的宿主细胞。

57. 权利要求55的方法,进一步包括从培养物回收多特异性抗体或双表位激动剂抗体。

58. 权利要求56的方法,进一步包括从培养物回收多特异性抗体或双表位激动剂抗体。

59. 通过权利要求56或57的方法产生的双表位激动剂抗体。

60. 一种药物组合物,其包括权利要求1-29或58任一项的多特异性抗体或权利要求30-49或59任一项的双表位激动剂抗体和药物学上可接受的载体。

61. 权利要求60的组合物,进一步包括第二治疗剂。

62. 一种药盒,其包括权利要求1-29任一项的多特异性抗体或权利要求30-49任一项的双表位激动剂抗体。

63. 一种文库,其包括多个权利要求1-29任一项的多特异性抗体。

64. 一种文库,其包括多个编码多个权利要求1-29任一项的多特异性抗体的多核苷酸。

65. 一种筛选多特异性抗体的方法,其包括:

(a) 自权利要求63或64的文库获得多个多特异性抗体;

(b) 分析该多个多特异性抗体与第一和第二抗原或同一抗原上的第一和第二表位的结合;和

(c) 鉴定结合第一和第二抗原或同一抗原的第一和第二表位的多特异性抗体。

66. 一种鉴定多特异性抗体的方法,其包括:

(a) 在细胞中表达权利要求1-29任一项的多特异性抗体;

(b) 将步骤(a)的多特异性抗体接触第一抗原和第二抗原或同一抗原的第一表位和第二表位;和

(c) 鉴定结合第一抗原和第二抗原或同一抗原的第一表位和第二表位的多特异性抗体。

67. 一种筛选双表位激动剂抗体的方法,其包括:

(a) 自权利要求63或64的文库获得多个多特异性抗体;

(b) 分析该多个多特异性抗体与同一抗原的第一和第二表位的结合;和

(c) 从该多个多特性抗体中鉴定结合同一抗原的第一和第二表位的一个或多个双表位激动剂抗体;和

(d) 从该一个或多个双表位激动剂抗体中鉴定呈现激动剂活性的双表位抗体,以获得双表位激动剂抗体。

68. 一种筛选双表位激动剂抗体的方法,包括

(a) 在细胞中表达权利要求1-29任一项的多特异性抗体;

(b) 将步骤(a)的多特异性抗体接触同一抗原的第一表位和第二表位;

(c) 鉴定结合同一抗原的第一表位和第二表位的多特异性抗体,以获得双表位抗体;和

(d) 测定双表位抗体是否呈现激动剂活性,以获得双表位激动剂抗体。

69. 权利要求67或68的方法,进一步包括将双表位激动剂抗体的激动活性与衍生该双表位激动剂抗体的单特异性抗体进行比较。

70. 权利要求66或68-69任一项的方法,其中表达多特异性抗体包括将一个或多个编码多特异性抗体的核酸引入细胞中。

71. 权利要求66或68-70任一项的方法,其中在步骤(b)中使多特异性抗体同时接触第一和第二抗原或同一抗原的第一和第二表位。

72. 权利要求66或68-71任一项的方法,其中在将多特异性抗体接触第一和第二抗原或同一抗原的第一和第二表位前,纯化步骤(b)的多特异性抗体。

73. 权利要求72的方法,其中通过蛋白A色谱纯化多特异性抗体。

74. 权利要求65-73任一项的方法,其中抗原在生物复合物中。

75. 权利要求66或68-74任一项的方法,其中细胞是原核细胞。

76. 权利要求75的方法,其中原核细胞是大肠杆菌细胞。

77. 权利要求66或68-74任一项的方法,其中细胞是真核细胞。

78. 权利要求77的方法,其中真核细胞是酵母细胞或哺乳动物细胞。

79. 权利要求78的方法,其中哺乳动物细胞是中国仓鼠卵巢细胞。

80. 权利要求65-79任一项的方法,其中通过ELISA分析多特异性抗体与第一和/或第二抗原或第一和/或第二表位的结合。

81. 一种使用权利要求65-80任一项的方法鉴定和/或产生的分离的双表位激动剂抗体。

82. 一种分离的双特异性抗体或其抗原结合部分,其结合KLB的两个表位。

83. 一种分离的双特异性抗体或其抗原结合部分,包括重链可变区和轻链可变区,其中重链可变区选自SEQ ID NO:34、36、38、40和42,并且轻链可变区选自SEQ ID NO:33、35、37、39和41。

84. 一种分离的双特异性抗KLB抗体或其抗原结合部分,包括:

(a) 重链可变区CDR1结构域,其包括选自SEQ ID NO:3-7的氨基酸序列,及其保守性置换;

(b) 重链可变区CDR2结构域,其包括选自SEQ ID NO:8-12的氨基酸序列,及其保守性置换;

(c) 重链可变区CDR3结构域,其包括选自SEQ ID NO:13-17的氨基酸序列,及其保守性置换;

(d) 轻链可变区CDR1结构域,其包括选自SEQ ID NO:18-22的氨基酸序列,及其保守性置换;

(e) 轻链可变区CDR2结构域,其包括选自SEQ ID NO:23-27的氨基酸序列,及其保守性置换;和

(f) 轻链可变区CDR3结构域,其包括选自SEQ ID NO:28-32的氨基酸序列,及其保守性置换。

85. 一种分离的双特异性抗KLB抗体或其抗原结合部分,包括重链可变区和轻链可变区,其中重链可变区和轻链可变区选自:

(a) 包含具有与SEQ ID NO:34中所列序列至少95%相同的序列的氨基酸的重链可变区、和包含具有与SEQ ID NO:33中所列序列至少95%相同的序列的氨基酸的轻链可变区;

(b) 包含具有与SEQ ID NO:36中所列序列至少95%相同的序列的氨基酸的重链可变区、和包含具有与SEQ ID NO:35中所列序列至少95%相同的序列的氨基酸的轻链可变区;

(c) 包含具有与SEQ ID NO:38中所列序列至少95%相同的序列的氨基酸的重链可变区、和包含具有与SEQ ID NO:37中所列序列至少95%相同的序列的氨基酸的轻链可变区;

(d) 包含具有与SEQ ID NO:40中所列序列至少95%相同的序列的氨基酸的重链可变区、和包含具有与SEQ ID NO:39中所列序列至少95%相同的序列的氨基酸的轻链可变区;和

(e) 包含具有与SEQ ID NO:42中所列序列至少95%相同的序列的氨基酸的重链可变区、和包含具有与SEQ ID NO:41中所列序列至少95%相同的序列的氨基酸的轻链可变区。

86. 一种分离的双特异性抗KLB抗体或其抗原结合部分,包括重链可变区和轻链可变区,其中重链可变区和轻链可变区选自:

(a) 包含具有SEQ ID NO:34中所列序列的氨基酸的重链可变区和包含具有SEQ ID NO:33中所列序列的氨基酸的轻链可变区;

(b) 包含具有SEQ ID NO:36中所列序列的氨基酸的重链可变区和包含具有SEQ ID NO:35中所列序列的氨基酸的轻链可变区;

(c) 包含具有SEQ ID NO:38中所列序列的氨基酸的重链可变区和包含具有SEQ ID NO:37中所列序列的氨基酸的轻链可变区;

(d) 包含具有SEQ ID NO:40中所列序列的氨基酸的重链可变区和包含具有SEQ ID NO:39中所列序列的氨基酸的轻链可变区;和

(e) 包含具有SEQ ID NO:42中所列序列的氨基酸的重链可变区和包含具有SEQ ID NO:41中所列序列的氨基酸的轻链可变区。

87. 一种分离的双特异性抗KLB抗体或其抗原结合部分,包括包含CDR1、CDR2和CDR3结

构域的重链可变区;和包含CDR1、CDR2和CDR3结构域的轻链可变区。

88.权利要求87的双特异性抗体,其中重链可变区CDR1结构域包括选自SEQ ID NO:3-7的氨基酸序列。

89.权利要求87或权利要求88的双特异性抗体,其中重链可变区CDR2结构域包括选自SEQ ID NO:8-12的氨基酸序列。

90.权利要求87—89任一项的双特异性抗体,其中重链可变区CDR3结构域包括选自SEQ ID NO:13-17的氨基酸序列。

91.权利要求87—90任一项的双特异性抗体,其中轻链可变区CDR1结构域包括选自SEQ ID NO:18-22的氨基酸序列。

92.权利要求87-91任一项的双特异性抗体,其中轻链可变区CDR2结构域包括选自SEQ ID NO:23-27的氨基酸序列。

93.权利要求87-92任一项的双特异性抗体,其中轻链可变区CDR3结构域包括选自SEQ ID NO:28-32的氨基酸序列。

94.一种分离的双特异性抗KLB抗体或其抗原结合部分,包括包含CDR1、CDR2和CDR3结构域的重链可变区;和包含CDR1、CDR2和CDR3结构域的轻链可变区,其中重链可变区和轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3结构域选自:

(a) 包含具有SEQ ID NO:3中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR1;包含具有SEQ ID NO:8中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR2;包含具有SEQ ID NO:13中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR3;包含具有SEQ ID NO:18中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR1;包含具有SEQ ID NO:23中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR2;和包含具有SEQ ID NO:28中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR3;

(b) 包含具有SEQ ID NO:4中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR1;包含具有SEQ ID NO:9中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR2;包含具有SEQ ID NO:14中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR3;包含具有SEQ ID NO:19中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR1;包含具有SEQ ID NO:24中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR2;和包含具有SEQ ID NO:29中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR3;

(c) 包含具有SEQ ID NO:5中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR1;包含具有SEQ ID NO:10中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR2;包含具有SEQ ID NO:15中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR3;包含具有SEQ ID NO:20中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR1;包含具有SEQ ID NO:25中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR2;和包含具有SEQ ID NO:30中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR3;

(d) 包含具有SEQ ID NO:6中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR1;包含具有SEQ ID NO:11中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR2;包含具有SEQ ID NO:16中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR3;包含具有SEQ ID NO:21中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR1;包含具有SEQ ID NO:26中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR2;和包含具有SEQ ID NO:31中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR3;

(e) 包含具有SEQ ID NO:7中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR1;包含具有SEQ ID NO:12中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR2;包含具有SEQ ID NO:17中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR3;包含具有SEQ ID NO:22中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR1;包

含具有SEQ ID NO:27中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR2;和包含具有SEQ ID NO:32中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR3。

95.一种分离的双特异性抗KLB抗体或其抗原结合部分,包括重链可变区和轻链可变区,其中重链可变区包含具有与SEQ ID NO:34中所列序列至少95%相同的序列的氨基酸,及其保守性置换;并且轻链可变区包含具有与SEQ ID NO:33中所列序列至少95%相同的序列的氨基酸,及其保守性置换。

96.一种分离的双特异性抗KLB抗体或其抗原结合部分,包括重链可变区和轻链可变区,其中重链可变区包含具有与SEQ ID NO:36中所列序列至少95%相同的序列的氨基酸,及其保守性置换;并且轻链可变区包含具有与SEQ ID NO:35中所列序列至少95%相同的序列的氨基酸,及其保守性置换。

97.一种分离的双特异性抗KLB抗体或其抗原结合部分,包括重链可变区和轻链可变区,其中重链可变区包含具有与SEQ ID NO:38中所列序列至少95%相同的序列的氨基酸,及其保守性置换;并且轻链可变区包含具有与SEQ ID NO:37中所列序列至少95%相同的序列的氨基酸,及其保守性置换。

98.一种分离的双特异性抗KLB抗体或其抗原结合部分,包括重链可变区和轻链可变区,其中重链可变区包含具有与SEQ ID NO:40中所列序列至少95%相同的序列的氨基酸,及其保守性置换;并且轻链可变区包含具有与SEQ ID NO:39中所列序列至少95%相同的序列的氨基酸,及其保守性置换。

99.一种分离的双特异性抗KLB抗体或其抗原结合部分,包括重链可变区和轻链可变区,其中重链可变区包含具有与SEQ ID NO:42中所列序列至少95%相同的序列的氨基酸,及其保守性置换;并且轻链可变区包含具有与SEQ ID NO:41中所列序列至少95%相同的序列的氨基酸,及其保守性置换。

100.一种分离的双特异性抗KLB抗体或其抗原结合部分,包括:包含具有SEQ ID NO:3中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR1;包含具有SEQ ID NO:8中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR2;包含具有SEQ ID NO:13中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR3;包含具有SEQ ID NO:18中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR1;包含具有SEQ ID NO:23中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR2;和包含具有SEQ ID NO:28中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR3。

101.一种分离的双特异性抗KLB抗体或其抗原结合部分,包括:包含具有SEQ ID NO:4中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR1;包含具有SEQ ID NO:9中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR2;包含具有SEQ ID NO:14中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR3;包含具有SEQ ID NO:19中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR1;包含具有SEQ ID NO:24中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR2;和包含具有SEQ ID NO:29中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR3。

102.一种分离的双特异性抗KLB抗体或其抗原结合部分,包括:包含具有SEQ ID NO:5中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR1;包含具有SEQ ID NO:10中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR2;包含具有SEQ ID NO:15中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR3;包含具有SEQ ID NO:20中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR1;包含具有SEQ ID NO:25中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR2;和包含具有SEQ ID NO:30中所列序列的氨基酸的轻链可变区

CDR3。

103. 一种分离的双特异性抗KLB抗体或其抗原结合部分, 包括: 包含具有SEQ ID NO:6中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR1; 包含具有SEQ ID NO:11中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR2; 包含具有SEQ ID NO:16中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR3; 包含具有SEQ ID NO:21中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR1; 包含具有SEQ ID NO:26中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR2; 和包含具有SEQ ID NO:31中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR3。

104. 一种分离的双特异性抗KLB抗体或其抗原结合部分, 包括: 包含具有SEQ ID NO:7中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR1; 包含具有SEQ ID NO:12中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR2; 包含具有SEQ ID NO:17中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR3; 包含具有SEQ ID NO:22中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR1; 包含具有SEQ ID NO:27中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR2; 和包含具有SEQ ID NO:32中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR3。

105. 一种分离的双特异性抗KLB抗体, 其包括:

(a) 第一抗体或其抗原结合部分, 包括重链可变区和轻链可变区, 其中重链可变区选自SEQ ID NO:34、36、38、40和42, 及其保守性置换; 并且轻链可变区选自SEQ ID NO:33、35、37、39和41, 及其保守性置换; 和

(b) 第二抗体或其抗原结合部分, 包括重链可变区和轻链可变区, 其中重链可变区选自SEQ ID NO:34、36、38、40和42, 及其保守性置换; 并且轻链可变区选自SEQ ID NO:33、35、37、39和41, 及其保守性置换;

其中第一抗体或其抗原结合部分, 和第二抗体或其抗原结合部分, 结合KLB上存在的不同表位。

106. 一种分离的双特异性抗KLB抗体, 其包括:

(a) 第一抗体或其抗原结合部分, 包括重链可变区和轻链可变区, 其中重链可变区包含具有与SEQ ID NO:34中所列序列至少95%相同的序列的氨基酸, 并且轻链可变区包含具有与SEQ ID NO:33中所列序列至少95%相同的序列的氨基酸; 和

(b) 第二抗体或其抗原结合部分, 包括重链可变区和轻链可变区, 其中重链可变区包含具有与SEQ ID NO:36中所列序列至少95%相同的序列的氨基酸, 并且轻链可变区包含具有与SEQ ID NO:35中所列序列至少95%相同的序列的氨基酸。

107. 一种分离的双特异性抗KLB抗体, 其包括:

(a) 第一抗体或其抗原结合部分, 包括重链可变区和轻链可变区, 其中重链可变区包含具有与SEQ ID NO:34中所列序列至少95%相同的序列的氨基酸, 并且轻链可变区包含具有与SEQ ID NO:33中所列序列至少95%相同的序列的氨基酸; 和

(b) 第二抗体或其抗原结合部分, 包括重链可变区和轻链可变区, 其中重链可变区包含具有与SEQ ID NO:38中所列序列至少95%相同的序列的氨基酸, 并且轻链可变区包含具有与SEQ ID NO:37中所列序列至少95%相同的序列的氨基酸。

108. 一种分离的双特异性抗KLB抗体, 其包括:

(a) 第一抗体或其抗原结合部分, 包括重链可变区和轻链可变区, 其中重链可变区包含具有与SEQ ID NO:34中所列序列至少95%相同的序列的氨基酸, 并且轻链可变区包含具有

与SEQ ID NO:33中所列序列至少95%相同的序列的氨基酸;和

(b) 第二抗体或其抗原结合部分,包括重链可变区和轻链可变区,其中重链可变区包含具有与SEQ ID NO:40中所列序列至少95%相同的序列的氨基酸,并且轻链可变区包含具有与SEQ ID NO:39中所列序列至少95%相同的序列的氨基酸。

109. 一种分离的双特异性抗KLB抗体,其包括:

(a) 第一抗体或其抗原结合部分,包括重链可变区和轻链可变区,其中重链可变区包含具有与SEQ ID NO:34中所列序列至少95%相同的序列的氨基酸,并且轻链可变区包含具有与SEQ ID NO:33中所列序列至少95%相同的序列的氨基酸;和

(b) 第二抗体或其抗原结合部分,包括重链可变区和轻链可变区,其中重链可变区包含具有与SEQ ID NO:42中所列序列至少95%相同的序列的氨基酸,并且轻链可变区包含具有与SEQ ID NO:41中所列序列至少95%相同的序列的氨基酸。

110. 一种分离的双特异性抗KLB抗体,其包括:

(a) 第一抗体或其抗原结合部分,包括重链可变区和轻链可变区,其中重链可变区包含具有与SEQ ID NO:38中所列序列至少95%相同的序列的氨基酸,并且轻链可变区包含具有与SEQ ID NO:37中所列序列至少95%相同的序列的氨基酸;和

(b) 第二抗体或其抗原结合部分,包括重链可变区和轻链可变区,其中重链可变区包含具有与SEQ ID NO:36中所列序列至少95%相同的序列的氨基酸,并且轻链可变区包含具有与SEQ ID NO:35中所列序列至少95%相同的序列的氨基酸。

111. 一种分离的双特异性抗KLB抗体,其包括:

(a) 第一抗体或其抗原结合部分,包括重链可变区和轻链可变区,其中重链可变区包含具有与SEQ ID NO:42中所列序列至少95%相同的序列的氨基酸,并且轻链可变区包含具有与SEQ ID NO:41中所列序列至少95%相同的序列的氨基酸;和

(b) 第二抗体或其抗原结合部分,包括重链可变区和轻链可变区,其中重链可变区包含具有与SEQ ID NO:36中所列序列至少95%相同的序列的氨基酸,并且轻链可变区包含具有与SEQ ID N4:35中所列序列至少95%相同的序列的氨基酸。

112. 一种分离的双特异性抗KLB抗体,其包括:

(a) 第一抗体或其抗原结合部分,包括重链可变区和轻链可变区,其中重链可变区包含具有与SEQ ID NO:40中所列序列至少95%相同的序列的氨基酸,并且轻链可变区包含具有与SEQ ID NO:39中所列序列至少95%相同的序列的氨基酸;和

(b) 第二抗体或其抗原结合部分,包括重链可变区和轻链可变区,其中重链可变区包含具有与SEQ ID NO:38中所列序列至少95%相同的序列的氨基酸,并且轻链可变区包含具有与SEQ ID NO:37中所列序列至少85%相同的序列的氨基酸。

113. 一种分离的双特异性抗KLB抗体,其包括:

(a) 第一抗体或其抗原结合部分,包括重链可变区和轻链可变区,其中重链可变区包含具有与SEQ ID NO:42中所列序列至少85%相同的序列的氨基酸,并且轻链可变区包含具有与SEQ ID NO:41中所列序列至少85%相同的序列的氨基酸;和

(b) 第二抗体或其抗原结合部分,包括重链可变区和轻链可变区,其中重链可变区包含具有与SEQ ID NO:38中所列序列至少85%相同的序列的氨基酸,并且轻链可变区包含具有与SEQ ID NO:37中所列序列至少95%相同的序列的氨基酸。

114. 一种分离的双特异性抗KLB抗体,其包括:

(a) 第一抗体或其抗原结合部分,包括重链可变区和轻链可变区,其中重链可变区包含具有与SEQ ID NO:36中所列序列至少85%相同的序列的氨基酸,并且轻链可变区包含具有与SEQ ID NO:35中所列序列至少85%相同的序列的氨基酸;和

(b) 第二抗体或其抗原结合部分,包括重链可变区和轻链可变区,其中重链可变区包含具有与SEQ ID NO:40中所列序列至少85%相同的序列的氨基酸,并且轻链可变区包含具有与SEQ ID NO:39中所列序列至少85%相同的序列的氨基酸。

115. 一种分离的双特异性抗KLB抗体,其包括:

(a) 第一抗体或其抗原结合部分,包括重链可变区和轻链可变区,其中重链可变区包含具有与SEQ ID NO:40中所列序列至少85%相同的序列的氨基酸,并且轻链可变区包含具有与SEQ ID NO:39中所列序列至少85%相同的序列的氨基酸;和

(b) 第二抗体或其抗原结合部分,包括重链可变区和轻链可变区,其中重链可变区包含具有与SEQ ID NO:42中所列序列至少85%相同的序列的氨基酸,并且轻链可变区包含具有与SEQ ID NO:41中所列序列至少85%相同的序列的氨基酸。

116. 一种分离的双特异性抗KLB抗体,其包括:

(a) 第一抗体或其抗原结合部分,包括:包含具有SEQ ID NO:3中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR1;包含具有SEQ ID NO:8中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR2;包含具有SEQ ID NO:13中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR3;包含具有SEQ ID NO:18中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR1;包含具有SEQ ID NO:23中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR2;和包含具有SEQ ID NO:28中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR3;和

(b) 第二抗体或其抗原结合部分,包括:包含具有SEQ ID NO:4中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR1;包含具有SEQ ID NO:9中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR2;包含具有SEQ ID NO:14中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR3;包含具有SEQ ID NO:19中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR1;包含具有SEQ ID NO:24中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR2;和包含具有SEQ ID NO:29中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR3。

117. 一种分离的双特异性抗KLB抗体,其包括:

(a) 第一抗体或其抗原结合部分,包括:包含具有SEQ ID NO:3中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR1;包含具有SEQ ID NO:8中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR2;包含具有SEQ ID NO:13中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR3;包含具有SEQ ID NO:18中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR1;包含具有SEQ ID NO:23中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR2;和包含具有SEQ ID NO:28中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR3;和

(b) 第二抗体或其抗原结合部分,包括:包含具有SEQ ID NO:5中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR1;包含具有SEQ ID NO:10中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR2;包含具有SEQ ID NO:15中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR3;包含具有SEQ ID NO:20中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR1;包含具有SEQ ID NO:25中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR2;和包含具有SEQ ID NO:30中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR3。

118. 一种分离的双特异性抗KLB抗体,其包括:

(a) 第一抗体或其抗原结合部分,包括:包含具有SEQ ID NO:3中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR1;包含具有SEQ ID NO:8中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR2;包含具有

SEQ ID NO:13中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR3;包含具有SEQ ID NO:18中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR1;包含具有SEQ ID NO:23中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR2;和包含具有SEQ ID NO:28中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR3;和

(b) 第二抗体或其抗原结合部分,包括:包含具有SEQ ID NO:6中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR1;包含具有SEQ ID NO:11中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR2;包含具有SEQ ID NO:16中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR3;包含具有SEQ ID NO:21中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR1;包含具有SEQ ID NO:26中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR2;和包含具有SEQ ID NO:31中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR3。

119. 一种分离的双特异性抗KLB抗体,其包括:

(a) 第一抗体或其抗原结合部分,包括:包含具有SEQ ID NO:3中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR1;包含具有SEQ ID NO:8中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR2;包含具有SEQ ID NO:13中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR3;包含具有SEQ ID NO:18中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR1;包含具有SEQ ID NO:23中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR2;和包含具有SEQ ID NO:28中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR3;和

(b) 第二抗体或其抗原结合部分,包括:包含具有SEQ ID NO:7中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR1;包含具有SEQ ID NO:12中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR2;包含具有SEQ ID NO:17中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR3;包含具有SEQ ID NO:22中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR1;包含具有SEQ ID NO:27中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR2;和包含具有SEQ ID NO:32中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR3。

120. 一种分离的双特异性抗KLB抗体,其包括:

(a) 第一抗体或其抗原结合部分,包括:包含具有SEQ ID NO:5中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR1;包含具有SEQ ID NO:10中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR2;包含具有SEQ ID NO:15中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR3;包含具有SEQ ID NO:20中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR1;包含具有SEQ ID NO:25中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR2;和包含具有SEQ ID NO:30中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR3;和

(b) 第二抗体或其抗原结合部分,包括:包含具有SEQ ID NO:4中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR1;包含具有SEQ ID NO:9中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR2;包含具有SEQ ID NO:14中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR3;包含具有SEQ ID NO:19中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR1;包含具有SEQ ID NO:24中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR2;和包含具有SEQ ID NO:29中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR3。

121. 一种分离的双特异性抗KLB抗体,其包括:

(a) 第一抗体或其抗原结合部分,包括:包含具有SEQ ID NO:6中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR1;包含具有SEQ ID NO:11中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR2;包含具有SEQ ID NO:16中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR3;包含具有SEQ ID NO:21中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR1;包含具有SEQ ID NO:26中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR2;和包含具有SEQ ID NO:31中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR3;和

(b) 第二抗体或其抗原结合部分,包括:包含具有SEQ ID NO:4中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR1;包含具有SEQ ID NO:9中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR2;包含具有SEQ ID NO:14中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR3;包含具有SEQ ID NO:19中所列序列

的氨基酸的轻链可变区CDR1;包含具有SEQ ID NO:24中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR2;和包含具有SEQ ID NO:29中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR3。

122. 一种分离的双特异性抗KLB抗体,其包括:

(a) 第一抗体或其抗原结合部分,包括:包含具有SEQ ID NO:7中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR1;包含具有SEQ ID NO:12中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR2;包含具有SEQ ID NO:17中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR3;包含具有SEQ ID NO:22中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR1;包含具有SEQ ID NO:27中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR2;和包含具有SEQ ID NO:32中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR3;和

(b) 第二抗体或其抗原结合部分,包括:包含具有SEQ ID NO:4中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR1;包含具有SEQ ID NO:9中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR2;包含具有SEQ ID NO:14中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR3;包含具有SEQ ID NO:19中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR1;包含具有SEQ ID NO:24中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR2;和包含具有SEQ ID NO:29中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR3。

123. 一种分离的双特异性抗KLB抗体,其包括:

(a) 第一抗体或其抗原结合部分,包括:包含具有SEQ ID NO:5中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR1;包含具有SEQ ID NO:10中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR2;包含具有SEQ ID NO:15中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR3;包含具有SEQ ID NO:20中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR1;包含具有SEQ ID NO:25中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR2;和包含具有SEQ ID NO:30中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR3;和

(b) 第二抗体或其抗原结合部分,包括:包含具有SEQ ID NO:6中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR1;包含具有SEQ ID NO:11中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR2;包含具有SEQ ID NO:16中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR3;包含具有SEQ ID NO:21中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR1;包含具有SEQ ID NO:26中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR2;和包含具有SEQ ID NO:31中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR3。

124. 一种分离的双特异性抗KLB抗体,其包括:

(a) 第一抗体或其抗原结合部分,包括:包含具有SEQ ID NO:5中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR1;包含具有SEQ ID NO:10中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR2;包含具有SEQ ID NO:15中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR3;包含具有SEQ ID NO:20中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR1;包含具有SEQ ID NO:25中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR2;和包含具有SEQ ID NO:30中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR3;和

(b) 第二抗体或其抗原结合部分,包括:包含具有SEQ ID NO:7中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR1;包含具有SEQ ID NO:12中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR2;包含具有SEQ ID NO:17中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR3;包含具有SEQ ID NO:22中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR1;包含具有SEQ ID NO:27中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR2;和包含具有SEQ ID NO:32中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR3。

125. 一种分离的双特异性抗KLB抗体,其包括:

(a) 第一抗体或其抗原结合部分,包括:包含具有SEQ ID NO:7中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR1;包含具有SEQ ID NO:12中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR2;包含具有SEQ ID NO:17中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR3;包含具有SEQ ID NO:22中所列序

列的氨基酸的轻链可变区CDR1;包含具有SEQ ID NO:27中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR2;和包含具有SEQ ID NO:32中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR3;和

(b) 第二抗体或其抗原结合部分,包括:包含具有SEQ ID NO:6中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR1;包含具有SEQ ID NO:11中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR2;包含具有SEQ ID NO:16中所列序列的氨基酸的重链可变区CDR3;包含具有SEQ ID NO:21中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR1;包含具有SEQ ID NO:26中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR2;和包含具有SEQ ID NO:31中所列序列的氨基酸的轻链可变区CDR3。

126. 一种分离的双特异性抗体,其包括:

(a) 包括重链可变区和轻链可变区的第一多肽,其中重链可变区选自SEQ ID NO:34、36、38、40和42,及其保守性置换,并且轻链可变区选自SEQ ID NO:33、35、37、39和41,及其保守性置换;和

(b) 包括重链可变区和轻链可变区的第二多肽,其中重链可变区选自SEQ ID NO:34、36、38、40和42,及其保守性置换,并且轻链可变区选自SEQ ID NO:33、35、37、39和41,及其保守性置换;

其中第一和第二多肽各自结合KLB上存在的不同表位。

127. 一种分离的双特异性抗体或其抗原结合部分,其结合KLB上存在的两个表位,其中所述两个表位位于KLB的KL2结构域内。

128. 一种分离的双特异性抗体或其抗原结合部分,其结合KLB上存在的两个表位,其中所述KLB的两个表位位于KLB的KL1结构域内。

129. 一种分离的双特异性抗体或其抗原结合部分,其结合KLB上存在的两个表位,其中所述KLB的两个表位中的一个位于KLB的KL2结构域内。

130. 权利要求129的分离的双特异性抗体,其中所述KLB上存在的两个表位中的第二个位于KLB的KL2结构域内。

131. 一种分离的双特异性抗体或其抗原结合部分,其结合KLB上存在的表位,所述表位包含SEQ ID NO:43中所列氨基酸序列。

132. 一种分离的双特异性抗体或其抗原结合部分,其结合KLB上存在的表位,所述表位包含SEQ ID NO:44中所列氨基酸序列。

133. 一种分离的双特异性抗体或其抗原结合部分,其结合KLB上存在的表位,所述表位包含SEQ ID NO:45中所列氨基酸序列。

134. 权利要求82—133任一项的分离的双特异性抗体或其抗原结合部分,其中抗体或其抗原结合部分具有KLB/FGFR1c激动剂活性。

135. 权利要求82-134任一项的分离的双特异性抗体或其抗原结合部分,其是嵌合抗体或其抗原结合部分。

136. 权利要求82-135任一项的分离的双特异性抗体或其抗原结合部分,其中抗体是全长IgG抗体。

137. 权利要求82-134任一项的分离的双特异性抗体或其抗原结合部分,其是人源化抗体或其抗原结合部分。

138. 权利要求82-135或137任一项的分离的双特异性抗体或其抗原结合部分,其中抗原结合部分是F(ab')₂或化学连接的F(ab')₂。

139. 权利要求82-138任一项的分离的双特异性抗体或其抗原结合部分,其中抗体或其抗原结合部分激活KLB/FGFR1c复合物。

140. 权利要求82-139任一项的分离的双特异性抗体或其抗原结合部分,其中抗体或其抗原结合部分降低体内血糖水平。

141. 权利要求81-140任一项的分离的双特异性抗体或其抗原结合部分,其中抗体或其抗原结合部分不显著影响骨密度。

142. 权利要求82-141任一项的分离的双特异性抗体或其抗原结合部分,其中抗体或其抗原结合部分以约 10^{-8} M或更高的结合亲和力结合KLB。

143. 权利要求82-142任一项的分离的双特异性抗体在制备用于治疗代谢病症的药物组合物中的用途,其中代谢病症选自多囊卵巢综合征、代谢综合征、肥胖症、非酒精性脂肪性肝炎、非酒精性脂肪肝病、高血脂症、高血压、2型糖尿病、非2型糖尿病、1型糖尿病、隐匿性自身免疫糖尿病和青少年发病的成年型糖尿病,和衰老及其相关疾病,如阿尔茨海默病、帕金森病和ALS。

144. 一种治疗患有代谢病症的个体的方法,包括将治疗有效量的权利要求82-142任一项的分离的双特异性抗体施用于个体。

145. 权利要求144的方法,进一步包括将第二治疗剂施用于个体。

146. 权利要求144或145的方法,其中代谢病症选自多囊卵巢综合征、代谢综合征、肥胖症、非酒精性脂肪性肝炎、非酒精性脂肪肝病、高血脂症、高血压、2型糖尿病、非2型糖尿病、1型糖尿病、隐匿性自身免疫糖尿病和青少年发病的成年型糖尿病,和衰老及相关疾病,如阿尔茨海默病、帕金森病和ALS。

147. 权利要求144、146任一项的方法,其中代谢病症是糖尿病。

148. 一种药物组合物,其包括权利要求82-142任一项的分离的双特异性抗体或其抗原结合部分和药物学上可接受的载体。

149. 权利要求148的组合物,进一步包括第二治疗剂。

150. 一种在个体中激活KLB-FGFR1受体复合物的方法,包括将治疗有效量的权利要求82-142任一项的分离的双特异性抗体施用于个体。

151. 一种分离的核酸,其包括编码权利要求82-142任一项的分离的双特异性抗体或其抗原结合部分的序列。

152. 一种宿主细胞,其表达权利要求82-142任一项的分离的双特异性抗体或其抗原结合部分。

153. 一种杂交瘤细胞,其表达权利要求82-142任一项的分离的双特异性抗体或其抗原结合部分。

筛选多特异性抗体的方法

[0001] 本申请是申请日为2016年11月8日的、发明名称为“筛选多特异性抗体的方法”的中国专利申请201680077834.X(PCT/US2016/060986)的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉参考

[0003] 本申请要求2015年11月8日提交的美国临时申请系列No.62/252,549的优先权,将其全部按引用并入本文中。

[0004] 序列表

[0005] 本申请含有已经以ASCII格式提交的序列表并且由此全部按引用并入。2016年11月7日形成的该ASCII拷贝命名为“BB序列表.txt”并且大小为176,940字节。

发明领域

[0006] 本发明公开涉及多特异性抗体,例如,双特异性抗体,以及筛选这些抗体的方法。本发明公开进一步提供结合Klotho- β 的抗体,以及使用这些抗体治疗疾病的方法。

背景技术

[0007] 多特异性抗体,如双特异性抗体,作为研究工具、诊断工具和作为治疗剂是重要的。这很大一部分是由于可以选择这样的抗体以高特异性和亲和力结合两个或多个抗原或一个抗原上存在的两个或多个表位的事实。例如,在癌症治疗的情况中,多特异性抗体可以用于靶向癌细胞,例如,通过结合癌细胞上存在的抗原,靶向免疫细胞以引发免疫应答。此外,多特异性抗体可以用作杂二聚受体的配体,对于所述的杂二聚受体,当其关联配体(cognate ligand)与之结合并促进受体组分之间的相互作用时,正常会被该配体激活。

[0008] 多特异性抗体在传统上通过化学连接抗体(如具有所需结合特性的单克隆抗体)的片段来鉴定和产生。这种程序可能需要产生和回收特定的抗体片段,使用交联剂或可以相互作用的其他结构部分来偶联这些片段,和连接抗体片段以产生杂二聚体。此外,也使用重组DNA技术,其中过表达两个重链-轻链对,其中该两个重链-轻链对具有不同的结合特异性。然而,由于免疫球蛋白重链和轻链的随机组配,这种方法产生潜在的不同抗体分子的混合物,其中只有小部分的分子具有所需的多特异性结构,例如,双特异性结构。例如,使用这些方法,可以产生同二聚体,并且重链可能与错误的轻链配对以产生对目标抗原或表位不具有所需特异性的抗体。因此,本领域需要改进的方法用于鉴定和选择针对某些目标抗原和/或表位的多特异性抗体(例如,双特异性和双表位抗体)。

[0009] 已经发现多特异性抗体,例如,双特异性抗体,可以用作受体激动剂发挥作用(参见,例如,Weidle等(2013)Cancer Genomics Proteomics 10(1):1-18)。一种可以得益于此类抗体的受体是Klotho- β (KLB)。KLB是114-kDa 1型跨膜蛋白,具有短的胞内结构域和两个胞外糖苷酶结构域,所述两个胞外糖苷酶结构域缺少酶活性必需的特征性谷氨酸残基(Ito等(2000)Mech.Dev.98:115-119)。由哺乳动物物种编码的成纤维细胞生长因子受体(FGFR)的7个主要同种型(1b、2b、3b、1c、2c、3c和4)中,FGFR1c、2c和3c可以与Klotho- β 相互作用,Klotho- β 作为共受体起作用,以形成用于某些FGF配体的功能性受体复合物。例如,在与

Klotho- β 的复合中存在的FGFR1c看起来在介导成纤维细胞生长因子21 (FGF21) 的代谢作用中起着主要作用 (Ogawa等 (2007) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104 (18) :7432-37; US2010/0184665)。FGF21被鉴定为有效的疾病-改变蛋白剂, 逆转动物疾病模型中的肥胖和2型糖尿病 (Kharitonov等 (2005) J. Clin. Invest. 115 (6) :1627-35)。重组FGF21已经在瘦素-信号传输-缺陷 (ob/ob或db/db) 小鼠或高脂肪膳食 (HFD) 饲喂的小鼠中显示出降低肝脂质、提高胰岛素敏感性和正常化血糖控制。在每日用重组FGF21治疗的肥胖和糖尿病猕猴中也观察到了血糖的降低和各种心血管风险因子的改善。

[0010] 靶向FGFR1c和KLB的治疗剂已经成为激烈研究的区域。报道了FGFR1c特异性的抗体拮抗剂在小鼠和猴中诱导体重减轻 (W02005/037235), 并且FGFR1c的激动剂抗体介导的选择性激活足以在糖尿病小鼠中重演由FGF21引起的胰岛素敏化 (W02012/158704; Wu等 (2011) Sci. Trans. Med. 3 (113) :1-10)。已经提出将结合KLB/FGFR1c复合物的抗体作为激活剂/治疗剂 (US 7,537,903; W02011/071783; W02012/158704)。其他人已经研究了两种可替换的方法来选择性地激活FGFR1c/Klotho- β 复合物。Foltz等 (2012) Sci. Transl. Med. 4:162ra153公开了称为mimAb1的高亲和力抗Klotho- β 抗体, 而美国专利No. 8,372,952公开了连接人血清白蛋白 (HAS) 的双特异性抗-FGFR1/Klotho- β Avimer多肽C3201。考虑到Klotho- β 在葡萄糖代谢和代谢疾病中的显著作用, 本领域仍然需要研发调节KLB活性的治疗性抗体和方法。

发明概述

[0012] 本发明公开的主题提供了多特异性抗体, 例如, 双特异性和双表位抗体, 以及筛选此类化合物的方法。本发明公开内容进一步提供了用于产生和分析此类抗体的方法。在某些方面中, 本发明公开的主题进一步涉及抗-KLB抗体。特别地, 本发明公开内容提供了特异性地结合KLB上存在的至少两个不同表位的双特异性抗体, 以及使用所述双特异性抗体或每个单特异性抗体的混合物来治疗受试者疾病的方法。

[0013] 在某些实施方案中, 本发明公开的分离的多特异性抗体, 例如, 双特异性抗体, 包括第一抗原结合多肽, 其中所述第一抗原结合多肽包括以N-末端至C-末端方向放置的VL结构域、接头、VH结构域、CH1结构域、CH2结构域和CH3结构域。在某些实施方案中, 所述双特异性抗体包括VLfH (可变轻链全重链) 形式。在某些实施方案中, 第一抗原结合多肽的组分以以下顺序从N-末端至C-末端方向为: VL-接头-VH-CH1-CH2-CH3。在某些实施方案中, 所述多特异性抗体不包括CL结构域。或者, 在某些实施方案中, 所述多特异性抗体可以进一步包括CL结构域。在某些实施方案中, 所述双特异性抗体包括tcIgG (三链IgG) 形式。在某些实施方案中, CL结构域可以通过一个或多个二硫键连接第一抗原结合多肽。在某些实施方案中, CL结构域和第一抗原结合多肽之间的二硫键将CL结构域和第一抗原结合多肽的CH1结构域连接起来。

[0014] 在某些实施方案中, 本发明公开的多特异性抗体, 例如, 双特异性抗体, 可以进一步包括第二抗原结合多肽, 其中所述第二抗原结合多肽包括以N-末端至C-末端方向放置的VL结构域、接头、VH结构域、CH1结构域、CH2结构域和CH3结构域。在某些实施方案中, 第二抗原结合多肽的组分以以下顺序从N-末端至C-末端方向为: VL-接头-VH-CH1-CH2-CH3。在某些实施方案中, 所述第二抗原结合多肽不包括CL结构域。

[0015] 在某些实施方案中,所述多特异性抗体包括两个CL结构域。在某些实施方案中,所述两个CL结构域是相同的。在某些实施方案中,两个CL结构域中的一个通过一个或多个二硫键连接第一抗原结合多肽,并且两个CL结构域中的另一个通过一个或多个二硫键连接第二抗原结合多肽。在某些实施方案中,二硫键将这些CL结构域与第一抗原结合多肽和第二抗原结合多肽的CH1结构域连接起来。

[0016] 在本发明多特异性抗体包括第一抗原结合多肽和第二抗原结合多肽的某些实施方案中,所述第一和第二抗原结合多肽结合同一抗原上的两个不同表位。或者,所述第一和第二抗原结合多肽结合两个不同的抗原。在某些实施方案中,所述多特异性抗体包括 tcBsIgG形式。在某些实施方案中,所述多特异性抗体可以是多特异性激动剂抗体或多特异性拮抗剂抗体。

[0017] 本发明公开的抗体可以是多特异性激动剂抗体或多特异性拮抗剂抗体。在某些实施方案中,本发明公开的多特异性抗体是双特异性抗体,例如,针对一个靶标的双表位抗体或针对两个不同靶标的双特异性抗体。在某些实施方案中,所述双特异性抗体是激动剂双表位抗体。在某些实施方案中,所述双特异性抗体是拮抗剂双表位抗体。

[0018] 在某些实施方案中,本发明公开提供了包括第一抗原结合多肽和第二抗原结合多肽的分离的双表位激动剂抗体,其中所述第一和第二抗原结合多肽中的每一个包括以以下顺序从N-末端至C-末端方向放置的VL结构域、接头、VH结构域、CH1结构域、CH2结构域和CH3结构域:VL-接头-VH-VH1-CH2-CH3。在某些实施方案中,所述双表位激动剂抗体的第一和第二抗原结合多肽结合同一抗原上的两个不同表位。

[0019] 在某些实施方案中,双表位激动剂抗体不包括CL结构域。在某些实施方案中,双表位激动剂抗体进一步包括两个CL结构域。在某些实施方案中,CL结构域没有共价连接到第一或第二抗原结合多肽。在某些实施方案中,CL结构域没有共价连接VL结构域。在某些实施方案中,VL和CL是分开的。在某些实施方案中,所述分开可以是在VL和CL之间的任何连接处。在某些实施方案中,所述连接可以在T109(即,CL可以在T109开始,而VL可以在R108结束)。在某些其他实施方案中,所述CL可以从V110开始。

[0020] 在某些实施方案中,所述两个CL结构域是相同的。在某些实施方案中,双表位激动剂抗体的两个CL结构域之一通过一个或多个二硫键连接第一抗原结合多肽,而两个CL结构域的另一个通过一个或多个二硫键连接第二抗原结合多肽。在某些实施方案中,所述二硫键将这些CL结构域与第一抗原结合多肽和第二抗原结合多肽的CH1结构域连接起来。

[0021] 在某些实施方案中,所公开的抗体的抗原结合多肽内存在的接头可以包括甘氨酸(G)和丝氨酸(S)残基。在某些实施方案中,所述接头具有约1至约50个氨基酸长。在某些实施方案中,所述接头为约20个氨基酸长。在某些实施方案中,所述接头包括G4S重复。在某些实施方案中,所述接头包括SEQ ID NO:68的氨基酸序列。在某些实施方案中,所述接头是可断裂的。

[0022] 在某些实施方案中,所公开的多特异性抗体的第一抗原结合多肽的CH3结构域和第二抗原结合多肽的CH3结构域在界面相遇,其中所述界面被改变以促进多特异性抗体的形成。在某些实施方案中,第一抗原结合多肽的CH3结构域的一个或多个氨基酸残基被一个或多个具有较大侧链体积的氨基酸残基替代,以在第一抗原结合多肽的CH3结构域的表面上产生突起。在某些实施方案中,第二抗原结合多肽的CH3结构域的一个或多个氨基酸残基

被一个或多个具有较小侧链体积的氨基酸残基替代,以在第二抗原结合多肽的CH3结构域的表面上产生空穴,所述空穴可以与第一抗原结合多肽的CH3结构域表面的突起相互作用。在某些实施方案中,具有较大侧链体积的氨基酸残基可以包括精氨酸(R)、苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)或色氨酸(W)。在某些实施方案中,具有较小侧链体积的氨基酸残基可以包括丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)或缬氨酸(V)。在某些实施方案中,杵(例如,突起)突变可以包括T366W(EU编号)。在某些实施方案中,臼(例如,空穴)突变可以包括T366S、L368A和Y407V中的至少一个、至少两个或全部(EU编号)。在某些实施方案中,本发明公开的多特异性抗体或双表位抗体是IgG、IgA或IgE同种型。在某些实施方案中,本发明公开的多特异性抗体或双表位抗体是IgG同种型。在某些实施方案中,所述多特异性抗体或双表位抗体是IgG₁、IgG₂或IgG₄同种型。在某些实施方案中,所述双表位抗体是双表位激动剂抗体。

[0023] 本发明公开的主题进一步提供了包括编码本发明多特异性抗体或双表位抗体的序列的分离核酸。在某些实施方案中,所述双表位抗体是双表位激动剂抗体。本发明公开的主题进一步提供了包括所公开的核酸的载体。

[0024] 本发明公开的主题进一步提供了表达本发明公开的多特异性抗体或双表位抗体的宿主细胞。在某些实施方案中,本发明公开提供了包括一个或多个编码多特异性抗体或双表位抗体的核酸的宿主细胞。例如,并且不限于,所述宿主细胞可以包括编码第一抗原结合多肽的核酸和分开的编码第二抗原结合多肽的核酸。或者,所述宿主细胞可以包括编码第一抗原结合多肽和第二抗原结合多肽的核酸。在某些实施方案中,所述宿主细胞进一步包括分开的编码CL结构域的核酸,例如,第二核酸或第三核酸。在某些实施方案中,所述双表位抗体是双表位激动剂抗体。

[0025] 本发明公开的主题进一步提供了产生多特异性抗体或双表位抗体(例如,双表位激动剂抗体)的方法。在某些实施方案中,所述方法包括在足以产生多特异性抗体或双表位抗体的条件下培养宿主细胞。在某些实施方案中,所述方法可以进一步包括从培养物收集多特异性抗体或双表位抗体,例如,通过纯化技术来收集。在某些实施方案中,所述双表位抗体是双表位激动剂抗体。

[0026] 在另一个方面中,本发明公开的主题进一步提供了包括本文中公开的多特异性抗体或双表位抗体的药物组合物。在某些实施方案中,所述组合物进一步包括第二治疗剂。本发明公开的主题进一步提供了包括本文中公开的多特异性抗体或双表位抗体或其组合物的药盒。在某些实施方案中,所述双表位抗体是双表位激动剂抗体。

[0027] 本发明公开的主题进一步提供了包括多个本发明多特异性抗体或双表位抗体的文库。在某些实施方案中,所述文库可以包括多个编码多个本文中公开的多特异性抗体或双表位抗体的多核苷酸。

[0028] 在另一个方面中,本发明公开的主题进一步提供了一种筛选多特异性抗体的方法。例如,但不限于,本文中公开的方法可以用于筛选双表位抗体,其中所述抗体结合同一抗原上的两个表位。在某些实施方案中,本文中公开的方法可以用于鉴定呈现出激动剂活性或拮抗剂活性的多特异性抗体,例如,双特异性或双表位抗体。在某些实施方案中,所述方法可以包括(a)从文库获得多个多特异性抗体,(b)分析多个多特异性抗体与第一和第二抗原或同一抗原上的第一和第二表位的结合和(c)鉴定结合第一和第二抗原或同一抗原上的第一和第二表位的多特异性抗体。

[0029] 在某些实施方案中,筛选多特异性抗体的方法可以包括(a)在细胞中表达多特异性抗体,(b)将步骤(a)的多特异性抗体接触第一抗原和第二抗原或同一抗原上的第一表位和第二表位和(c)鉴定结合第一抗原和第二抗原或同一抗原上的第一表位和第二表位的多特异性抗体。

[0030] 在进一步的方面中,本发明公开的主题进一步提供了筛选双表位激动剂或拮抗剂抗体的方法。在某些实施方案中,所述方法可以包括(a)从文库获得多个多特异性抗体,(b)分析多个多特异性抗体与同一抗原的第一和第二表位的结合,(c)鉴定一个或多个结合同一抗原的第一和第二表位的双表位抗体和(d)从该一个或多个双表位抗体鉴定呈现激动或拮抗活性的双表位抗体,以获得双表位激动剂或拮抗剂抗体。在某些实施方案中,所述方法可以进一步包括,将双表位激动剂或拮抗剂抗体的激动或拮抗活性,与一个或多个该双表位激动剂或拮抗剂抗体所源自的单特异性亲本抗体(单个地或组合地),进行比较。

[0031] 在某些实施方案中,筛选双表位激动剂或拮抗剂抗体的方法可以包括(a)在细胞中表达多特异性抗体,(b)将步骤(a)的多特异性抗体接触同一抗原的第一表位和第二表位,(c)鉴定结合同一抗原的第一表位和第二表位的多特异性抗体以获得双表位抗体,和(d)确定所述双表位抗体是否呈现激动或拮抗活性,以获得双表位激动剂或拮抗剂抗体。在某些实施方案中,所述方法可以进一步包括,将双表位激动剂或拮抗剂抗体的激动或拮抗活性,与一个或多个该双表位激动剂或拮抗剂抗体所源自的单特异性亲本抗体(单个地或组合地),进行比较。

[0032] 在某些实施方案中,在细胞中表达多特异性抗体或双表位抗体包括,将一个或多个编码多特异性抗体或双表位抗体的核酸引入细胞中。在某些实施方案中,在步骤(b)中,将所述多特异性抗体或双表位抗体同时接触第一和第二抗原或同一抗原的第一和第二表位。在某些实施方案中,将所述多特异性抗体或双表位抗体接触第一和第二抗原或同一抗原的第一和第二表位前,将步骤(b)的多特异性抗体或双表位抗体纯化。在某些实施方案中,通过蛋白A色谱来纯化所述多特异性抗体或双表位抗体。在某些实施方案中,抗原存在于生物复合物内。在某些实施方案中,细胞是原核细胞,例如,大肠杆菌细胞。在某些实施方案中,细胞是真核细胞,例如,酵母细胞或哺乳动物细胞。在某些实施方案中,所述哺乳动物细胞是中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。在某些实施方案中,通过ELISA来分析所述多特异性抗体与第一和/或第二抗原的结合。在某些实施方案中,所述双表位抗体是双表位激动剂抗体。

[0033] 在另一个方面中,本发明公开提供了特异性地结合KLB上存在的至少两个表位的双特异性(例如,双表位)抗体和/或特异性地结合KLB上存在的至少两个表位的抗KLB抗体的混合物,以及使用所述抗体和/或混合物治疗受试者疾病的方法。在某些实施方案中,双特异性抗KLB抗体包括第一抗体或其抗原结合部分、以及第二抗体或其抗原结合部分。例如,但不限于,第一抗体,或其抗原结合部分,可以包括重链可变区和轻链可变区,并且第二抗体,或其抗原结合部分,可以包括重链可变区和轻链可变区,其中所述第一抗体和第二抗体,或其抗原结合部分,结合KLB上存在的不同表位。

[0034] 在某些实施方案中,双特异性抗KLB抗体包含包括CDR1、CDR2和CDR3结构域的重链可变区和包括CDR1CDR2和CDR3结构域的轻链可变区。在某些实施方案中,双特异性抗KLB抗体,或其抗原结合部分,包括重链可变区和轻链可变区。在某些实施方案中,所述重链可变区包括具有与SEQ ID NO:34、36、38、40或42中所列序列至少90%、91%、92%、93%、94%、

95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的序列的氨基酸。在某些实施方案中,所述轻链可变区包括具有与SEQ ID NO:33、35、37、39或41中所列序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的序列的氨基酸。

[0035] 在某些实施方案中,双特异性抗KLB抗体可以包括具有与SEQ ID NO:38中所列序列约95%相同的序列的重链可变区和具有与SEQ ID NO:37中所列序列约95%相同的序列的轻链可变区。在某些实施方案中,所述双特异性抗KLB抗体可以包括具有与SEQ ID NO:42中所列序列约95%相同的序列的重链可变区和具有与SEQ ID NO:41中所列序列约95%相同的序列的轻链可变区。

[0036] 在某些实施方案中,本发明公开提供了包括所公开的双特异性抗KLB抗体和药物学上可接受的载体的药物组合物。在某些实施方案中,所述药物组合物可以包括另外的治疗剂。

[0037] 在某些实施方案中,本发明公开的主题提供了双特异性抗KLB抗体用于治疗代谢疾病的方法中,所述疾病例如为多囊卵巢综合征(PCOS)、代谢综合征(MetS)、肥胖症、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、非酒精性脂肪肝病(NAFLD)、高血脂症、高血压、2型糖尿病、非2型糖尿病、1型糖尿病、隐匿性自身免疫糖尿病(latent autoimmune diabete, LAD)和青少年发病的成年型糖尿病(MODY),以及衰老和相关疾病,如阿尔茨海默病、帕金森病和ALS。在某些实施方案中,双特异性抗KLB抗体用于治疗2型糖尿病。所述方法可以包括将治疗有效量的本发明抗体施用于个体。在某些实施方案中,所述疾病是糖尿病,例如,2型糖尿病。在某些实施方案中,所述方法进一步包括将另外的治疗剂施用于个体。

[0038] 在某些实施方案中,本发明公开的主题提供了编码本发明双特异性抗KLB抗体的分离核酸。在某些实施方案中,本发明公开的主题提供了包括本文中公开的核酸的宿主细胞。在某些实施方案中,本发明公开的主题进一步提供了表达本文中公开的双特异性抗KLB抗体或其抗原结合部分的杂交瘤细胞。在某些实施方案中,本发明公开的主题提供了在宿主细胞中产生双特异性抗体的方法,包括用本发明的核酸转化宿主细胞,在产生所述双特异性抗体的条件下培养宿主细胞。在某些实施方案中,这种方法进一步包括从宿主细胞回收抗体。

[0039] 在某些实施方案中,本发明公开的主题提供了在个体中激活KLB-FGFR1c受体复合物的方法,包括将有效量的所公开的双特异性抗KLB抗体施用于个体。

附图简述

[0041] 图1A-1B描绘了,根据所公开主题的一个非限制性实施方案用于示例性方法中的可变轻链全重链(VLfH)形式。VLfH在本文中也称为“三-链IgG”或“tcIgG”。tcIgG是双特异性抗体时,tcIgG可以更具具体地称为“tcBsIgG”。

[0042] 图2A-2B描绘了显示出VLfH形式的双特异性抗体杂二聚化的液相色谱-质谱(LC-MS)图。

[0043] 图3描绘了,在基于GAL4-E1k1的荧光素酶测定试验中,由结合KLB上存在的两个表位的各种VLfH-形式的双特异性抗KLB抗体诱导的KLB-FGFR1c受体活性,其中与相应的亲本单特异性VLfH形式的抗体进行比较。

[0044] 图4描绘了,在基于GAL4-E1k1的荧光素酶测定试验中,由结合KLB上存在的两个表

位的各种双特异性抗KLB抗体诱导的KLB-FGFR1c受体活性,其中与相应的亲本单特异性抗体进行比较。

[0045] 图5描绘了,在基于GAL4-E1k1的荧光素酶测定试验中,由结合KLB上存在的两个表位的各种双特异性抗KLB抗体诱导的KLB-FGFR1c受体活性,其中与相应的亲本单克隆抗体、抗KLB/抗FGFR1c双特异性抗体(BsAb2)和曲妥珠单抗(trastuzumab,一种同种型匹配的对照抗体)进行比较。

[0046] 图6描绘了,在基于GAL4-E1k1的荧光素酶测定试验中,由结合KLB上存在的两个表位的各种双特异性抗KLB抗体诱导的KLB-FGFR1c受体活性,其中与相应亲本单特异性抗体的1:1混合物进行比较。

[0047] 图7描绘了,使用基于GAL4-E1k1的荧光素酶报告分子测定试验,抗KLB激动剂单克隆抗体诱导KLB-FGFR1c受体活性,但不诱导密切相关的受体复合物KLB-FGFR2c的活性。

[0048] 图8描绘了双特异性抗KLB抗体在人原代脂肪细胞中诱导了ERK磷酸化。

[0049] 图9描绘了,使用流式细胞术,用于产生本发明公开的双特异性抗KLB抗体的单克隆抗体的KLB结合。

[0050] 图10描绘了,使用嵌合KLB和FGFR蛋白,由用于产生本发明公开的双特异性抗KLB抗体的单克隆抗体诱导的KLB/FGFR1c受体活性。

[0051] 图11A-11B描绘了:(A)用于产生双特异性抗体的抗KLB单克隆抗体和对照抗KLB单克隆抗体8C5的表位分仓(bin)的总结。(B)与表达人/大鼠KLB嵌合蛋白的HEK293T细胞的FACS结合。

[0052] 图12描绘了用于测定图7中总结的表位分仓的示例性生物膜层干涉技术(biolayer interferometry)实验。在这个实例中,2C12(人IgG1)与23B3竞争与重组KLB的结合,但不与28B7或8C5竞争。

[0053] 图13公开了抗KLB抗体克隆12B8的轻链可变区和重链可变区序列。

[0054] 图14公开了抗KLB抗体克隆2C12的轻链可变区和重链可变区序列。

[0055] 图15公开了抗KLB抗体克隆4H7的轻链可变区和重链可变区序列。

[0056] 图16公开了抗KLB抗体克隆23B3的轻链可变区和重链可变区序列。

[0057] 图17公开了抗KLB抗体克隆28B7的轻链可变区和重链可变区序列。

[0058] 图18A-18D公开了tcBsIgG形式使得能够在单细胞中产生双特异性抗体。(A) tcBsIgG形式的示意图。抗体VL结构域经由 $(G_4S)_4$ 接头栓系于抗体重链(左)。通过从分开的质粒反式表达CL来弥补CH1的折叠缺陷(右)。(B) 蛋白A亲和柱纯化收集后毛细管电泳,显示抗KLB抗体(克隆28B7单表位tcIgG)的表达,以IgG1、2和4同种型以及缺糖基化(aglycosylated) $(N_{297}G)$ 的IgG1和IgG4形式。在HEK293细胞中单独VLfH不带 C_L 表达,导致微量或没有VLfH表达(泳道1);VLfH与 C_L 共表达,导致tcIgG表达(泳道2),与标准IgG表达(泳道3)相当。(C) 蛋白A亲和柱纯化收集后毛细管电泳,抗KLB抗体(克隆28B7单表位tcIgG)的表达,针对标准IgG1、2和4以及tcIgG1、2和4对应物,作为杵半IgG形式(泳道1);臼半IgG形式(泳道2);单细胞中杵和臼共同表达的IgG形式(泳道3)。(D) 蛋白A和大小排阻色谱后,抗KLB抗体(克隆28B7单表位tcIgG)的完整LC-MS/MS。

[0059] 图19A-19C公开了tcBsIgG形式的抗KLB双表位抗体的产生。(A) 毛细管电泳,在7×7杵和臼组合中,阳性和阴性表达对照tcIgG以及五个抗KLB tcIgG半抗体的共同表达以在

单细胞中产生tcBsIgG。(B)毛细管电泳,在单细胞中表达的各tcBsIgG的亲本tcIgG表达。(C)蛋白A色谱后tcIgG的分析性大小排阻色谱(SEC)。

[0060] 图20A-20C公开了抗体同种型对抗体激动剂活性的影响。(A)荧光素酶报告分子测定试验,显示不同同种型的活性。(B)人原代脂肪细胞中不同抗体同种型对ERK1/2磷酸化的影响。(C)人原代脂肪细胞中不同抗体同种型及其组合对ERK1/2磷酸化的影响。

[0061] 图21公开了抗KLB抗体克隆28B7和4H7之间的结合亲和力差异。

发明详述

[0063] 为了清楚而非限制,将本发明公开主题的详细描述分成以下几个部分:

[0064] I. 定义;

[0065] II. 抗体;

[0066] III. 筛选和生产方法

[0067] IV. 使用方法

[0068] V. 药物制剂;和

[0069] VI. 制造品和药盒。

[0070] I. 定义

[0071] 如本文中使用的,“受体人框架”是,包括源自如下定义的人免疫球蛋白框架或人共有框架的轻链可变结构域(VL)框架或重链可变结构域(VH)框架的氨基酸序列的框架。“源自”人免疫球蛋白框架或人共有框架的受体人框架可以包括与其相同的氨基酸序列,或其可以含有氨基酸序列变化。在一些实施方案中,氨基酸变化的数量为约10个或更少、约9个或更少、约8个或更少、约7个或更少、约6个或更少、约5个或更少、约4个或更少、约3个或更少,或约2个或更少。在某些实施方案中,VL受体人框架序列与VL人免疫球蛋白框架序列或人共有框架序列在序列上相同。

[0072] 如本文中使用的,“亲和力”(affinity)是指分子(例如,抗体)的单个结合位点与其结合配偶体(例如,抗原)之间的非共价相互作用的总和强度。除非另外指出,否则如本文中所使用的,“结合亲和力”是指反映结合对(例如,抗体和抗原)的成员之间1:1相互作用的内在结合亲和力。分子X对于其配偶体Y的亲和力通常可以通过解离常数(k_d)来表示。亲和力可以通过本领域已知的常规方法来测量,包括本文中所述的那些方法。以下描述了用于测量结合亲和力的具体举例说明性和示例性实施方案。

[0073] “亲和力成熟”抗体是指,在一个或多个高变区(HVR)中具有一个或多个改变的抗体,与不具有这种改变的亲本抗体相比,这种改变导致抗体对抗原的亲和力提高。

[0074] 除非另外指出,如本文中使用的,“Klotho- β ”、“KLB”和“ β -Klotho”是指来自任何脊椎动物来源的任何天然Klotho- β ,所述脊椎动物包括哺乳动物,如灵长类(例如,人类)和啮齿动物(例如,小鼠和大鼠)。该术语包括“全长”、未加工的KLB,以及由细胞中加工产生的任何形式的KLB。该术语还包括KLB的突变和天然变体,例如,剪接变体或等位基因变体。

[0075] 如下是由本发明的双特异性抗体靶向的人KLB氨基酸序列的一个非限制性实例,其中排除了信号序列:

FSGDGRAIWSKNPNFTPVNESQLFLYDTFPKNFFWGIGTGALQVEGSWKKDGKGPSIWDHFIHTHLKNVS
STNGSSDSYIFLEKDLSDFIGVSFYQFSISWPRLPDGIPTVANAKGLQYYSTLLDALVLRNIEPIVTLYH
WDLPLALQEKYGGWKNDTIIDIFNDYATYCFQMFGDRVKYWIHNPYLVAWHGYGTGMHAPGEKGNL
AAVYTVGHNLIAHASKVWHNYNTHFRPHQKGWLSITLGSHWIEPNRSENTMDIFKCQSMVSVLGWFA
NPIHGDGDYPEGMRKKLFSVLPIFSEAEKHEMRGTADFFAFSFGPNNFKPLNTMAKMGQNVSLNREAL
[0076] NWIKLEYNNPRILIAENGWFTDSRVKTEDTTAIYMMKNFLSQVLQAIRLDEIRVFGYTAWSLLDGFEWQD
AYTIRRGFLFYVDFNSKQKERKPKSSAHYYKQIIRENGFSLKESTPDVQGGQFPCDFSWGVTESVLKPESVAS
SPQFSDPHLYVWNATGNRLLHRVEGVRLKTRPAQCTDFVNIKKQLEMLARMKVTHYRFALDWASVLPT
GNLSAVNRQALRYRCVVSEGLKLGISAMVTLYYPHTAHLGLPEPLLHADGWLNPSTAEAFQAYAGLCF
QELGDLVKLWITINEPNRLSDIYNRSGNDTYGAAHNLLVAHALAWRLYDRQFRPSQRGAVSLSLHADWA

[0077] EPANPYADSHWRAAERFLQFEIAWFAEPLFKTGDYPAMREYIASKHRRGLSSSALPRLTEAERRLLKG
T

[0078] VDFCALNHFTTRFVMHEQLAGSRYDSRDIQFLQDITRLSSPTRLAVIPWGVRLKLLRWVRRNYGDMDIY
I

[0079] TASGIDDQALEDDRLRKYYLGKYLQEVLKAYLIDKVRIKGYAFKLAEEKSKPRFGFTSDFKAKSSIQ
FY

[0080] NKVISSRGFPFENSSSRCSQTQENTECTVCLFLVQKKPLIFLGCCFFSTLVLLLSIAIFQRQKRRKFW
KAKNLQHIPLKKGKRVVS (SEQ ID NO:1) .。

[0081] 术语“KLB的C端结构域”是指,KLB的羧基端糖苷酶样结构域。例如SEQ ID NO:1中
所示的示例性KLB蛋白的C端结构域包括如下氨基酸序列:

[0082] FPCDFSWGVTESVLKPESVASSPQFSDPHLYVWNATGNRLLHRVEGVRLKTRPAQCTDFVNIKKQLEML
A

[0083] RMKVTHYRFALDWASVLPTGNLSAVNRQALRYRCVVSEGLKLGISAMVTLYYPHTAHLGLPEPLLHAD

[0084] GWLNPSTAEAFQAYAGLCFQELGDLVKLWITINEPNRLSDIYNRSGNDTYGAAHNLLVAHALAWRLYDR

[0085] QFRPSQRGAVSLSLHADWAEPANPYADSHWRAAERFLQFEIAWFAEPLFKTGDYPAMREYIASKHRRG
L

[0086] SSSALPRLTEAERRLLKGTVDFCALNHFTTRFVMHEQLAGSRYDSRDIQFLQDITRLSSPTRLAVIPW
GV

[0087] RKLLRWVRRNYGDMDIYITASGIDDQALEDDRLRKYYLGKYLQEVLKAYLIDKVRIKGYAFKLAEEK
SKPRFGFTSDFKAKSSIQFYNKVISSRGFPFENSSSR (SEQ ID NO:2) .

[0088] 如本文中提及的,“抗原结合多肽”是包括抗原结合区或抗原结合部分的蛋白质或
多肽,对与其结合的另一分子具有强亲和力。抗原结合多肽涵盖抗体或其抗原结合片段、以
及融合蛋白。

[0089] 本文中使用的术语“抗体”以最宽的含义来使用,并且包括各种抗体结构,包括但
不限于,多特异性抗体(例如双特异性抗体)、以及呈现期望的抗原结合活性的抗体片段。

[0090] 如本文中使用的,抗体的“抗体片段”、“抗原结合部分”(或简称“抗体部分”)或抗
体的“抗原结合片段”是指,非完整抗体的分子,其包括完整抗体的部分,所述部分结合该完
整抗体所结合的抗原和/或表位。抗体片段的实例包括但不限于Fv、Fab、Fab’、Fab’-SH、F
(ab’)2;双链抗体(diabody);线性抗体;单链抗体分子(例如,scFv);以及从抗体片段形成
的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)。

[0091] 在某些实施方案中,术语“激动剂”和“激动”可以指,与受体(例如,抗原)相互作用

(例如,结合受体)并且能够启动、模拟和/或刺激反应或活性的分子(例如,抗原结合多肽和/或抗体和/或抗原结合抗体片段),其中所述反应或活性与由受体的天然配体所启动、模拟和/或刺激的反应或活性相似或相同。在某些实施方案中,本文中所述的激动剂能够诱导、增大、增强和/或刺激与受体相关的信号转导途径的激活。

[0092] 与参照抗体“竞争结合的抗体”是指,该抗体在竞争测试中阻断参照抗体与其抗原(例如,KLB)的结合达50%或更高程度,并且反过来,参照抗体在竞争测试中阻断抗体与其抗原(例如,KLB)的结合达50%或更高程度。示例性竞争测试描述于“Antibodies”,Harlow and Lane(Cold Spring Harbor Press,Cold Spring Harbor,NY)。

[0093] 术语“嵌合”抗体是指,抗体的重链和/或轻链的一部分源自特定来源或物种,而重链和/或轻链的其余部分源自不同的来源或物种。

[0094] 抗体的“类别”是指,抗体重链具有的恒定结构域或恒定区的类型。存在五种主要的抗体类别:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,并且这些中的一些可以进一步分为亚类(同种型),例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。对应于不同类别的免疫球蛋白的重链恒定结构域分别被称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。在某些实施方案中,本发明的多特异性抗体,例如双特异性抗体,可以是所公开的抗体类别或亚类(同种型)中的任何一种。

[0095] 如本文中使用的术语“细胞毒性剂”是指抑制或阻止细胞功能和/或引起细胞死亡或破坏的物质。细胞毒性剂包括,但不限于,放射性同位素(例如,At²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²、P³²、Pb²¹²和Lu的放射性同位素)、化疗剂或药物(例如,氨甲喋呤、阿霉素、长春花生物碱(长春新碱、长春碱、依托泊苷)、亚德里亚霉素(doxorubicin)、美法仑、丝裂霉素C、苯丁酸氮芥、道诺霉素或其他嵌入剂);生长抑制剂;酶及其片段,如溶核酶;抗生素;毒素,如小分子毒素,或细菌、真菌、植物或动物来源的酶活性毒素,包括其片段和/或变体;和下文公开的各种抗肿瘤或抗癌剂。

[0096] “效应子功能”是指可归因于抗体的Fc-区的那些生物活性,其随抗体同种型改变。抗体效应子功能的实例包括:C1q结合和补体依赖性细胞毒性(CDC);Fc受体结合;抗体依赖性的细胞介导的细胞毒性(ADCC);吞噬作用;细胞表面受体(例如B细胞受体)的下调;和B-细胞激活。

[0097] 本文中的术语“Fc区”用于定义含有至少一部分的恒定区的免疫球蛋白重链的C-末端区域。该术语包括天然序列Fc-区和变体Fc-区。在某些实施方案中,人IgG重链Fc-区从Cys226或从Pro230延伸至重链的羧基端。然而,Fc-区的C-端赖氨酸(Lys447)可以存在或可以不存在。除非本文中另外指出,Fc-区或恒定区中的氨基酸残基的编号是根据EU编号系统,也称为EU索引,如Kabat等,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD,1991中所述的。

[0098] “框架”或“FR”是指除了高变区(HVR)残基之外的可变结构域残基。可变结构域的FR通常由四个FR结构域组成:FR1、FR2、FR3和FR4。因此,HVR和FR序列通常以以下顺序出现在VH(或VL)中:FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4。

[0099] 术语“全长抗体”、“完整抗体”和“全抗体”在本文中可互换使用,是指抗体具有与天然抗体结构基本上类似的结构,或具有含有本文中定义的Fc-区的重链。

[0100] 术语“宿主细胞”、“宿主细胞系”和“宿主细胞培养物”可互换使用,是指其中已经

引入外源核酸的细胞,包括这种细胞的后代。宿主细胞包括“转化体”和“转化的细胞”,其包括原代转化的细胞和由其衍生的后代,不考虑传代数。后代在核酸内容物方面可以与亲本细胞不完全相同,而是可以含有突变。本文涵盖这样的突变体后代,其具有与针对最初转化的细胞筛选或选择的功能或生物活性相同的功能或生物活性。

[0101] 如本文中使用的,“人抗体”,是指抗体具有这样的氨基酸序列,所述序列对应于人或人细胞产生的抗体的序列、或源自利用人抗体库或其他人抗体编码序列的抗体的序列。人抗体的该定义中特别地排除包含非人抗原结合残基的人源化抗体。

[0102] 如本文中使用的,“人共有框架”是指这样的框架,该框架代表在选择的一系列人免疫球蛋白VL或VH框架序列中最常出现的氨基酸残基。通常,选择的该系列人免疫球蛋白VL或VH框架序列来自可变结构域序列的亚组。通常,序列的亚组是如Kabat等, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), 第1-3卷中的亚组。在某些实施方案中,对于VL,所述亚组是如在Kabat等(出处同上)中的亚组κI。在某些实施方案中,对于VH,所述亚组是如在Kabat等(出处同上)中的亚组III。

[0103] 如本文中使用的,“人源化”抗体是指包含来自非人HVR的氨基酸残基和来自人FR的氨基酸残基的嵌合抗体。在某些实施方案中,人源化抗体可以包含至少一个和通常两个可变结构域的基本上全部,其中所有或基本上所有的HVR(例如,CDR)对应于非人抗体的HVR,并且所有或基本上所有FR对应于人抗体的FR。人源化抗体任选地可以包含至少一部分的源自人抗体的抗体恒定区。抗体(例如,非人抗体)的“人源化形式”是指已经经历人源化的抗体。

[0104] 术语“可变区”或“可变结构域”是指抗体重链或轻链中参与所述抗体与抗原的结合的结构域。天然抗体的重链和轻链的可变结构域(分别是VH和VL)通常具有类似的结构,每个结构域包含四个保守框架区(FR)和三个高变区(HVR)(参见,例如,Kindt等, *Kuby Immunology*, 第6版, W.H. Freeman and Co., 第91页(2007))。单个VH或VL结构域可能足以赋予抗原-结合特异性。此外,结合特定抗原的抗体可以使用来自结合所述抗原的抗体的VH或VL结构域,通过分别筛选互补VL或VH结构域的文库来进行分离(参见,例如,Portolano等, *J. Immunol.* 150:880-887(1993); Clackson等, *Nature* 352:624-628(1991))。

[0105] 如本文中使用的,术语“高变区”或“HVR”是指,抗体可变结构域中在序列上高变(“互补性决定区”或“CDR”)和/或形成在结构上确定的环(“超变环”)和/或含有抗原接触残基(“抗原接触点”)的每个区域。通常,抗体包含六个HVR;三个在VH中(H1、H2、H3),以及三个在VL(L1、L2、L3)中。本文中的示例性HVR包括:

[0106] (a) 在氨基酸残基26-32(L1)、50-52(L2)、91-96(L3)、26-32(H1)、53-55(H2)和96-101(H3)处存在的高变环(Chothia和Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917(1987));

[0107] (b) 在氨基酸残基24-34(L1)、50-56(L2)、89-97(L3)、31-35b(H1)、50-65(H2)和95-102(H3)处存在的CDR(Kabat等, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD(1991));

[0108] (c) 在氨基酸残基27c-36(L1)、46-55(L2)、89-96(L3)、30-35b(H1)、47-58(H2)和93-101(H3)处存在的抗原接触点(MacCallum等, *J. Mol. Biol.* 262:732-745(1996));和

[0109] (d) (a)、(b)和/或(c)的组合,包括HVR氨基酸残基46-56(L2)、47-56(L2)、48-56(L2)、49-56(L2)、26-35(H1)、26-35b(H1)、49-65(H2)、93-102(H3)和94-102(H3)。

[0110] 除非另有说明,可变结构域中的HVR残基和其它残基(例如,FR残基)在本文中根据Kabat等(出处同上)编号。

[0111] 如本文中使用的,“免疫缀合物”是与一个或多个异源分子(包括但不限于细胞毒性剂)缀合的抗体。

[0112] “个体”、“患者”或“受试者”在本文中可互换使用,是指哺乳动物。哺乳动物包括,但不限于,驯养动物(例如,牛、绵羊、猫、狗和马),灵长类动物(例如,人和非人灵长类动物,如猴),兔和啮齿类动物(例如,小鼠和大鼠)。在某些实施方案中,所述个体或受试者是人。

[0113] 如本文中使用的,“分离的”抗体是指已经与其天然环境中的组分分离的抗体。在某些实施方案中,将抗体纯化至大于95%或99%纯度,所述纯度可以通过例如电泳(例如,SDS-PAGE、等电聚焦(IEF)、毛细管电泳)或色谱(例如,离子交换或反相HPLC)确定。关于评价抗体纯度的方法的综述,参见,例如,Flatman等,J.Chromatogr.B 848:79-87(2007)。

[0114] 如本文中使用的,“分离的”核酸是指已经与其天然环境中的组分分离的核酸分子。分离的核酸包括,包含在通常含有该核酸分子的细胞中的核酸分子,但是所述核酸分子存在于染色体外或存在于与其天然染色体位置不同的染色体位置。

[0115] “编码抗体的分离核酸”(包括在提及特定的抗体,例如,抗KLB抗体时)是指,一个或多个编码抗体重链和轻链(或其片段)的核酸分子,包括在单个载体或分开的载体中的这样的核酸分子,以及存在于宿主细胞中的一个或多个位置的这样的核酸分子。

[0116] 如本文中使用的,术语“载体”是指能够扩增与其连接的另一个核酸的核酸分子。该术语包括,以自我复制核酸结构存在的载体、以及整合至引入了该载体的宿主细胞的基因组中的载体。某些载体能够指导与其可操作地连接的核酸的表达。在本文中将这样的载体称为“表达载体”。

[0117] 如本文中使用的,术语“单克隆抗体”是指,获自基本上同质的一群抗体的抗体,即,除了通常以微量存在的可能变体抗体(例如,含有天然突变,或在单克隆抗体制品的生产过程中出现)以外,构成所述群体的各个抗体是相同的和/或结合相同表位;或多特异性抗体,例如结合至少两个不同表位的抗体。与通常包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制品不同,单克隆抗体制品中的每个单克隆抗体都对抗原上的单个决定簇。因而,修饰语“单克隆”表示所述抗体得自基本上同质的抗体群体的特征,并且不应解释为需要通过任何特定方法生产所述抗体。例如,根据本发明使用的单克隆抗体可以通过多种技术来制备,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,和使用含有全部或部分的人免疫球蛋白基因座的转基因动物的方法,本文描述了这样的方法和其它示例性的制备单克隆抗体的方法。

[0118] 如本文中使用的,“裸抗体”是指没有与异源部分(例如,细胞毒性部分)或放射性标记缀合的抗体。裸抗体可以存在于药物制剂中。

[0119] 如本文中使用的,“天然抗体”是指具有各种结构的天然存在的免疫球蛋白分子。例如,但不限于,天然IgG抗体是约150,000道尔顿的异源四聚体糖蛋白,由二硫键结合的两条相同的轻链和两条相同的重链组成。从N-端至C-端,每个重链具有可变区(VH),也称为可变重链结构域或重链可变结构域,接着是三个恒定结构域(CH1、CH2和CH3)。类似地,从N-端

至C-端,每个轻链具有可变区(VL),也称为可变轻链结构域或轻链可变结构域,接着是恒定轻链(CL)结构域。抗体的轻链可以基于其恒定结构域的氨基酸序列归入两种类型(称为kappa(κ)和lambda(λ))中的一种。在某些实施方案中,人IgG Fc区的“CH2结构域”从IgG的约残基231延伸至约340。在某些实施方案中,CH3结构域包括Fc区中位于CH2结构域C-端的残基链(即,从IgG的约氨基酸残基341至约氨基酸残基447)。

[0120] 如本文中使用的,“铰链区”通常是指人IgG1的氨基酸Glu216至Pro230(参见Burton, *Molec. Immunol.* 22:161-206(1986))。在某些实施方案中,通过将形成重链间S-S键的第一个和最后一个半胱氨酸残基放置在相同位置,可以将其他IgG同种型的铰链区与IgG1序列对齐。

[0121] 术语“界面”包括第一抗原结合多肽中的那些“接触”氨基酸残基(或其他非氨基酸基团,如碳水化合物基团、NADH、生物素、FAD或血红素基团),这些残基与第二抗原结合多肽的界面中的一个或多个“接触”氨基酸残基(或其他非氨基酸基团)相互作用。

[0122] 如本文中使用的,术语“包装说明书”用于表示,在治疗性产品的商业包装中通常包括的说明书,其含有与该治疗性产品的使用相关的适应症、用法、剂量、施用、联合治疗、禁忌和/或警告信息。

[0123] 相对于参考多肽序列的“氨基酸序列同一性百分比(%)”定义为,在比对参考序列和候选序列并且如果必要的话引入空位以实现最大序列同一性百分比后,不考虑任何保守置换作为序列同一性的一部分,候选序列中与参考多肽序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比。用于确定氨基酸序列同一性百分比目的的比对可以以本领域中的多种方式实现,例如,使用公众可得到的计算机软件,如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign(DNASTAR)软件。本领域技术人员可以确定用于比对序列的适当参数,包括在要比较的序列的全长上实现最大对齐所需的任何算法。但是,为了本文的目的,使用序列比较计算机程序ALIGN-2,产生%氨基酸序列同一性值。ALIGN-2序列比较计算机程序由Genentech, Inc. 创造,并且源代码已经在美国版权局,Washington D.C., 20559与用户文档一起提交,其在美国版权登记号TXU510087下登记。ALIGN-2程序可以从Genentech, Inc., South San Francisco, California公开获得,或可以从源代码编译。ALIGN-2程序应该编译以在UNIX操作系统(包括数字UNIX V4.0D)上使用。所有序列比较参数由ALIGN-2程序设定并且不改变。

[0124] 在采用ALIGN-2进行氨基酸序列比较的情况下,如下计算给定氨基酸序列A相对、与,或针对给定氨基酸序列B的%氨基酸序列同一性(其可以可替换地叙述为相对、与,或针对给定氨基酸序列B具有或包含特定%氨基酸序列同一性的给定氨基酸序列A):

[0125] $100 \times \text{分数} X/Y$

[0126] 其中X是在该程序的A和B比对中通过序列比对程序ALIGN-2评分为相同匹配的氨基酸残基的数目,并且其中Y是B中的氨基酸残基的总数。应当理解,在氨基酸序列A的长度不等于氨基酸序列B的长度的情况下,A相对B的%氨基酸序列同一性将不等于B相对A的%氨基酸序列同一性。除非另外特别说明,本文使用的所有%氨基酸序列同一性值如在紧邻的上一段中所述使用ALIGN-2计算机程序获得。

[0127] 如本文中使用的,术语“药物制剂”是指这样的制品,该制品的形式允许包含在其中的活性成分的生物活性是有效的,并且所述制品不含有对所述制剂要施用的受试者具有不可接受的毒性的额外成分。

[0128] 如本文中使用的,“药物学上可接受的载体”表示药物制剂中除了活性成分之外的成分,其对受试者无毒。药物学上可接受的载体包括、但不限于缓冲剂、赋形剂、稳定剂或防腐剂。

[0129] 如本文中使用的,“治疗(treatment)”(及其语法变体,如“治疗(treat)”或“治疗(treating)”)表示,尝试改变所治疗的个体的天然进程的临床干预,并且可以为了预防或在临床病理学进程中执行。期望的治疗效果包括、但不限于:防止疾病的发生或复发,缓解症状,减少疾病的任何直接或间接病理学后果,防止转移,降低疾病进展的速度,改善或减轻疾病状态,以及好转或提高的预后。在某些实施方案中,本发明抗体用于延迟疾病的发展或减缓疾病的进程。

[0130] 药剂(例如,药物制剂)的“治疗有效量”或“有效量”是指,在需要的剂量和持续时间下,能有效实现所需治疗或预防结果的量。例如,但不限于,“治疗有效量”或“有效量”可以指,导致疾病的任何直接或间接病理结果的减少、减缓疾病进展速率、缓解病况、好转或提高的预后、预防疾病的出现或复发、和/或减轻症状的双特异性抗体的剂量。

[0131] 如本文中使用的,术语“约”或“大约”表示,由本领域普通技术人员确定的针对特定值的可接受误差范围内,其部分取决于怎样测量或确定该值,即,测量系统的限制。例如,按照本领域中的实践,“约”可以表示3个标准差或3个以上标准差内。或者,“约”可以表示不超过给定值的20%,优选不超过10%,更优选不超过5%,并且更优选不超过1%的范围。或者,特别是就生物系统或方法而言,该术语可以表示在数量级内,优选在值的5倍以内,并且更优选在2倍以内。

[0132] 除非另外指出,如本文中所述的,任何浓度范围、百分比范围、比例范围或整数范围应理解为包括,所述范围内的任何整数值,并且适用时,包括其分数(如整数的十分之一和百分之一)。

[0133] II. 抗体

[0134] 本发明公开的主题提供了多特异性抗体,例如,双特异性抗体。本发明的多特异性抗体,例如,双特异性抗体,具有至少两个不同的结合特异性。参见,例如,美国专利No.5,922,845和5,837,243;Zeilder(1999) J. Immunol. 163:1246-1252;Somasundaram(1999) Hum. Antibodies 9:47-54;Keler(1997) Cancer Res. 57:4008-4014。在某些实施方案中,本发明公开的多特异性抗体可以结合抗原上的至少两个不同表位或结合抗原上重叠的至少两个表位,例如,双表位抗体。或者,在某些实施方案中,本发明的多特异性抗体可以结合至少两个不同的抗原。

[0135] 如本文中使用的,术语“表位”是指能够特异性结合抗体的蛋白质决定簇。表位通常由分子的化学活性表面基团组成,如氨基酸或糖侧链,并且通常具有特定的三维结构特征,以及特定的电荷特征。可区分构象和非构象表位,在变性剂的存在下抗体与前者但非后者的结合会丧失。

[0136] A. 多特异性抗体

[0137] 本发明公开的主题提供了结合抗原上存在的至少两个表位(例如,重叠或非重叠的表位)的多特异性抗体,例如,双特异性抗体和双表位抗体。本发明公开的主题进一步提供了结合第一抗原上的至少一个表位和第二抗原上的至少一个表位的多特异性抗体。本发明公开的多特异性抗体可以是激动剂抗体或拮抗剂抗体。

[0138] 在某些实施方案中,本发明的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)可以包括一个或多个抗原结合多肽。例如,但不限于,本发明的多特异性抗体可以包括第一抗原结合多肽和第二抗原结合多肽。在某些实施方案中,所述第一抗原结合多肽和第二抗原结合多肽具有不同的结合特异性。例如,但不限于,所述第一抗原结合多肽可以结合抗原上的第一表位,而第二抗原结合多肽可以结合抗原上的第二表位。或者,在某些实施方案中,所述第一抗原结合多肽可以结合第一抗原,而第二抗原结合多肽可以结合第二抗原。

[0139] 在某些实施方案中,并且如图1B中所示的,所述第一抗原结合多肽和/或第二抗原结合多肽可以包括轻链可变区(VL)、重链可变区(VH)、CH1结构域、CH2结构域和/或CH3结构域。在某些实施方案中,所公开的多特异性抗体的抗原结合多肽包括VL、VH、CH1结构域、CH2结构域和/或CH3结构域,其中所述组分相对于彼此以以下顺序从N-末端至C-末端方向放置:VL-接头-VH-CH1-CH2-CH3。在某些实施方案中,所述第一和/或第二抗原结合多肽可以进一步在CH1和CH2结构域之间包括铰链区。

[0140] 在某些实施方案中,抗原结合多肽(例如,第一抗原结合多肽)中存在的VL结构域可以通过接头连接同一抗原结合多肽中存在的VH。例如,但不限于,所述VL结构域的C-末端可以连接VH结构域的N-末端。在某些实施方案中,在本发明的多特异性抗体包括至少两个抗原结合多肽的情况下,每个抗原结合多肽内存在的接头可以是相同的。或者,每个抗原结合多肽内存在的接头可以是不同的。

[0141] 在某些实施方案中,所述接头包括中性、极性或非极性氨基酸。在某些实施方案中,所述接头可以为约1至约100个氨基酸长,例如,约1至50个氨基酸长。例如,但不限于,第一和/或第二抗原结合多肽内存在的接头可以包括约1个或更多个,约2个或更多个,约3个或更多个,约4个或更多个,约5个或更多个,约6个或更多个,约7个或更多个,约8个或更多个,约9个或更多个,约10个或更多个,约15个或更多个,约20个或更多个,约25个或更多个,约30个或更多个,约35个或更多个,约40个或更多个,或约45或更多个氨基酸。接头的非限制性实例公开于Shen等,Anal.Chem.80(6):1910-1917(2008)和WO 2014/087010中,将其内容全部按引用并入本文中。在某些实施方案中,接头是Gly(G)4Ser(S)接头(SEQ ID NO:70)。在某些实施方案中,接头包括GGGGS重复,例如,约2个重复((GGGGS)₂)(SEQ ID NO:73)、约3个重复((GGGGS)₃)(SEQ ID NO:74)、约4个重复((GGGGS)₄)(SEQ ID NO:68)、约5个重复((GGGGS)₅)(SEQ ID NO:75)、约6个重复((GGGGS)₆)(SEQ ID NO:76)或约7个重复((GGGGS)₇)(SEQ ID NO:77)。接头的另外的非限制性实例公开于表7中。在某些实施方案中,所述接头包括SEQ ID NO:68中所列的氨基酸序列。

[0142] 在某些实施方案中,所述接头可以是可断裂的接头,例如,可自断裂、可酶促断裂或可化学断裂的接头。参见W02011/034605,将其全部按引用并入本文中。例如,但不限于,接头的酶断裂可以包括使用内肽酶或外肽酶。内肽酶的非限制性实例包括尿激酶、Lys-C、Asp-N、Arg-C、V8、Glu-C、胰凝乳蛋白酶、胰蛋白酶、胃蛋白酶、木瓜蛋白酶、凝血酶、Genenase、因子Xa、TEV(烟草蚀刻病毒半胱氨酸蛋白酶)、肠激酶、HRV C3(人鼻病毒C3蛋白酶)、ininogenase、枯草芽孢杆菌蛋白酶样前蛋白转化酶(例如,Furin(PC1)、PC2或PC3)和N-精氨酸二碱基转化酶(N-arginine dibasic convertase)。外肽酶的非限制性实例包括羧基肽酶A、羧基肽酶B、羧基肽酶D、羧基肽酶E(也称为羧基肽酶H)、羧基肽酶M、羧基肽酶N或羧基肽酶Z。在某些实施方案中,可以通过使用羟胺、N-氯代琥珀酰亚胺、N-溴代琥珀酰亚

胺或溴化氰,进行化学断裂。

[0143] 表7

[0144]	接头	SEQ ID NO:
	GGGGS	SEQ ID NO: 70
	SGGSGGS	SEQ ID NO: 71
	GGGGSGGGS	SEQ ID NO: 72
	GGGGSGGGGS	SEQ ID NO: 73
	GGGGSGGGGSGGGGS	SEQ ID NO: 74
	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	SEQ ID NO: 68
	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	SEQ ID NO: 75
	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	SEQ ID NO: 76
[0145]	接头	SEQ ID NO:
	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	SEQ ID NO: 77
	EPKSCDKTHTCPPCP	SEQ ID NO: 78
	GGGGSGGGSEPKSCDKTHTCPPCP	SEQ ID NO: 79
	ELKTPGLDTHHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRC PEPKSCDTPPPCPRCP	SEQ ID NO: 80
	GS GSGS	SEQ ID NO: 81
	AAA	SEQ ID NO: 82

[0146] 在某些实施方案中,例如,在本发明的多特异性抗体包括第一抗原结合多肽和第二抗原结合多肽的情况中,所述第一抗原结合多肽和第二抗原结合多肽可以通过一个或多个二硫键相互作用。例如,但不限于,在某些实施方案中,第一和第二抗原多肽的铰链区可以通过一个或多个二硫键(例如,通过2个二硫键)相互作用。

[0147] 在某些实施方案中,多特异性抗体,例如,双特异性抗体,可以在抗体的每个抗原结合多肽内包括杂二聚化结构域,如本文中公开的。在某些实施方案中,所公开的多特异性抗体的第一和第二抗原结合多肽的CH3结构域可以被改变,以促进第一和第二抗原结合多肽的杂二聚化。例如,但不限于,,所述第一和/或第二抗原结合多肽可以包括一个或多个使用杵进臼技术的杂二聚化结构域(参见,例如,美国专利No.5,731,168和8,216,805,将其全部按引用并入本文中),以促进第一抗原结合多肽和第二抗原结合多肽之间的缔合和/或相互作用。

[0148] 在某些实施方案中,所述第一和/或第二抗原结合多肽可以改变,以在抗原结合多肽的表面上产生突起或空穴。例如,但不限于,第一抗原结合多肽可以改变,以在第一抗原结合多肽的表面上产生突起,并且第二抗原结合多肽可以改变,以在第二抗原结合多肽的表面上产生空穴,其中第一抗原结合多肽的突起与第二抗原多肽的空穴相互作用,以促进杂二聚化。在某些实施方案中,本发明的多特异性抗体,例如,双特异性抗体,可以包括第一抗原结合多肽和第二抗原结合多肽,其在界面相互作用,其中所述第一抗原结合多肽在界面具有突起,其可放置在第二抗原结合多肽界面的空穴中。参见,例如,美国专利No.8,216,805,将其内容全部按引用并入本文中。

[0149] 在某些实施方案中,抗原结合多肽中可以经改变来产生突起或空穴的区域可以是CH3结构域的一部分。突起(例如,第一抗原结合多肽的CH3结构域内)可以通过用具有大侧链的氨基酸(例如,精氨酸(R)、苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)或色氨酸(W))替代具有小侧链的氨

氨酸(例如,甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)或缬氨酸(V))来产生。例如,但不限于,可以引入抗原结合多肽中来产生突起(例如,“杵”)的突变可以包括T366W(EU编号)。可以通过用具有较小侧链的氨基酸替代例如具有大侧链的氨基酸来产生与突起相同或相似大小的互补空穴,例如,在第二抗原结合多肽的CH3结构域内。例如,但不限于,可以引入抗原结合多肽中产生空穴(例如,“臼”)的突变可以包括T366S、L368A和/或Y407V(EU编号)。

[0150] 在某些实施方案中,多特异性抗体,例如,双特异性抗体或双表位抗体,可以包括第一抗原结合多肽和第二抗原结合多肽,其中所述第一抗原结合多肽的CH3结构域中的一个或多个氨基酸残基被具有较大侧链体积的一个或多个氨基酸残基替代,以在第一抗原结合多肽的CH3结构域的表面上产生与第二抗原结合多肽的CH3结构域相互作用的突起。在某些实施方案中,所述第二抗原结合多肽的CH3结构域中的一个或多个氨基酸残基被具有较小侧链体积的一个或多个氨基酸残基替代,以在第二抗原结合多肽的CH3结构域的表面上产生与第一抗原结合多肽的CH3结构域相互作用的空穴(参见,例如,图1B)。

[0151] 在某些实施方案中,本发明的多特异性抗体不包括轻链恒定结构域(CL)。或者,本文中公开的多特异性抗体可以包括一个或多个CL结构域。例如,但不限于,在多特异性抗体包括CL结构域的情况下,所述CL结构域通过一个或多个二硫键与CH1结构域相互作用。在某些实施方案中,在本发明的多特异性抗体包括第一抗原结合多肽和第二抗原结合多肽的情况下,所述多特异性抗体可以进一步包括两个CL结构域。在某些实施方案中,CL结构域中的一个与第一抗原结合多肽相互作用,而另一个CL结构域与第二抗原结合多肽相互作用,例如,通过一个或多个二硫键。例如,但不限于,CL结构域可以与抗原结合多肽的CH1结构域相互作用。在某些实施方案中,两个CL结构域可以相同或可以不同。在某些实施方案中,CL结构域不与第一或第二抗原结合多肽共价连接。在某些实施方案中,CL结构域不与CH1结构域共价键合。在某些实施方案中,CL结构域不与VL结构域共价键合。在某些实施方案中,VL和CL是分开的。在某些实施方案中,所述分离可以发生在VL和CL之间的任何连接处。在某些实施方案中,连接处可以在T109(即,CL可以在T109开始,并且VL可以在R108结束)。在某些其他实施方案中,CL可以从V110开始。

[0152] 本发明公开的主题进一步提供拮抗剂和激动剂抗体。例如,但不限于,本发明的激动剂抗体是双表位抗体,其中抗体结合同一抗原上的两个表位。在某些实施方案中,双表位抗体结合的表位在抗原上是非重叠的或至少是部分重叠的。在某些实施方案中,本发明的双表位抗体,例如,激动剂双表位抗体,可以包括第一抗原结合多肽和第二抗原结合多肽,如本文中公开的。在某些实施方案中,第一抗原结合多肽和第二抗原结合多肽具有不同的结合特异性,其中第一抗原结合多肽可以结合抗原上的第一表位,而第二抗原结合多肽可以结合抗原上的第二表位。在某些实施方案中,本发明公开主题的双表位激动剂抗体的抗原结合多肽可以包括VL、接头、VH、CH1结构域、CH2结构域和CH3结构域,其中所述组分相对彼此以以下顺序从N-末端至C-末端方向放置:VL-接头-VH-CH1-CH2-CH3。本发明的激动剂双表位抗体的抗原结合多肽可以进一步在每个多肽内包括杂二聚化结构域,如本文中公开的。在某些实施方案中,通过杵进臼技术来产生杂二聚化结构域。例如,但不限于,第一抗原结合多肽可以具有突起,例如,在其CH3结构域内,和第二抗原结合多肽可以具有空穴,例如,在其CH3结构域内,突起和空穴相互作用来促进杂二聚化。

[0153] 在某些实施方案中,本发明的多特异性激动剂抗体,例如,双表位激动剂抗体,比

亲本单特异性抗体(即,所述双表位激动剂抗体所源自的抗体)的单个或其组合,呈现出更高的激动剂活性。例如,但不限于,本文中公开的双表位激动剂抗体,比具有相同VL和VH序列的单特异性抗体呈现出更高的激动剂活性。在某些实施方案中,本发明的双表位激动剂抗体比具有相同VL、VH、CH1、CH2和/或CH3序列的单特异性抗体呈现出更高的激动剂活性。

[0154] 在某些实施方案中,本发明的多特异性拮抗剂抗体,例如,双表位拮抗剂抗体,比亲本单特异性抗体(即,所述双表位拮抗剂抗体所源自的抗体)的单个或其组合,呈现出更高的拮抗活性。例如,但不限于,本文中公开的双表位拮抗剂抗体,比具有相同VL和VH序列的单特异性抗体呈现出更高的拮抗活性。在某些实施方案中,本发明的双表位拮抗剂抗体,比具有相同VL、VH、CH1、CH2和/或CH3序列的单特异性抗体,呈现出更高的拮抗活性。

[0155] B. 双特异性抗KLB抗体

[0156] 本发明公开的主题进一步提供了结合Klotho- β (KLB)并且可以用来调节FGFR1c/KLB受体复合物活性的多特异性抗体,例如,双特异性和双表位抗体。所公开的抗KLB抗体可以作为FGFR1c/KLB受体复合物的激动剂来起作用,例如,激刺配体的作用和/或激活FGFR1c/KLB受体复合物。

[0157] 本发明公开的主题提供了结合KLB蛋白上存在的至少两个表位的抗KLB抗体,或其抗原结合部分,例如,双特异性或多特异性抗体。例如,但不限于,本发明公开的主题提供了具有针对KLB上存在的第一表位的一个结合位点(例如,抗原结合位点)和针对KLB上存在的第二表位的第二结合位点的双特异性抗体,例如,双表位抗体。在某些实施方案中,本发明公开的主题提供了多特异性抗体,其具有至少三个结合位点。

[0158] 在某些实施方案中,本发明的双特异性抗体结合KLB的糖苷酶样结构域KL1中存在的两个表位。在某些实施方案中,所公开的双特异性抗体结合KLB的糖苷酶样结构域KL2中存在的两个表位。在某些实施方案中,所公开的双特异性抗体结合KLB上存在的两个表位,其中一个表位存在于KL1中,而第二个表位存在于KL2中。

[0159] 在某些实施方案中,本发明的双特异性抗体结合包含氨基酸序列IQFYNKVISSRGFPFENSSSRCSQTQENTECTVCLFLVQKKPLIFLGCC FFSTLVLLLSIAIFQRQKRRKFWKAKNLQHIPLKKGKRVVS (SEQ ID NO:43) 或其片段的KLB片段。

[0160] 在某些实施方案中,本发明的双特异性抗体结合包含氨基酸序列ADSHWRAAERFLQFEIAWFAEPLFKTGDYPAAMREYIASKHRRGLSSALPRLTEAERRLLKGTVDFCALNHFTTRFVMHEQLAGSRYDSDRDI (SEQ ID NO:44) 或其片段的KLB片段。

[0161] 在某些实施方案中,本发明的双特异性抗体结合包含如下氨基酸序列或其片段的KLB片段:FSGDGRAIWSKNPNFTPVNESQLFLYDTFKNFFWIGTGALQVEGSWKKDGKGPSIWDHFIHTHLKNVSSTNGSSDSYIFLEKDLSDLFIVGSFYQFSISWPRLFPDGIPTVANAKGLQYYSTLLDALVLRNIEPIVTLYHWDLPLALQEKYGGWKNDTIIDIFNDYATYCFQMFGDRVKYWITIHNPYLVAWHGYGTGMHAPGEKGNLAAYTVGHNLIIKAHSHVWHNYNTHFRPHQKGWLSITLGSWHIEPNRSENTMDIFKCCQSMVSVLWGFANPIHGDGDYPEGMRKKLFSVLPIFSEAEKHEMRGTADFFAFSFGPNNFKPLNTMAKMGQNVSLNLREALNWIKLEYNNPRILIAENGWFTDSRVKTEDTTAIYMMKNFLSQVLQAIRLDEIRVFGYTAWSLLDGFEWQDAYTIRRGLFYVDFNSKQKERKPKSSAHYYKQIIRENGFSLKESTPDVQGGFPCDFSWGVTESVLKPESVASSPQFSDPHLYVWNATGNRLLHREGEVRLKTRPAQC TDFVNIKKQLEMLARMKVTHYRFALDWASVLPTGNLSAVNRQA (SEQ ID NO:45)。

[0162] 在某些实施方案中,本发明的双特异性抗体结合具有SEQ ID NO:42、43、44和/或

45中所示氨基酸序列的一个或多个KLB片段。例如,但不限于,本发明的双特异性抗KLB抗体可以结合包含SEQ ID NO:45中所示氨基酸序列或其片段的一个KLB片段,并且可以结合包含SEQ ID NO:44中所示氨基酸序列或其片段的第二KLB片段。

[0163] 在某些实施方案中,本发明的双特异性抗体调节KLB/FGFR1c复合物活性,其中复合物的FGFR1c包含氨基酸序列:

[0164] KTVALGSNVEFMCKVYSDPQPHIQWLKHIEVNGSKIGPDNLPHYVQILKTAGVNTTDKEMEVLHLRNVS FEDAGEYTCLAGNSIGLSHHSALWTVLEALEERPAVMT (SEQ ID NO:46) 或其片段。

[0165] 在某些实施方案中,本文中公开的双特异性抗体可以是抗体片段或双链抗体。双链变体是二价的、双特异性抗体,其中VH和VL结构域在单条多肽链上表达,但使用太短的接头以致不允许同一条链上的两个结构域配对,由此迫使这些结构域与另一条链的互补结构域配对并且形成两个抗体(例如,抗原)结合位点(参见,例如,Holliger, P.等(1993) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448;Poljak, R.J.等(1994) Structure 2:1121-1123)。

[0166] 在某些实施方案中,如本文中公开的,双特异性抗KLB抗体是能够以足够的亲和力结合KLB的抗体,使得抗体可以用作诊断剂和/或治疗剂用于靶向KLB。在某些实施方案中,抗KLB抗体与无关的非KLB蛋白的结合程度低于抗体与KLB的结合的约10%,例如,通过放射性免疫测定(RIA)所测量的。

[0167] 在某些实施方案中,本文中公开的抗KLB抗体是指调节KLB/FGFR1c复合物活性的抗体。例如,双特异性抗KLB抗体可以作为激动剂起作用,并且激活KLB/FGFR1c复合物。在某些实施方案中,双特异性抗KLB抗体是将KLB/FGFR1c复合物的活性提高至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、99%或99.9%的抗体。在某些实施方案中,双特异性抗KLB抗体可以是导致KLB/FGFR1c复合物的下游靶标(例如,MAPK和/或ERK)磷酸化的抗体。

[0168] 在某些实施方案中,双特异性抗KLB抗体,或其抗原结合部分,包括重链可变区和轻链可变区。在某些实施方案中,重链可变区包括具有与SEQ ID NO:34、36、38、40或42中所列序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的序列的氨基酸。在某些实施方案中,轻链可变区包括具有与SEQ ID NO:33、35、37、39或41中所列序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的序列的氨基酸。

[0169] 在某些实施方案中,双特异性抗KLB抗体可以包括具有与SEQ ID NO:34中所列序列约95%相同的序列的重链可变区和具有与SEQ ID NO:33中所列序列约95%相同的序列的轻链可变区。

[0170] 在某些实施方案中,双特异性抗KLB抗体可以包括具有与SEQ ID NO:36中所列序列约95%相同的序列的重链可变区和具有与SEQ ID NO:35中所列序列约95%相同的序列的轻链可变区。

[0171] 在某些实施方案中,双特异性抗KLB抗体可以包括具有与SEQ ID NO:38中所列序列约95%相同的序列的重链可变区和具有与SEQ ID NO:37中所列序列约95%相同的序列的轻链可变区。

[0172] 在某些实施方案中,双特异性抗KLB抗体可以包括具有与SEQ ID NO:40中所列序

列约95%相同的序列的重链可变区和具有与SEQ ID NO:39中所列序列约95%相同的序列的轻链可变区。

[0173] 在某些实施方案中,双特异性抗KLB抗体可以包括具有与SEQ ID NO:42中所列序列约95%相同的序列的重链可变区和具有与SEQ ID NO:41中所列序列约95%相同的序列的轻链可变区。

[0174] 在某些实施方案中,双特异性抗KLB抗体包括包含CDR1、CDR2和CDR3结构域的重链可变区以及包含CDR1、CDR2和CDR3结构域的轻链可变区。在某些实施方案中,重链可变区CDR1结构域包括具有SEQ ID NO:3、4、5、6或7中所列序列的氨基酸序列。在某些实施方案中,重链可变区CDR2结构域包括具有SEQ ID NO:8、9、10、11或12中所列序列的氨基酸序列。在某些实施方案中,重链可变区CDR3结构域包括具有SEQ ID NO:13、14、15、16或17中所列序列的氨基酸序列。在某些实施方案中,轻链可变区CDR1结构域包括具有SEQ ID NO:18、19、20、21或22中所列序列的氨基酸序列。在某些实施方案中,轻链可变区CDR2结构域包括具有SEQ ID NO:23、24、25、26或27中所列序列的氨基酸序列。在某些实施方案中,轻链可变区CDR3结构域包括具有SEQ ID NO:28、29、30、31或32中所列序列的氨基酸序列。

[0175] 在某些实施方案中,双特异性抗KLB抗体包括具有SEQ ID NO:7中所列序列的重链可变区CDR1;具有SEQ ID NO:12中所列序列的重链可变区CDR2;具有SEQ ID NO:17中所列序列的重链可变区CDR3;具有SEQ ID NO:22中所列序列的轻链可变区CDR1;具有SEQ ID NO:27中所列序列的轻链可变区CDR2;和具有SEQ ID NO:32中所列序列的轻链可变区CDR3。

[0176] 在某些实施方案中,双特异性抗KLB抗体包括第一抗体或其抗原结合部分、和第二抗体或其抗原结合部分,其中所述第一抗体或其抗原结合部分,和第二抗体或其抗原结合部分,结合KLB上存在的不同表位。例如,但不限于,所述第一抗体或其抗原结合部分可以包括重链可变区和轻链可变区;和第二抗体或其抗原结合部分可以包括重链可变区和轻链可变区。在某些实施方案中,第一和/或第二抗体或其抗原结合部分的重链可变区包括具有与SEQ ID NO:34、36、38、40或42中所列序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的序列的氨基酸。在某些实施方案中,第一和/或第二抗体的轻链可变区,或其抗原结合部分,包括SEQ ID NO:33、35、37、39或41中所列序列的氨基酸。

[0177] 例如,但不限于,双特异性抗KLB抗体可以包括第一抗体或其抗原结合部分,其包含具有与SEQ ID NO:40中所列序列至少95%相同的氨基酸序列的重链可变区和具有与SEQ ID NO:39中所列序列至少95%相同的氨基酸序列的轻链可变区;和第二抗体或其抗原结合部分,其包含具有与SEQ ID NO:42中所列序列至少95%相同的氨基酸序列的重链可变区和具有与SEQ ID NO:41中所列序列至少95%相同的氨基酸序列的轻链可变区。

[0178] 在某些实施方案中,双特异性抗KLB抗体可以包括第一抗体或其抗原结合部分,其包含具有与SEQ ID NO:34中所列序列约95%相同的序列的重链可变区和具有与SEQ ID NO:33中所列序列约95%相同的序列的轻链可变区;和第二抗体或其抗原结合部分,其包含具有与SEQ ID NO:40中所列序列至少95%相同的氨基酸序列的重链可变区和具有与SEQ ID NO:39中所列序列至少95%相同的氨基酸序列的轻链可变区。

[0179] 1. 抗体亲和力

[0180] 在某些实施方案中,本文中提供的多特异性和双特异性抗体可以具有约0.001nM至约1 μ M或约 10^{-8} M至约 10^{-13} M的解离常数(K_d)。例如,但不限于,多特异性抗体,例如,双特异

性抗体,可以具有 $K_d \leq 10\text{nM}$ 、 $\leq 1\text{nM}$ 、 $\leq 0.1\text{nM}$ 、 $\leq 0.01\text{nM}$ 或 $\leq 0.001\text{nM}$ 。在某些实施方案中,多特异性抗体可以具有约 10^{-8}M 或更低、约 10^{-9}M 或更低、约 10^{-10}M 或更低、约 10^{-11}M 或更低、约 10^{-12}M 或更低、或约 10^{-13}M 或更低的 K_d 。

[0181] 在某些实施方案中,可以通过放射性标记的抗原结合测定(RIA)来测量 K_d 。在某些实施方案中,用目标双特异性抗体的 $F(ab)_2$ 形式及其两个抗原来进行RIA。例如,可以通过在滴定系列的未标记抗原的存在下用最小浓度的(^{125}I)-标记的抗原平衡 $F(ab)_2$,然后用抗-Fab抗体包被的平板捕获结合的抗原,来测量 $F(ab)_2$ 对抗原的溶液结合亲和力(参见,例如,Chen等,J.Mol.Biol.293:865-881(1999))。为了建立用于该测定的条件,用50mM碳酸钠(pH9.6)中的 $5\mu\text{g/mL}$ 捕获抗-Fab抗体(Cappel Labs)包被MICROTITER®多孔板(Thermo Scientific)过夜,并且随后用PBS中的2% (w/v)牛血清白蛋白在室温(大约23°C)封闭两小时至五小时。在非吸附板(Nunc#269620)中,将100pM或26pM [^{125}I]-抗原与连续稀释的目标Fab(例如,与Presta等,Cancer Res.57:4593-4599(1997)中抗-VEGF抗体Fab-12的评价相一致)混合。随后将目标Fab孵育过夜;然而,孵育可以持续更长时间段(例如,约65小时),以确保达到了平衡。此后,将混合物转移至捕获平板,在室温下孵育(例如,持续一小时)。随后除去溶液,并且用PBS中的0.1%聚山梨酸酯20(TWEEN-20®)洗涤平板八次。平板干燥时,加入150 μL /孔闪烁剂(MICROSCINT-20™;Packard),并将平板在TOPCOUNT™ γ 计数器(Packard)上计数十分钟。选择产生低于或等于20%最大结合的每个Fab的浓度,用于竞争结合测试中。

[0182] 在某些实施方案中,可以使用BIAcore®表面等离子体共振测定来测量 K_d 。例如,用~10反应单位(RU)的固定化抗原CM5芯片,在25°C,使用BIAcore®-2000或BIAcore®-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)进行测定。在某些实施方案中,根据供应商的说明书,用N-乙基-N'-(3-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺盐酸盐(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺活化羧甲基化葡聚糖生物传感器芯片(CM5, BIAcore, Inc.)。用10mM醋酸钠, pH4.8, 将抗原稀释至 $5\mu\text{g/mL}$ (~0.2 μM),接着以 $5\mu\text{L/分钟}$ 的流速注射,以获得大约10反应单位(RU)的结合蛋白。抗原注射后,注射1M乙醇胺,以阻断未反应的基团。对于动力学测量,在25°C,以大约25 $\mu\text{L/min}$ 的流速,在含有0.05%聚山梨酸酯20(TWEEN-20™)表面活性剂的PBS(PBST)中,注射两倍连续稀释的Fab(0.78nM至500nM)。通过同时拟合结合和解离传感图,使用简单的一对一Langmuir结合模型(BIAcore®评价软件版本3.2)计算结合速率(k_{on})和解离速率(k_{off})。按照 k_{off}/k_{on} 比值计算平衡解离常数(K_d)。参见,例如,Chen等,J.Mol.Biol.293:865-881(1999)。如果通过以上的表面等离子体共振测定,结合速率超过 $10^6\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$,那么可以通过使用荧光淬灭技术来测定结合速率,所述荧光淬灭技术在递增浓度的抗原存在下,在PBS, pH7.2中,在25°C下,测量20nM抗-抗原抗体(Fab形式)的荧光发射强度的增加或降低(激发=295nm;发射=340nm, 16nm带通),如在分光计中测量的,如停流式分光光度计(Aviv Instruments)或具有搅拌比色皿的8000-系列SLM-AMINCO™分光光度计(ThermoSpectronic)。

[0183] 2. 抗体片段

[0184] 在某些实施方案中,本文中提供的抗体是抗体片段。抗体片段包括,但不限于, $F(ab')_2$ 、双链抗体和以下描述的其他片段。对于某些抗体片段的综述,参见Hudson等,Nat.Med.9:129-134(2003)。对于scFv片段的综述,参见,例如,Pluckthün,见:The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, Vol.113, Rosenberg和Moore编辑(Springer-

Verlag, New York), pp. 269-315 (1994); 还可以参见PCT申请No. WO 93/16185; 以及美国专利No. 5,571,894和5,587,458。

[0185] 双链抗体是具有两个抗原结合位点的可以是二价或双特异性的抗体片段。参见, 例如, EP专利申请No. 404,097; PCT申请No. WO 1993/01161; Hudson等, Nat. Med. 9:129-134 (2003); 和Hollinger等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993)。三链抗体和四链抗体也描述于Hudson等, Nat. Med. 9:129-134 (2003)。

[0186] 抗体片段的其他非限制性实例包括Fab、Fab'、Fab'-SH、Fv和scFv片段。单结构域抗体是包括抗体的全部或部分重链可变结构域或全部或部分轻链可变结构域的抗体片段。在某些实施方案中, 单结构域抗体是人单结构域抗体 (Domantis, Inc., Waltham, MA; 参见, 例如, 美国专利No. 6,248,516B1)。

[0187] 对于包括救助受体 (salvage receptor) 结合表位残基并具有提高的体内半衰期的Fab和F(ab')₂片段的讨论, 参见美国专利No. 5,869,046。

[0188] 如本文中所述的, 可以通过各种技术, 包括但不限于完整抗体的蛋白水解消化以及通过重组宿主细胞 (例如, 大肠杆菌或噬菌体) 生产, 来形成抗体片段。

[0189] 3. 嵌合和人源化抗体

[0190] 在某些实施方案中, 本文中提供的多特异性和双特异性抗体是嵌合抗体。某些嵌合抗体描述于例如美国专利No. 4,816,567; 和Morrison等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)。在一个实例中, 嵌合抗体包括非人可变区 (如, 源自小鼠、大鼠、仓鼠、兔或非人灵长类 (如猴子) 的可变区) 和人恒定区。在某些实施方案中, 嵌合抗体可以是“类别转换的”抗体, 其中所述类别或亚类已经相对于亲本抗体改变。嵌合抗体包括其抗原结合片段。

[0191] 在某些实施方案中, 嵌合抗体是人源化抗体。可以将非人抗体人源化, 以降低对人的免疫原性, 同时保持亲本非人抗体的特异性和亲和力。人源化抗体可以包括一个或多个可变结构域, 其中HVR (例如, CDR) 或其部分源自非人抗体, 而FR或其部分源自人抗体序列。人源化抗体任选还可以包括至少一部分的人恒定区。在某些实施方案中, 人源化抗体中的一些FR残基被来自非人抗体 (例如, HVR残基所来源的抗体) 的相应残基取代, 例如, 以恢复或提高抗体特异性或亲和力。

[0192] 人源化抗体及其制备方法综述于例如Almagro和Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008), 并且进一步描述于例如Riechmann等, Nature 332:323-329 (1988); Queen等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10029-10033 (1989); 美国专利No. 5,821,337、7,527,791、6,982,321和7,087,409; Kashmiri等, Methods 36:25-34 (2005) (描述特异性决定区 (SDR) 嫁接); Padlan, Mol. Immunol. 28:489-498 (1991) (描述“表面重塑 (resurfacing)”); Dall'Acqua等, Methods 36:43-60 (2005) (描述“FR改组”); 和Osborn等, Methods 36:61-68 (2005) 和Klimka等, Br. J. Cancer, 83:252-260 (2000) (描述FR改组的“引导选择”方法)。

[0193] 可以用于人源化的人框架区包括但不限于: 使用“最佳匹配” (best-fit) 方法选择的框架区 (参见, 例如, Sims等, J. Immunol. 151:2296 (1993)); 源自特定亚组的轻链或重链可变区的人抗体的共有序列的框架区 (参见, 例如, Carter等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285 (1992); 和Presta等, J. Immunol., 151:2623 (1993)); 人成熟 (体细胞突变) 框架区

或人种系框架区(参见,例如,Almagro和Fransson,Front.Biosci.13:1619-1633(2008));和筛选FR文库产生的框架区(参见,例如,Baca等,J.Biol.Chem.272:10678-10684(1997)和Rosok等,J.Biol.Chem.271:22611-22618(1996))。

[0194] 4. 人抗体

[0195] 在某些实施方案中,本文中提供的多特异性和双特异性抗体是人抗体。可以使用本领域已知的各种技术来产生人抗体。人抗体一般地描述于van Dijk和van de Winkel, Curr.Opin.Pharmacol.5:368-74(2001)和Lonberg, Curr.Opin.Immunol.20:450-459(2008)。

[0196] 可以通过将免疫原给予转基因动物来制备人抗体,所述转基因动物已经改进成可以应答抗原挑战而产生完整的人抗体或具有人可变区的完整抗体。这样的动物通常含有全部或部分的人免疫球蛋白基因座,其替代内源性免疫球蛋白基因座,或其存在于染色体外或随机整合至动物的染色体中。在这样的转基因小鼠中,内源性免疫球蛋白基因座通常已经被灭活。对于从转基因动物获得人抗体的方法的综述,参见,Lonberg,Nat.Biotech.23:1117-1125(2005)。还可以参见,例如,描述XENOMOUSE™技术的美国专利No.6,075,181和6,150,584;描述HUMAB®技术的美国专利No.5,770,429;描述K-M MOUSE®技术的美国专利No.7,041,870;和描述VELOCIMOUSE®技术的美国专利申请公开No.US2007/0061900。可以进一步修饰由这样的动物产生的完整抗体的人可变区,例如,与不同的人恒定区组合。

[0197] 在某些实施方案中,还可以通过基于杂交瘤的方法来制得人抗体。已经描述了用于人单克隆抗体产生的人骨髓瘤和小鼠-人杂交骨髓瘤细胞系(参见,例如,Kozbor, J.Immunol.133:3001(1984);Brodeur等,Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications,pp.51-63(Marcel Dekker,Inc.,New York(1987);和Boerner等, J.Immunol.147:86(1991))。通过人B-细胞杂交瘤技术产生的人抗体还描述于Li等, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 103:3557-3562(2006)。其他方法包括例如美国专利No.7,159,826(描述从杂交瘤细胞系生产单克隆人IgM抗体)和Ni,Xiandai Mianyixue 26(4):265-268(2006)(描述人-人杂交瘤)中描述的那些。人杂交瘤技术(Trioma技术)也描述于 Vollmers和Brandlein,Histology and Histopathology20(3):927-937(2005)以及 Vollmers和Brandlein,Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology 27(3):185-191(2005)中。

[0198] 在某些实施方案中,还可以通过从人衍生的噬菌体展示文库分离选定的Fv克隆可变结构域序列,来产生人抗体。随后将这样的可变结构域序列与所需的人恒定结构域组合。以下描述了用于从抗体文库选择人抗体的技术。

[0199] 5. 文库衍生的抗体

[0200] 本发明的多特异性和双特异性抗体,例如,双特异性抗KLB抗体,可以通过针对所需的一种或多种活性筛选抗体组合文库来分离。例如,但不是限制,用于产生噬菌体文库和筛选该文库以寻找具有所需结合特征的抗体的各种方法是本领域已知的。这样的方法综述于,例如,Hoogenboom等,Methods in Molecular Biology 178:1-37(0'Brien等编辑, Human Press,Totowa,NJ,2001),并进一步描述于例如McCafferty等,Nature 348:552-554;Clackson等,Nature 352:624-628(1991);Marks等,J.Mol.Biol.222:581-597(1992); Marks和Bradbury,Methods in Molecular Biology 248:161-175(Lo编辑,Human Press,

Totowa,NJ,2003);Sidhu等,J.Mol.Biol.338(2):299-310(2004);Lee等,J.Mol.Biol.340(5):1073-1093(2004);Fellouse,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 101(34):12467-12472(2004)和Lee等,J.Immunol.Methods 284(1-2):119-132(2004)。

[0201] 在某些噬菌体展示方法中,VH和VL基因库通过聚合酶链式反应(PCR)分开克隆,且在噬菌体文库中随机重组,随后可以在所述噬菌体文库中筛选抗原结合性噬菌体,如Winter等,Ann.Rev.Immunol.,12:433-455(1994)中所述。噬菌体一般以单链Fv(scFv)片段的形式或以Fab片段形式展示抗体片段。来自免疫来源的文库可以提供针对免疫原的高亲和力和抗体,无需构建杂交瘤。可替代地,可以克隆(例如从人)幼稚库(naive repertoire),不经任何免疫接种,以提供针对广泛的非自身以及自身抗原的单个抗体来源,如Griffiths等,EMBO J,12:725-734(1993)所述的。最后,幼稚文库还可以通过下述方式合成制备:从干细胞中克隆未重排的V基因区段,使用含有随机序列的PCR引物以编码高可变CDR3区,并在体外实现重排,如Hoogenboom和Winter,J.Mol.Biol.,227:381-388(1992)所述的。描述人抗体噬菌体文库的专利公布包括,例如:美国专利No.5,750,373,以及美国专利公布No.2005/0079574,2005/0119455,2005/0266000,2007/0117126,2007/0160598,2007/0237764,2007/0292936和2009/0002360。

[0202] 在本文中从人抗体文库分离的抗体或抗体片段被视为人抗体或人抗体片段。

[0203] 6. 抗体变体

[0204] 在某些实施方案中,本文中提供了所公开抗体的氨基酸序列变体。例如,可能期望通过产生抗体的氨基酸序列变体来提高抗体的结合亲和力和/或其他生物性质。本发明的多特异性抗体(例如,双特异性抗KLB抗体)的氨基酸序列变体可以通过将合适修饰引入编码抗体的核苷酸序列中,或通过肽合成,来进行制备。此类修饰包括例如抗体的氨基酸序列内的残基缺失和/或插入和/或置换。可以制备缺失、插入和置换的任何组合,以获得最终构建体,只要最终构建体具有所需特征,例如抗原结合即可。

[0205] a) 置换、插入和缺失变体

[0206] 在某些实施方案中,提供了具有一个或多个氨基酸置换的抗体变体。用于置换诱变的目的位点包括HVR和FR。保守置换的非限制性实例显示于表1中的标题“优选置换”下。更实质性的变化的非限制性实例在表1中的标题“示例性置换”下提供,并且在下文参考氨基酸侧链种类进一步描述。可以将氨基酸置换引入目的抗体中且就所需活性筛选产物,例如保留/提高的抗原结合、减少的免疫原性或提高的补体依赖性细胞毒性或抗体依赖性细胞介导的细胞毒性。

[0207] 氨基酸可以根据共同的侧链性质进行分组:

[0208] (1) 疏水性:正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile;

[0209] (2) 中性亲水性:Cys、Ser、Thr、Asn、Gln;

[0210] (3) 酸性:Asp、Glu;

[0211] (4) 碱性:His、Lys、Arg;

[0212] (5) 影响链方向的残基:Gly、Pro;

[0213] (6) 芳香族:Trp、Tyr、Phe

[0214] 在某些实施方案中,非保守性置换造成这些类型之一的成员交换为另一类型的成员。

[0215] 表1

[0216]	原始残基	示例性置换	优选置换
	Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
	Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
	Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
	Asp (D)	Glu; Asn	Glu
	Cys (C)	Ser; Ala	Ser
	Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
	Glu (E)	Asp; Gln	Asp
	Gly (G)	Ala	Ala
	His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
	Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 正亮氨酸	Leu
[0217]	原始残基	示例性置换	优选置换
	Leu (L)	正亮氨酸; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
	Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
	Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
	Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
	Pro (P)	Ala	Ala
	Ser (S)	Thr	Thr
	Thr (T)	Val; Ser	Ser
	Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
	Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
	Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 正亮氨酸	Leu

[0218] 在某些实施方案中,一类置换变体涉及置换亲本抗体(例如人源化或人抗体)的一个或多个超变区残基。通常,选择用于进一步研究的所得变体将相对于亲本抗体在某些生物性质上具有改变(例如提高)(例如增加的亲和力、减少的免疫原性),和/或基本上保留亲本抗体的某些生物性质。置换变体的非限制性实例是亲和力成熟抗体,其可以例如使用基于噬菌体展示的亲和力成熟技术,例如本文描述的那些,方便地生成。简而言之,使一个或多个HVR残基突变,并且将变体抗体展示在噬菌体上且筛选特定生物活性(例如结合亲和力)。

[0219] 在某些实施方案中,可以在HVR中作出改变(例如置换),例如以改善抗体亲和力。此类改变可以在HVR“热点”(即,在体细胞成熟过程中高频率经历突变的密码子编码的残基)(参见,例如Chowdhury, Methods Mol. Biol. 207:179-196(2008)),和/或接触抗原的残基中作出,测试所得到的变体VH或VL的结合亲和力。通过构建二级文库且从中再选择而进行的亲和力成熟,已经例如描述于Hoogenboom等, Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien等编辑, Human Press, Totowa, NJ, (2001))。在亲和力成熟的某些实施方案中,可以通过多种方法中的任一种(例如易错PCR、链改组、或寡核苷酸定向诱变),将多样性引

入选择用于成熟的可变基因内。随后制备二级文库。随后筛选文库以鉴定具有所需亲和力的任何抗体变体。引入多样性的另一种方法涉及HVR定向的方法,其中几个HVR残基(例如一次4-6个残基)被随机化。可以特异地鉴定参与抗原结合的HVR残基,例如使用丙氨酸扫描诱变或建模。特别地,常常靶向CDR-H3和CDR-L3。

[0220] 在某些实施方案中,置换、插入或缺失可以在一个或多个HVR内发生,只要此类改变基本上不降低抗体结合抗原的能力即可。例如,可以在HVR中进行基本上不降低结合亲和力的保守性改变(例如,如本文提供的保守性置换)。例如,此类改变可以在HVR中的抗原接触残基外。在上文提供的变体VH和VL序列的某些实施方案中,每个HVR是未改变的,或含有不超过一个、两个或三个氨基酸置换。

[0221] 一种用于鉴定可以作为靶标进行诱变的抗体残基或区域的有用方法称为“丙氨酸扫描诱变”,如Cunningham和Wells(1989) *Science* 244:1081-1085(1989)所述的。在此方法中,鉴定残基或靶标残基组(例如带电荷残基,例如arg、asp、his、lys和glu),并且替换为中性或带负电荷的氨基酸(例如,丙氨酸或聚丙氨酸),以确定抗体与抗原的相互作用是否受影响。可以在对该最初置换显示出功能性敏感的氨基酸位置上引入更多置换。可替代地或另外地,可以利用抗原-抗体复合物的晶体结构,来鉴定在抗体和抗原之间的接触点。此类接触残基和邻近残基可以作为用于置换的候选物被靶向或消除。可以筛选变体,以确定它们是否含有所需性质。

[0222] 氨基酸序列插入可以包括氨基和/或羧基末端融合(长度范围从一个残基到含有一百个或更多个残基的多肽),以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的非限制性实例包括具有N末端甲硫氨酰残基的抗体。抗体分子的其他插入变体包括抗体的N或C末端与酶(例如对于ADEPT)或增加抗体血清半衰期的多肽的融合。

[0223] b) 糖基化变体

[0224] 在某些实施方案中,本文中提供的多特异性和双特异性抗体可以改变,以提高或降低抗体糖基化的程度。对抗体添加或缺失糖基化位点,可以通过改变氨基酸序列从而形成或去除一个或多个糖基化位点而方便地完成。

[0225] 在某些实施方案中,在抗体包含Fc区的情况中,可以改变与之连接的碳水化合物。通过哺乳动物细胞产生的天然抗体通常包含分支的、双叉型寡糖,其一般通过N键连接Fc区的CH2结构域的Asn297(参见,例如,Wright等,TIBTECH 15:26-32(1997))。寡糖可以包括各种碳水化合物,例如甘露糖、N-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)、半乳糖和唾液酸,以及连接在双叉型寡糖结构的“茎”中的GlcNAc上的岩藻糖。在某些实施方案中,可以在本发明的抗体中进行寡糖的修饰,以便产生具有特定提高性质的抗体变体。

[0226] 在某些实施方案中,本文中提供了具有缺乏(直接或间接)连接在Fc区上的岩藻糖的碳水化合物结构的抗体变体。例如,此类抗体中的岩藻糖量可以是约1%至约80%、约1%至约65%、约5%至约65%、或约20%至约40%,以及其间的值。

[0227] 如例如WO 2008/077546中所述的,通过MALDI-TOF质谱法测量,相对于连接Asn297的所有糖结构(例如复杂的、杂合的和高甘露糖的结构)的总和,计算在Asn297的糖链内的岩藻糖的平均量,确定岩藻糖的量。Asn297指位于Fc区的大约位置297上的天冬酰胺残基(Fc区残基的EU编号);然而,由于抗体中的微小序列变异,Asn297也可以位于位置297的上游或下游约 ± 3 个氨基酸处,即位置294和300之间。此类岩藻糖基化变体可以具有改善的

ADCC功能。参见,例如,美国专利公开No.US2003/0157108 (Presta,L.);US2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co.,Ltd)。与“去岩藻糖化的”或“岩藻糖缺陷的”抗体变体有关的出版物实例包括:US2003/0157108;WO 2000/61739;WO 2001/29246;US2003/0115614;US2002/0164328;US2004/0093621;US2004/0132140;US2004/0110704;US2004/0110282;US2004/0109865;WO 2003/085119;WO 2003/084570;WO 2005/035586;WO 2005/035778;WO2005/053742;WO2002/031140;Okazaki等,J.Mol.Biol.336:1239-1249(2004);Yamane-Ohnuki等,Biotech.Bioeng.87:614(2004)。

[0228] 可以在蛋白质岩藻糖基化缺陷的任何细胞系中产生去岩藻糖基化的抗体。所述细胞系实例包括具有蛋白质岩藻糖基化缺陷的Lec13 CHO细胞(Ripka等,Arch.Biochem.Biophys.249:533-545(1986);US专利申请No US2003/0157108A1,Presta,L;和WO 2004/056312 A1,Adams等,尤其是实施例11),和敲除细胞系,例如 α -1,6-岩藻糖基转移酶基因,FUT8,敲除CHO细胞(参见,例如,Yamane-Ohnuki等,Biotech.Bioeng.87:614(2004);Kanda,Y.等,Biotechnol.Bioeng.,94(4):680-688(2006);和WO2003/085107)。

[0229] 进一步提供具有平分型寡糖(bisected oligosaccharide)的抗体变体,例如其中与抗体的Fc区附着的双叉型寡糖通过GlcNAc平分。此类抗体变体可以具有减少的岩藻糖化和/或提高的ADCC功能。此类抗体变体的非限制性实例描述于例如在WO 2003/011878 (Jean-Mairet等);美国专利No.6,602,684 (Umana等);和US2005/0123546 (Umana等)中。还提供在与Fc区附着的寡糖中具有至少一个半乳糖残基的抗体变体。此类抗体变体可以具有提高的CDC功能。此类抗体变体描述于例如WO 1997/30087 (Patel等);WO 1998/58964 (Raju,S.);和WO 1999/22764 (Raju,S.)。

[0230] c)Fc区变体

[0231] 在某些实施方案中,一个或多个氨基酸修饰可以引入本文提供的抗体的Fc区中,从而生成Fc区变体。Fc区变体可以包括包含在一个或多个氨基酸位置上的氨基酸修饰(例如置换)的人Fc区序列(例如人IgG₁、IgG₂、IgG₃或IgG₄ Fc区)。

[0232] 在某些实施方案中,本发明提供具有一些但并非所有效应子功能的抗体变体,这使得其成为用于如下应用的期望候选物,在所述应用中抗体在体内的半衰期是重要的,而一些效应子功能(如补体和ADCC)是不需要的或有害的。可以进行体外和/或体内细胞毒性测定,以证实CDC和/或ADCC活性的降低/耗竭。例如,可以进行Fc受体(FcR)结合测定试验,以确保抗体缺乏Fc γ R结合(从而可能缺乏ADCC活性),但保留FcRn结合能力。用于介导ADCC的主要细胞即NK细胞仅表达Fc γ RIII,而单核细胞表达Fc γ RI、Fc γ RII和Fc γ RIII。在造血细胞上的FcR表达概括在Ravetch和Kinet,Annu.Rev.Immunol.9:457-492(1991)的第464页的表3中。评估目的分子的ADCC活性的体外测定试验的非限制性实例描述于美国专利No.5,500,362中(参见,例如Hellstrom,I.等,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 83:7059-7063(1986));和Hellstrom,I等,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 82:1499-1502(1985);5,821,337(参见Bruggemann,M.等,J.Exp.Med.166:1351-1361(1987))。可替代地,可以采用非放射性测定试验方法(参见例如,用于流式细胞术的ACTITM非放射性细胞毒性测定试验(CellTechnology,Inc.Mountain View,CA);和CytoTox 96®非放射性细胞毒性测定试验(Promega,Madison,WI)。可以用于此类测定试验的效应细胞包括外周血单核细胞(PBMC)和自然杀伤(NK)细胞。可替代地或另外地,目的分子的ADCC活性可以在体内评估,例如在动物

模型中,例如公开于Clynes等,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 95:652-656(1988)中的。还可以进行C1q结合测定试验,以证实抗体不能结合C1q并因此缺乏CDC活性。参见,例如,WO 2006/029879和WO 2005/100402中C1q和C3c结合ELISA。为了评估补体激活,可以进行CDC测定试验(参见,例如,Gazzano-Santoro等,J.Immunol.Methods 202:163(1996);Cragg,M.S.等,Blood 101:1045-1052(2003);以及Cragg,M.S.和M.J.Glennie,Blood 103:2738-2743(2004))。FcRn结合和体内清除率/半衰期确定也可以使用本领域已知的方法进行(参见,例如,Petkova,S.B.等,Int'l Immunol.18(12):1759-1769(2006))。

[0233] 具有降低的效应子功能的抗体包括具有Fc区残基238、265、269、270、297、327和329中的一个或多个的置换的那些(US专利申请No.6,737,056)。此类Fc突变体包括在氨基酸位置265、269、270、297和327的两个或更多个上具有置换的Fc突变体,包括具有残基265和297置换成丙氨酸的所谓“DANA”Fc突变体(美国专利No.7,332,581)。

[0234] 已经描述了具有提高或降低的FcRs结合的特定抗体变体。(参见,例如,美国专利No.6,737,056;WO 2004/056312和Shields等,J.Biol.Chem.9(2):6591-6604(2011))。在某些实施方案中,抗体变体包含具有提高ADCC的一个或多个氨基酸置换的Fc区,例如在Fc区的位置298、333和/或334上的置换(残基的EU编号)。在某些实施方案中,在Fc区中作出改变,以导致改变的(例如提高或降低的)C1q结合和/或补体依赖性细胞毒性(CDC),例如美国专利No.6,194,551,WO 99/51642,和Idusogie等,J.Immunol.164:4178-4184(2000)中所述的。

[0235] 在某些实施方案中,对本文中公开的双特异性抗体的Fc区进行改变,可以产生具有增加的半衰期和提高的新生儿Fc受体(FcRn)结合的变体抗体,所述新生儿Fc受体负责母源IgGs至胎儿的转移(Guyer等,J.Immunol.117:587(1976)和Kim等,J.Immunol.24:249(1994)),描述于US2005/0014934A1中(Hinton等)。那些抗体包含其中具有一个或多个置换的Fc区,所述一个或多个置换提高Fc区与FcRn的结合。此类Fc变体包括在如下Fc区残基的一个或多个上具有置换的那些:238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424或434,例如Fc区残基434的置换(美国专利No.7,371,826)。。

[0236] 关于Fc区变体的其他实例,还参见Duncan&Winter,Nature 322:738-40(1988);美国专利No.5,648,260;美国专利No.5,624,821;和WO 94/29351。

[0237] d) 半胱氨酸工程化抗体变体

[0238] 在某些实施方案中,可能期望制备半胱氨酸工程化抗体,例如“硫代MAb”,其中抗体的一个或多个残基由半胱氨酸残基置换。在某些实施方案中,被置换的残基位于抗体的可接近位点上。通过用半胱氨酸置换那些残基,从而将反应性巯基基团置于抗体的可接近位点上并可以用于使抗体缀合至其他部分例如药物部分或接头-药物部分,以产生免疫缀合物,如本文中描述的。可以如例如美国专利No.7,521,541中所述的,产生半胱氨酸工程化抗体。

[0239] e) 抗体衍生物

[0240] 在某些实施方案中,本文提供的多特异性抗体,例如双特异性抗体可以进一步被修饰,以含有本领域已知的且可容易获得的另外非蛋白质性部分。适于衍生抗体的部分包括但不限于水溶性聚合物。水溶性聚合物的非限制性实例包括但不限于聚乙二醇(PEG)、乙

二醇/丙二醇的共聚物、羧甲基纤维素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚-1,3-二噁烷、聚-1,3,6-三噁烷、乙烯/马来酸酐共聚物、聚氨基酸(同聚物或随机共聚物)和葡聚糖或聚(n-乙烯吡咯烷酮)聚乙二醇、propylene glycol同聚物、环氧丙烷/环氧乙烷共聚物、聚氧乙基化多元醇(例如甘油)、聚乙烯醇,及其混合物。聚乙二醇丙醛,由于其在水中的稳定性,可以在制造中具有优点。聚合物可以具有任何分子量,并且可以是分支或未分支的。连接抗体的聚合物数目可以改变,并且如果连接超过一个聚合物,那么它们可以是相同或不同分子。通常,用于衍生的聚合物的数目和/或类型可以基于如下考虑进行确定,所述考虑包括但不限于待提高的抗体的特定性质或功能,抗体衍生物是否用于在限定条件下的治疗中等。

[0241] 在某些实施方案中,本文中提供了抗体和可以通过暴露于辐射线而被选择性加热的非蛋白质部分的缀合物。在某些实施方案中,非蛋白质部分是碳纳米管(Kam等, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 102:11600-11605(2005))。在某些实施方案中,辐射可以是任何波长,并且包括但不限于,不伤害普通细胞的波长,但其使非蛋白质部分加热至可杀死抗体-非蛋白质部分附近的细胞的温度。

[0242] C.免疫缀合物

[0243] 本发明公开的主题还提供了免疫缀合物,其包括与一种或多种细胞毒性剂缀合的本文中公开的多特异性抗体,例如,双特异性抗体,所述细胞毒性剂如化疗剂或药物、生长抑制剂、蛋白、肽、毒素(例如,蛋白毒素,细菌、真菌、植物或动物来源的酶活性毒素,或其片段)或放射性同位素。例如,所公开主题的抗体或抗原结合部分可以与一个或多个其他结合分子(如,另一个抗体、抗体片段、肽或结合模拟物)在功能上连接(例如,通过化学偶联、基因融合、非共价结合或其他方式)。

[0244] 在某些实施方案中,免疫缀合物是抗体-药物缀合物(ADC),其中抗体与一种或多种药物缀合,所述药物包括但不限于美登素类(maytansinoid)(参见美国专利No.5,208,020、5,416,064和欧洲专利EP 0 425 235B1);auristatin,如单甲基auristatin药物部分DE和DF(MMAE和MMAF)(参见美国专利No.5,635,483和5,780,588,以及7,498,298);多拉司他汀(dolastatin);卡奇霉素或其衍生物(参见美国专利No.5,712,374、5,714,586、5,739,116、5,767,285、5,770,701、5,770,710、5,773,001和5,877,296;Hinman等, Cancer Res.53:3336-3342(1993);和Lode等, Cancer Res.58:2925-2928(1998));蒽环类,如道诺霉素或阿霉素(参见Kratz等, Current.Med.Chem.13:477-523(2006);Jeffrey等, Bioorganic&Med.Chem.Letters 16:358-362(2006);Torgov等, Bioconj.Chem.16:717-721(2005);Nagy等, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 97:829-834(2000);Dubowchik等, Bioorg.& Med.Chem.Letters 12:1529-1532(2002);King等, J.Med.Chem.45:4336-4343(2002);和美国专利No.6,630,579);氨甲喋呤;长春地辛;紫杉烷,如多西紫杉醇、紫杉醇、larotaxel、tesetaxel和ortataxel;单端孢霉烯;和CC1065。

[0245] 在某些实施方案中,免疫缀合物包括与酶活性毒素或其片段缀合的本文中描述的抗体,所述酶活性毒素或其片段包括但不限于白喉A链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素A链(来自绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*))、蓖麻毒素A链、红豆毒素A链、蒴连根毒素A链、 α -帚曲毒素、油桐蛋白、香石竹蛋白、商陆蛋白(PAPI、PAPII和PAP-S)、苦瓜(*Momordica charantia*)抑制剂、泻果素(curcin)、巴豆毒素(crotonin)、肥皂草(*Saponaire*)

officinalis) 抑制剂、白树毒素 (gelonin)、mitogellin、局限曲菌素 (restritocin)、酚霉素 (phenomycin)、伊诺霉素 (enomycin) 和单端孢霉烯类。

[0246] 在某些实施方案中,免疫缀合物包括与放射性原子缀合的本文中所述的多特异性抗体,以形成放射性缀合物。各种放射性同位素可用于放射性缀合物的产生。非限制性实例包括 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 、 Pb^{212} 和Lu的放射性同位素。将放射性缀合物用于检测时,其可以包括用于闪烁法研究的放射性原子,例如, $\text{tc}^{99\text{m}}$ 或 I^{123} ,或用于核磁共振(NMR)成像(也称为磁共振成像,MRI)的自旋标记物,如碘-123、碘-131、铟-111、氟-19、碳-13、氮-15、氧-17、钆、锰或铁。

[0247] 可以使用各种双官能蛋白偶联剂来形成抗体和细胞毒性剂的缀合物,所述偶联剂如N-琥珀酰亚胺-3-(2-吡啶二硫代)丙酸酯(SPDP)、琥珀酰亚胺-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯(SMCC)、亚氨基硫烷(IT)、亚氨酸酯的双官能衍生物(如己二亚胺酸二甲酯盐酸盐)、活性酯(如辛二酸二琥珀酰亚胺酯)、醛(如戊二醛)、双-叠氮化合物(如双(对叠氮基苯甲酰)己二胺)、双-重氮衍生物(如双-(对重氮基苯甲酰)-乙二胺)、二异氰酸酯(如甲苯2,6-二异氰酸酯)以及双活性氟化合物(如,1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。例如,蓖麻毒素免疫毒素可按照Vitetta等,Science 238:1098(1987)中描述的方法来制备。碳-14标记的1-异硫氰酸根并苄基-3-甲基二亚乙基三胺戊酸(MX-DTPA)是用于将放射性核苷酸缀合于抗体的示例性螯合剂。参见W094/11026。接头可以是促使细胞毒性药物在细胞内释放的“可裂解接头”。例如,可以使用酸不稳定性接头、肽酶敏感性接头、光不稳定接头、二甲基接头或含二硫化物的接头(Chari等,Cancer Res.52:127-131(1992))。以上公开了接头的非限制性实例。

[0248] 本文中明确考虑免疫缀合物或ADC,包括但不限于用交联试剂制备的此类缀合物,所述交联试剂包括,但不限于BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、磺基-EMCS、磺基-GMBS、磺基-KMUS、磺基-MBS、磺基-SIAB、磺基-SMCC和磺基-SMPB,以及SVSB(琥珀酰亚胺-(4-乙烯砜)苯甲酸酯),其是商业上可获得的(例如,来自Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A.)。

[0249] IV. 筛选和生产方法

[0250] 可以通过本领域已知的和本文中提供的各种测定来鉴定本发明的多特异性抗体,针对其物理/化学性质和/或生物活性进行筛选或表征。

[0251] A. 多特异性抗体筛选测定

[0252] 在某些实施方案中,本发明的多特异性抗体,例如,双特异性抗体或双表位抗体,可以通过已知方法来鉴定。例如,但不限于,可以使用以上讨论的“杵进臼”杂二聚化技术来鉴定双特异性抗体或双表位抗体。还参见,Ridgway等,Protein Engineering, Vol. 9:7, p617-621(1996); Atwell等,J. Mol. Biol. 270, 26-35(1997); 和Spiess等,Nat. Biotech. 31, 753-759(2013)。

[0253] 本发明公开的主题进一步提供了筛选多特异性抗体的方法,例如,双特异性抗体或双表位抗体。在某些实施方案中,本文中公开的方法可以用于鉴定呈现出激动活性或拮抗活性的多特异性抗体,例如,双特异性或双表位抗体。

[0254] 在某些实施方案中,所述方法包括在一个或多个细胞中表达多特异性抗体。例如,但不限于,多特异性抗体可以包括第一抗原结合多肽、第二抗原结合多肽和CL结构域。第一

抗原多肽和第二抗原结合多肽可以具有不同的结合特异性。例如,但不限于,第一抗原结合多肽可以结合抗原的第一表位,而第二抗原结合多肽可以结合抗原上的第二表位。或者,第一抗原结合多肽可以结合第一抗原,而第二抗原结合多肽可以结合第二抗原。在某些实施方案中,每个抗原结合多肽包括VL、VH、CH1结构域、CH2结构域和CH3结构域,其中这些组分相对于彼此从N-末端到C-末端方向以以下顺序放置:VL-接头-VH-CH1-CH2-CH3。在某些实施方案中,第一和/或第二抗原结合多肽可以进一步包括CH1和CH2结构域之间的铰链区。在某些实施方案中,VL结构域的C-末端可以经由接头连接VH结构域的N-末端。第一和/或第二抗原结合多肽可以进一步包括本文中公开的杂二聚结构域,例如,CH3结构域中的突起或空穴。

[0255] 在某些实施方案中,可以将编码第一抗原结合多肽的核酸,例如,第一核酸,或包括该核酸的载体,引入细胞中。可以将编码第二抗原结合多肽的第二核酸,或包括该第二核酸的载体,引入细胞中。在某些实施方案中,可以将编码CL结构域的第三核酸,或包括该第三核酸的载体,引入细胞中。可以通过本领域已知的任何方法,将核酸引入细胞中。例如,但不限于,可以通过转化或转染,将核酸引入细胞中。

[0256] 所公开方法中使用的细胞可以是本文中公开的任一种细胞,例如,本文中公开的宿主细胞。例如,但不限于,所述细胞可以是原核细胞,例如大肠杆菌(E.coli)。在某些实施方案中,所述细胞是真核细胞,例如,酵母细胞或哺乳动物细胞。在某些实施方案中,所述哺乳动物细胞是中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。

[0257] 在某些实施方案中,所述方法可以进一步包括将获自一个或多个细胞的多特异性抗体接触两个或多个抗原,例如,第一和第二抗原,或同一抗原上存在的两个或多个表位,例如,抗原上的第一和第二表位。在某些实施方案中,两个或多个表位可以是重叠或非重叠。在某些实施方案中,可以将多特异性抗体同时或相继接触两个或更多个抗原或两个或更多个表位。例如,但不限于,可以将多特异性抗体接触两个或更多个抗原或两个或更多个表位中的一个,接着将多特异性抗体接触两个或更多个抗原或两个或更多个表位中的第二个。在将多特异性抗体接触抗原或表位之前,可以(例如从细胞)纯化和/或分离多特异性抗体。例如,但不限于,可以通过色谱方法,例如,通过蛋白A色谱,来纯化多特异性抗体。

[0258] 在某些实施方案中,所述方法可以进一步包括鉴定结合两个或更多个抗原或两个或更多个表位的多特异性抗体。在某些实施方案中,可以通过本领域已知的和本文中公开的任何测定试验来测定结合。例如,但不限于,可以通过ELISA或流式细胞术来测定结合,例如,荧光激活细胞分选(FACS)。

[0259] 在某些实施方案中,用于筛选多特异性抗体的方法包括产生包括多个本文中公开的多特异性抗体的文库。例如,但不限于,所述文库可以包括多个细胞,其中每个细胞表达单个本文中公开的多特异性抗体。在某些实施方案中,文库的每个细胞表达第一抗原结合多肽、第二抗原结合多肽和CL结构域。在某些实施方案中,可以将编码第一抗原结合多肽、第二抗原结合多肽和/或CL结构域的核酸或包括这样的核酸的载体引入细胞中,例如,通过转化或转染来引入。在某些实施方案中,第一抗原结合多肽、第二抗原结合多肽和/或CL结构域中的每一个通过分开的核酸或分开的包括这样的核酸的载体来编码。在某些实施方案中,第一抗原结合多肽和第二抗原结合多肽由第一核酸(或包括第一核酸的第一载体)来编码,而CL结构域由第二核酸(或包括第二核酸的第二载体)来编码。例如,但不限于,本发明

的第一核酸可以包括编码第一抗原结合多肽的开放阅读框 (ORF) 和编码第二抗原结合多肽的 ORF。在某些实施方案中,第二核酸可以包括编码 CL 结构域的 ORF。在某些实施方案中,CL 结构域不由编码第一抗原结合多肽和/或第二抗原结合多肽的同一核酸(或包括该核酸的载体)来编码。

[0260] 所述方法可以进一步包括评价文库内的多个多特异性抗体与抗原上的两个或多个表位(例如,抗原上的第一和第二表位)的结合。替换地或另外地,所述方法可以包括评价文库内的多个多特异性抗体与两个或多个抗原(例如,第一抗原和第二抗原)的结合。在某些实施方案中,可以通过本领域已知的和本文中公开的任一个测定试验来测定结合。所述方法可以进一步包括鉴定结合两个或多个抗原或抗原上的两个或多个表位的多特异性抗体。例如,但不限于,可以使用公开的方法,通过鉴定结合抗原上的两个表位的多特异性抗体来获得双表位抗体。

[0261] 在某些实施方案中,本文中公开的用于筛选多特异性抗体的方法可以进一步包括测定多特异性抗体的活性,例如,通过荧光素酶测定试验。例如,但不限于,所述方法可以包括测定多特异性抗体是否呈现拮抗活性。在某些实施方案中,所述方法可以包括测定多特异性抗体是否呈现激动活性。在某些实施方案中,所述方法可以进一步包括将多特异性抗体的活性与衍生其的亲本单特异性抗体的活性进行比较,以鉴定比单独或组合的亲本单特异性抗体呈现出更高活性(例如,拮抗或激动活性)的多特异性抗体。可以通过本领域已知的和本文中公开的任何活性测定试验来测定多特异性抗体的活性。

[0262] 本发明公开的主题进一步提供了使用本文中公开的筛选方法鉴定双表位抗体的方法。例如,但不限于,所公开的筛选方法可以用于鉴定呈现出拮抗或激动活性的双表位抗体。在某些实施方案中,所公开的筛选方法可以用于鉴定呈现出激动活性的双表位抗体。在某些实施方案中,使用所公开的方法鉴定的双表位抗体呈现出高于用于衍生该双表位抗体的亲本单特异性抗体(单独或组合)的激动活性。在某些实施方案中,使用所公开的方法鉴定的双表位抗体呈现出高于具有相同 VL 和 VH 序列的单特异性抗体的激动活性。在某些实施方案中,本发明的双表位抗体呈现出高于具有相同 VL、VH、CH1、CH2 和/或 CH3 序列(例如,双表位抗体的抗原结合多肽之一)的单特异性抗体的激动活性。

[0263] 在某些实施方案中,用于鉴定双表位激动剂抗体的方法可以包括在一个或多个细胞中表达多特异性抗体,例如,双特异性或双表位抗体。例如,但不限于,所述多特异性抗体可以包括第一抗原结合多肽、第二抗原结合多肽和 CL 结构域,如本文中公开的。在某些实施方案中,第一抗原结合多肽结合抗原上的第一表位,而第二抗原结合多肽结合抗原上的第二表位。在某些实施方案中,第一抗原结合多肽具有与第一单特异性抗体相同的结合特异性和/或相同 VL 和 VH 序列,并且第二抗原结合多肽具有与第二单特异性抗体相同的结合特异性和/或相同 VL 和 VH 序列。

[0264] 所述方法可以进一步包括将获自一个或多个细胞的多特异性抗体(例如,双特异性或双表位抗体)接触同一目标抗原上存在的两个表位,例如,抗原上的第一和第二表位。例如,但不限于,可以将多特异性抗体接触两个表位中的一个,接着将多特异性抗体接触两个表位中的第二个。如上所示,可以在接触两个表位前,将多特异性抗体(例如,双特异性或双表位抗体)纯化。在某些实施方案中,所述方法可以进一步包括鉴定结合两个目标表位的多特异性抗体。可以通过本领域已知的和本文中公开的任何测定试验来测定与表位的结

合。

[0265] 在某些实施方案中,所述方法可以进一步包括测定所鉴定的结合两个表位的双表位抗体的活性。例如,但不限于,所述方法可以包括测定双表位抗体是否呈现激动活性。可以通过本领域已知的和本文中公开的任一活性测定试验来测定双表位抗体的激动活性。在某些实施方案中,可以通过将抗原(例如,受体)接触双表位抗体并分析双表位抗体是否导致与该受体相关的信号途径的激活来测定双表位抗体的激动活性。例如,但不限于,可以通过使用体外基于报告分子的测试,例如,荧光素酶测试,来测定激动活性,其中受体(例如,抗原)的激活导致报告分子(例如,荧光素酶)的表达。替换地或另外地,可以通过使用体外细胞测定试验来测定激动活性,其中受体(例如,抗原)的激活导致由受体调节的信号途径的激活,通过分析受体的信号途径的下游靶标(例如,蛋白)的表达、活性和/或磷酸化来测定。

[0266] 在某些实施方案中,所述方法可以进一步包括将双表位抗体的激动活性与(单独或组合的)单特异性亲本抗体(例如,用于衍生双表位抗体的抗体)的激动活性进行比较,鉴定呈现出高于单特异性亲本抗体的激动活性的双表位抗体。例如,但不限于,所述方法可以进一步包括使用用于测定双表位抗体的激动活性的相同技术来测定双表位激动剂抗体的单特异性亲本抗体(例如,单独或组合)的激动活性,以比较双表位抗体和单特异性抗体的激动活性。

[0267] 在某些实施方案中,第一抗原结合多肽的VL、VH、CH1、CH2和/或CH3结构域具有与第一亲本单克隆抗体的VL、VH、CH1、CH2和/或CH3结构域相同的序列。在某些实施方案中,第二抗原结合多肽的VL、VH、CH1、CH2和/或CH3结构域可以具有与第二亲本单克隆抗体的VL、VH、CH1、CH2和/或CH3结构域相同的序列。所公开的方法可以允许通过具有两个亲本单克隆(例如,单特异性)抗体的结合特异性的两个抗原结合多肽的配对来鉴定多特异性抗体,例如,双特异性抗体和双表位抗体。在某些实施方案中,通过所公开的筛选测定试验鉴定的多特异性抗体呈现出高于亲本抗体(例如,单特异性抗体)(单独或组合)的结合亲和力和/或活性,例如,激动活性。因此,本发明公开的方法提供了用于配对筛选单特异性抗体的VL和VH区来鉴定多特异性抗体(例如,双特异性或双表位抗体)的通量方法。在某些实施方案中,通过所公开的筛选方法鉴定的多特异性抗体(例如,双特异性或双表位抗体)可以制备成不同的抗体形式。例如,但不限于,通过所公开的方法鉴定的多特异性抗体(例如,双特异性或双表位抗体),可以重新格式化全抗体形式,例如,IgG同种型的。

[0268] 在某些实施方案中,多特异性抗体、双特异性抗体或双表位抗体结合的抗原是受体。在某些实施方案中,所述抗原在生物复合物中。例如,但不限于,受体存在于生物复合物内,例如,在与一种或多种共受体和/或蛋白的复合物中。

[0269] B. 结合测定试验和其他测定试验

[0270] 在某些实施方案中,可以通过已知方法,如酶联免疫吸附测试(ELISA)、放射性免疫测试(RIA)或Western印迹测试,来测试本发明抗体的抗原结合活性。这些测试中的每一种通常通过使用目标复合物特异性的标记试剂(例如,抗体)来检测特定感兴趣的蛋白-抗体复合物的存在。

[0271] 在某些实施方案中,可以使用例如识别并特异性地结合抗原(例如,KLB)-抗体复合物的酶联抗体或抗体片段来检测抗原(例如,KLB)-抗体复合物。或者,可以使用各种其他

免疫测试中的任一种来检测复合物。例如,可以将抗体放射性地标记并用于放射性免疫测试(RIA)中(参见,例如,Weintraub,B.,Principles of Radioimmunoassays,Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques,The Endocrine Society,1986年3月,将其按引用并入本文中)。可以通过诸如使用盖氏计数器或闪烁计数器或通过放射自显影术等方式来检测放射性同位素。

[0272] 在某些实施方案中,竞争测定试验可以用于鉴定与本发明公开主题的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)竞争的抗体。用于作图与抗体结合的表位的详细示例性方法提供于Morris(1996)“Epitope Mapping Protocols,”见Methods in Molecular Biology vol.66(Humana Press,Totowa,NJ)。在竞争测试的非限制性实例中,可以在包括结合抗原(例如,KLB)的第一标记抗体和待测试其与第一抗体竞争结合抗原(例如,KLB)的能力的第二未标记抗体的溶液中,孵育固定化的抗原(例如,KLB)。第二抗体可以存在于杂交瘤上清液中。作为对照,在包括第一标记抗体但不包括第二未标记抗体的溶液中孵育固定的抗原(例如,KLB)。在允许第一抗体与抗原(例如,KLB)结合的条件下孵育后,除去过量未结合的抗体,并且测量结合固定抗原(例如,KLB)的标记量。如果结合固定抗原(例如,KLB)的标记量在测试样品中相对于对照样品中实质性地降低,那么表明第二抗体与第一抗体竞争结合抗原(例如,KLB)。参见Harlow和Lane(1988)Antibodies:A Laboratory Manual ch.14(Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,NY)。

[0273] 在某些实施方案中,可以使用流式细胞术测定多特异性抗体(例如,双特异性抗体)与细胞(例如,表达抗体的抗原的293T细胞)的结合。例如,但不是限制,可以将表达抗原或表位(例如,KLB的表位)的细胞系与各种浓度的双特异性抗体在含有0.1% BSA和10%胎牛血清的PBS中混合,并且在37℃下孵育1小时。洗涤后,将细胞与荧光素-标记的抗人IgG抗体反应,其中反应条件与用于一抗染色的条件相同。随后可以通过FACSscan仪器来分析样品,使用光和侧向散射特性来门控单细胞。(附加或替代)流式细胞术测定试验,可以使用利用荧光显微镜术的备选测定试验。可以完全如上所述将细胞染色,并通过荧光显微镜来检查。这种方法允许可视化单细胞并分析抗原在细胞中的位置。

[0274] 可以通过Western印迹进一步测试本发明的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)与抗体的表位或抗原的反应性。例如,并不是限制,可以制备表达目标抗原(例如,KLB)的细胞的细胞提取物,并进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳后,将分开的抗原转移至硝基纤维素膜,用10%胎牛血清阻断,并用待测试的单克隆抗体探测。可以使用抗人IgG碱性磷酸酶并用BCIP/NBT底物片显色(Sigma Chem.Co.,St.Louis,MO)来检测双特异性抗体结合。

[0275] C. 活性测定试验

[0276] 本发明公开内容提供了用于鉴定具有生物活性的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)的测定试验。例如,并不是限制,本发明公开内容提供了用于鉴定具有生物活性的多特异性抗体(例如,抗KLB抗体)的测定试验。例如,并不是限制,抗KLB抗体的生物活性可以包括,例如,激活KLB/FGFR1c受体复合物。还提供了具有这样的体内和/或体外生物活性的抗体。在某些实施方案中,所述测试可以包括使本发明的双特异性抗体结合表达KLB的细胞,例如293T细胞,并分析KLB-FGFR1受体复合物的一个或多个下游靶标(例如,ERK)的活性和/或磷酸化状态。在某些实施方案中,所述测试可以包括将本发明的双特异性抗体施用于

受试者,例如,非人动物,并且分析抗体对受试者的葡萄糖水平的影响。

[0277] D.生产方法

[0278] 可以使用本领域任何可利用或已知的技术来生产本文中公开的多特异性、双特异性和双表位抗体。例如,但不是限制,可以使用重组方法和组合物来生产抗体,例如,如美国专利No.4,816,567中所述的。产生双特异性抗体(例如,抗KLB双特异性抗体)的详细程序描述于以下的实施例中。

[0279] 在某些实施方案中,用于制备双特异性、双表位和/或多特异性抗体的技术包括,但不限于,具有不同特异性和杂二聚化结构域(例如,使用“杵进臼”工程化产生)(参见,例如,美国专利No.5,731,168)的两个免疫球蛋白重链-轻链对(例如以VLfH形式)的重组共表达(参见Milstein和Cuellar, *Nature* 305:537 (1983))、PCT专利申请No.WO 93/08829和Traunecker等, *EMBO J.* 10:3655 (1991))。“杵进臼”技术目的在于通过将突变引入CH3结构域中来修饰接触界面,从而迫使两条不同的抗体重链配对。在一条重链中,一个或多个原始氨基酸可以被具有短侧链的氨基酸替代,以形成“臼”或“空穴”。在某些实施方案中,臼突变可以包括T366S、L368A和/或Y407V中的一个或多个(EU编号)。相反,将具有大侧链的一个或多个氨基酸引入第二抗体重链的CH3结构域中,以形成“杵”。在某些实施方案中,杵突变可以包括T366W(EU编号)。通过共表达这两条重链(和两条相同的轻链,其适用于此两条重链),观察到杂二聚体形式(“杵-臼”)相对于同型二聚体形式(“臼-臼”或“杵-杵”)的高产量(参见Ridgway, *Protein Eng.* 9(1996)617-621;和WO 96/027011)。在两条重链各自与不同的或关连的轻链配对的情况中,也已经使用了杵进臼技术。例如,但不限于,两个重链/轻链对可以在分开的细胞中各自产生和折叠,纯化并在体外装配形成杵进臼双特异性抗体。参见,例如,WO 2012/106587、WO 2011/133886和WO 2013/055958,将其内容全部按引用并入本文中。还可以参见本发明的实施例2。以下公开了可以引入所公开抗体的Fc区中以促进两条重链杂二聚化的其他突变。

[0280] 在某些实施方案中,相对于同型二聚体而言强偏好于形成杂二聚体的其他杂二聚化结构域,可并入所公开的多特异性抗体中,例如,用于在体外或体内产生这样的抗体。这样的杂二聚化结构域的非限制性实例公开于WO 2007/147901(描述离子相互作用)、WO 2009/089004(描述静电转向效应)、WO 2010/034605(描述卷曲螺旋)、将其内容全部按引用并入本文中。还可以参见描述了亮氨酸拉链的Pack和Plueckthun, *Biochemistry* 31:1579-1584 (1992)和描述了螺旋-转角-螺旋基序的Pack等, *Bio/Technology* 11:1271-1277 (1993)。在某些实施方案中,本文中公开的多特异性抗体可以包括一个或多个杂二聚化结构域,例如以促进多特异性抗体的第一抗原结合多肽和第二抗原结合多肽之间的相互作用,产生杂二聚体。可以用于在本发明抗体中(例如,抗体的第一和/或第二抗原结合多肽中)产生杂二聚化结构域的其他非限制性技术实例包括,第一抗原结合多肽链中的F405L和第二抗原结合多肽链中的K409R(Labrijn等, *Efficient generation of stable bispecific IgG1 by controlled Fab-arm exchange. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 110:5145-5150 (2013));第一抗原结合多肽链中的T350V、L351Y、F405A和Y407V以及第二抗原结合多肽链中的T350V、T366L、K392L和T394W(Kreidenstein等, *Improving biophysical properties of a bispecific antibody scaffold to aid developability: quality by molecular design. MAbs* 5:646-654 (2013));第一抗原结合多肽链中的K409D和K392D以及

第二抗原结合多肽链中的D399K和E356K (Gunasekaran等, Enhancing antibody Fc heterodimer formation through electrostatic steering effects: applications to bispecific molecules and monovalent IgG. *J. Biol. Chem.* 285:19637-19646 (2010)); 第一抗原结合多肽链中的D221E、P228E和L368E以及第二抗原结合多肽链中的D221R、P228R和K409R (Strop等, Generating Bispecific Human IgG1 and IgG2 Antibodies from Any Antibody Pair. *J. Mol. Biol.* 420:204-219 (2012)); IgG/A嵌合体 (Davis, J. H等, SEEDbodies: fusion proteins based on strand-exchange engineered domain (SEED) CH3 heterodimers in an Fc analogue platform for asymmetric binders or immunofusions and bispecific antibodies. *Protein Eng. Des. Sel.* 23:195-202 (2010)); 第一或第二抗原结合多肽链之一中的H435R (US2014/0248664A1); 第一抗原结合多肽链中的Y349C、K360E和K409W以及第二抗原结合多肽链中的S354C、Q347R、D399V和F405T (Choi等, Crystal structures of immunoglobulin Fc heterodimers reveal the molecular basis for heterodimer formation. *Mol. Immunol.* 65:377-383 (2015)); 以及第一抗原结合多肽链中的S364H和F405A和第二抗原结合多肽链中的Y349T和T394F (Moore等, A novel bispecific antibody format enables simultaneous bivalent and monovalent co-engagement of distinct target antigens. *MAbs* 3:546-557 (2011))。

[0281] 还可以通过以下方式来制得本发明的多特异性、双表位和双特异性抗体: 工程化引入用于制备抗体Fc-杂二聚分子的静电导向效应 (WO 2009/089004A1); 交联两个或更多个抗体或片段 (参见, 例如, 美国专利No. 4,676,980和Brennan等, *Science*, 229:81 (1985)); 使用亮氨酸拉链来产生双特异性抗体 (参见, 例如, Kostelny等, *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992)); 使用“双链抗体”技术用于制备双特异性抗体片段 (参见, 例如, Hollinger等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)); 和使用单链Fv (sFv) 二聚体 (参见, 例如, Gruber等, *J. Immunol.*, 152:5368 (1994)); 和制备三特异性抗体, 例如Tutt等, *J. Immunol.* 147:60 (1991)中所述的。

[0282] 还可以使用化学技术 (参见, 例如, Kranz (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:5807)、“多瘤”技术 (参见美国专利4,474,893) 或重组DNA技术来制得本发明的双特异性和多特异性分子。还可以使用本领域已知的和本文中所述的方法, 通过缀合结合特异性组分 (例如, 第一表位和第二表位结合特异性) 来制备本发明的双特异性和多特异性分子。例如, 可以分开产生双特异性和多特异性分子的每个结合特异性, 并且随后缀合在一起。当结合特异性是蛋白或肽时, 各种偶联剂或交联剂可以用于共价缀合。交联剂的实例包括蛋白A、碳二亚胺、N-琥珀酰亚胺-S-乙酰基-硫代乙酸酯 (SATA)、N-琥珀酰亚胺-3-(2-吡啶基二硫) 丙酸酯 (SPDP) 和磺基琥珀酰亚胺4-(N-马来酰亚胺甲基) 环己烷-1-羧酸酯 (磺基-SMCC) (参见, 例如, Karpovsky (1984) *J. Exp. Med.* 160:1686; Liu (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:8648)。其他方法包括Paulus (Behring Ins. Mitt. (1985) No. 78, 118-132; Brennan等 (1985) *Science* 229:81-83), Glennie (1987) *J. Immunol.* 139:2367-2375) 中所述的那些。当结合特异性是抗体 (例如, 两个人源化抗体) 时, 它们可以通过两条重链的C-端铰链区的巯基键合来缀合。铰链区可以在缀合前修饰, 以含有奇数个巯基残基, 例如, 一个。

[0283] 在某些实施方案中, 可以在同一载体中编码两个结合特异性并且在同一宿主细胞中表达和装配。在双特异性和多特异性分子是MAB×MAB、MAB×Fab、Fab×F(ab')₂或配体×

Fab融合蛋白的情况中,这种方法特别有用。本发明的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)可以是单链分子,如单链双特异性抗体、包括一个单链抗体和结合决定簇的单链双特异性分子,或包括两个结合决定簇的单链双特异性分子。双特异性和多特异性分子还可以是单链分子或可以包括至少两个单链分子。用于制备双特异性和多特异性分子的方法描述于例如美国专利号No.5,260,203;美国专利号No.5,455,030;美国专利号No.4,881,175;美国专利号No.5,132,405;美国专利号No.5,091,513;美国专利号No.5,476,786;美国专利号No.5,013,653;美国专利号No.5,258,498;和美国专利号No.5,482,858中。本文中还包括具有三个或更多个功能性抗原结合位点(例如,表位结合位点)的工程化抗体,包括“章鱼抗体”(参见,例如,US2006/0025576A1)。

[0284] 在某些实施方案中,可以使用动物系统来产生所公开的抗体。一种用于制备杂交瘤的动物系统是鼠系统。在鼠中产生杂交瘤是非常成熟的程序。用于分离用于融合的免疫脾细胞的免疫方案和技术是本领域已知的。融合配偶体(例如,鼠骨髓瘤细胞)和融合程序也是已知的(参见,例如,Harlow和Lane(1988),Antibodies,A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor New York)。

[0285] 本发明公开的主题进一步提供了编码本文中公开的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)的分离核酸。例如,分离的核酸可以编码多特异性抗体的第一抗原结合多肽和/或第二抗原结合多肽。在某些实施方案中,第一抗原结合多肽和第二抗原结合多肽由两个不同的核酸编码。在某些实施方案中,本发明公开的主题还提供编码CL结构域(例如, κ CL结构域)的分离核酸。

[0286] 在某些实施方案中,分离的核酸可以编码包括抗体的VL的氨基酸序列和/或包括抗体的VH的氨基酸序列,例如,抗体的轻链和/或重链。在某些实施方案中,分离的核酸可以包括编码具有SEQ ID NO:34、36、38和42中所列序列的重链可变区氨基酸序列的核苷酸序列,和/或编码具有SEQ ID NO:33、35、37、39和41中所列序列的轻链可变区氨基酸序列的核苷酸序列。在某些实施方案中,核酸可以存在于一个或多个载体,例如,表达载体中。

[0287] 如本文中使用的,术语“载体”是指能够运送已经与其连接的另一个核酸的核酸分子。一种类型的载体是“质粒”,其是指其中可以连接另外的DNA区段的环状双链DNA环。另一种类型的载体是病毒载体,其中可以将另外的DNA区段连接至病毒基因组中。某些载体能够在引入它们的宿主细胞中自主复制(例如,具有细菌复制起点的细菌载体和附加体哺乳动物载体)。其他载体(例如,非附加体哺乳动物载体)在引入宿主细胞中时整合至宿主细胞的基因组中,并且由此与宿主基因组一起复制。此外,某些载体、表达载体,能够指引与其可操作地连接的基因的表达。通常,在重组DNA技术中有用的表达载体常常是质粒(载体)形式。然而,所公开的主题旨在包括其他形式的表达载体,如起等同作用的病毒载体(例如,复制缺陷型逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒)。

[0288] 在某些实施方案中,编码多特异性抗体的核酸和/或包括该核酸的一个或多个载体可以引入(例如,转化至)宿主细胞中。在某些实施方案中,可以用以下的载体转化宿主细胞:(1)包括编码包含第一抗原结合多肽的氨基酸序列的核酸的第一载体;(2)包括编码包含第二抗原结合多肽的氨基酸序列的核酸的第二载体;和(3)包括编码包含抗体的CL结构域的氨基酸序列的核酸的第三载体。

[0289] 在某些实施方案中,宿主细胞可以包括以下的载体,例如,已经用以下的载体转

化：(1) 包括编码包含抗体的VL的氨基酸序列和包含抗体的VH的氨基酸序列的核酸的载体，或(2) 包括编码包含抗体的VL的氨基酸序列的核酸的第一载体和包括编码包含抗体的VH的氨基酸序列的核酸的第二载体。

[0290] 在某些实施方案中，制备多特异性抗体的方法可以包括在适于抗体表达的条件下培养宿主细胞，在所述宿主细胞中已经引入了一个或多个编码抗体或抗体特定组分的核酸，所述组分例如为第一抗原结合多肽、第二抗原结合多肽和/或CL结构域，和任选从宿主细胞和/或宿主细胞培养基回收抗体。在某些实施方案中，可以通过裂解宿主细胞，从宿主细胞回收抗体。可替换地，抗体从宿主细胞分泌，并且从宿主细胞培养基回收。在某些实施方案中，通过色谱技术，从宿主细胞（例如，宿主细胞裂解物）或宿主细胞培养基回收抗体。

[0291] 对于本发明抗体的重组生产，分离例如如上所述的编码抗体的核酸并插入一个或多个载体中，用于进一步克隆和/或在宿主细胞中表达。这样的核酸可以使用常规程序（例如，通过使用能够特异性地结合编码抗体的重链和轻链的基因的寡核苷酸探针）容易地分离和测序。

[0292] 用于抗体编码载体的克隆或表达的合适宿主细胞包括本文中所述的原核或真核细胞。例如，可以在细菌中生产抗体，特别是不需要糖基化和Fc效应子功能时。对于抗体片段和抗原结合多肽在细菌中的表达，参见，例如，美国专利No. 5,648,237、5,789,199和5,840,523。（还可以参见Charlton, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C.Lo等, Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254, 描述了抗体片段在大肠杆菌中的表达）。表达后，可以以可溶性级分从细菌细胞浆中分离抗体并可以进一步纯化。在某些实施方案中，宿主细胞是大肠杆菌。

[0293] 除了原核生物，真核微生物，如丝状真菌或酵母，是用于抗体编码载体的合适克隆或表达宿主，包括其糖基化途径已经被“人源化”的真菌和酵母株，从而导致具有部分或完全人糖基化模式的抗体的产生。参见Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004)，和Li等, *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006)。用于糖基化抗体表达的合适宿主细胞也可以源自多细胞生物体（无脊椎动物和脊椎动物）。无脊椎动物细胞的实例包括植物和昆虫细胞。已经鉴定出许多可以结合昆虫细胞一起使用的杆状病毒株，特别是用于草地贪夜蛾（*Spodoptera frugiperda*）细胞转染的杆状病毒株。

[0294] 在某些实施方案中，可以将植物细胞培养物用作宿主细胞。参见，例如，美国专利No. 5,959,177、6,040,498、6,420,498、7,125,978和6,417,429（描述用于在转基因植物中产生抗体的PLANTIBODIES™技术）。

[0295] 在某些实施方案中，脊椎动物细胞也可以用作宿主。例如，适于在悬浮液中生长的哺乳动物细胞系可以是有用的。有用的哺乳动物细胞系的其他实例是被SV40 (COS-7) 转化的猴肾CV1系；人胚肾系（293或293细胞，例如，如Graham等, *J. Gen. Virol.* 36:59 (1977) 中所述的；幼仓鼠肾细胞（BHK）；小鼠塞尔托利细胞（例如，Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980) 中所述的TM4细胞）；猴肾细胞（CV1）；非洲绿猴肾细胞（VERO-76）；人宫颈癌细胞（HELA）；犬肾细胞（MDCK）；Buffalo大鼠肝细胞（BRL 3A）；人肺细胞（W138）；人肝细胞（Hep G2）；小鼠乳房肿瘤（MMT 060562）；TRI细胞，如例如Mather等, *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982) 中所述的；MRC5细胞；和FS4细胞。其他有用的哺乳动物宿主细胞系包括中国仓鼠卵巢（CHO）细胞，包括DHFR⁻CHO细胞（Urlaub等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216

(1980));和骨髓瘤细胞系,如Y0、NS0和Sp2/0。对于适用于抗体生产的某些哺乳动物宿主细胞系的综述,参见,例如,Yazaki和Wu,Methods in Molecular Biology,Vol.248(B.K.C.Lo等,Humana Press,Totowa,NJ),pp.255-268(2003)。

[0296] IV.使用方法

[0297] 本发明公开的主题进一步提供了使用所公开的多特异性和双特异性抗体的方法。在某些实施方案中,所公开的方法涉及本发明公开的抗体的治疗用途。在某些实施方案中,所公开的方法涉及所公开的抗体在诊断方法中的用途。

[0298] A. 治疗方法

[0299] 在某些实施方案中,本发明公开主题的一个或多个抗体可以用于治疗受试者的疾病。在某些实施方案中,治疗个体的方法包括将治疗有效量的本文中公开的抗体施用于个体。在某些实施方案中,所述方法可以进一步包括将治疗有效量的至少一种其他治疗剂施用于受试者。以下描述了其他治疗剂(例如,第二治疗剂)的非限制性实例。

[0300] 在某些实施方案中,所述疾病是代谢病症。代谢病症的非限制性实例包括,但并不限于,多囊性卵巢综合征(PCOS)、代谢综合征(MetS)、肥胖、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、非酒精性脂肪肝病(NAFLD)、高血脂、高血压、2型糖尿病、非2型糖尿病、1型糖尿病、隐匿性自身免疫性糖尿病(LAD)、青年发病的成年型糖尿病(MODY)、以及衰老和相关疾病,如阿尔茨海默病、帕金森病和ALS。

[0301] 在某些实施方案中,本发明公开的主题提供了治疗免疫相关疾病或病症的方法,如自身免疫疾病或病症和炎性疾病。在某些实施方案中,所述方法包括将本发明的抗体或包含所述抗体的药物组合物施用于需要的受试者。免疫相关疾病或病症的非限制性实例包括全身性红斑狼疮、类风湿性关节炎、牛皮癣性关节炎、骨关节炎、青少年慢性关节炎、脊柱关节病、系统性硬化病、特发性炎性肌病、Sjögren's综合征、系统性血管炎、结节病、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性血小板减少症、甲状腺炎、糖尿病、I型或II型糖尿病、免疫介导的肾病、中枢和外周神经系统的脱髓鞘疾病(如多发性硬化、特发性脱髓鞘性多发性神经病或Guillain-Barré综合征和慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病)、肝胆疾病(如传染性自身免疫性慢性活动性肝炎、原发性胆汁性肝硬化、肉芽肿性肝炎和硬化性胆管炎)、炎性肠病、溃疡性结肠炎、克罗恩病、麸质过敏性肠病和Whipple's病、大疱性皮肤病、多形性红斑和接触性皮炎、牛皮癣、过敏性疾病(如哮喘、过敏性鼻炎、特应性皮炎、食物过敏和荨麻疹)、肺的免疫学疾病(如嗜酸性细胞性肺炎、特发性肺纤维化和过敏性肺炎(hypersensitivity pneumonitis))、移植相关疾病(包括移植排斥和移植物抗宿主疾病)。在某些其他实施方案中,免疫相关病症是哮喘、多发性硬化、类风湿性关节炎、炎性肠病、溃疡性结肠炎、红斑狼疮、牛皮癣、慢性阻塞性肺病或特发性肺纤维化。

[0302] 在某些实施方案中,本发明公开的主题提供了治疗细胞增殖相关疾病或病症的方法,包括将本发明的抗体或包括抗体的药物组合物施用于需要的受试者。在某些实施方案中,细胞增殖相关病症可以是,不限于,结直肠癌、肾细胞癌(例如,肾细胞癌)、黑素瘤、膀胱癌、卵巢癌、乳腺癌(例如,三阴性乳腺癌、HER-2阳性乳腺癌或激素受体阳性癌)和非小细胞肺癌(例如,鳞状上皮非小细胞肺癌或非鳞状上皮非小细胞肺癌)。在某些实施方案中,待通过本发明的方法治疗的癌症包括,但不限于,癌、淋巴瘤、母细胞瘤、肉瘤和白血病。在某些实施方案中,待通过本发明的方法治疗的癌症包括,但不限于,鳞状上皮细胞癌、肺癌(包括小细

胞肺癌、非小细胞肺癌、肺的腺癌和肺的鳞状上皮细胞癌)、黑素瘤、肾细胞癌、腹膜癌、肝细胞癌、胃的癌症或胃癌(包括胃肠癌症)、胰腺癌、胶质母细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝细胞瘤、乳癌、结肠癌、结直肠癌、子宫内膜癌或子宫癌、唾液腺癌、肾脏或肾癌、肝癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝的癌和各种类型的头颈癌,以及B-细胞淋巴瘤(包括低级/卵泡性非霍奇金淋巴瘤(NHL);小淋巴细胞(SL)NHL;中级/卵泡性NHL;中级弥散性NHL;高级成免疫细胞性NHL;高级成淋巴细胞性NHL;高级小无裂细胞性NHL;大肿块NHL(bulky disease NHL);套细胞淋巴瘤;AIDS相关的淋巴瘤;和Waldenstrom's巨球蛋白血症);慢性淋巴细胞性白血病(CLL);急性淋巴细胞性白血病(ALL);毛细胞白血病;慢性髓母细胞性白血病;和移植后淋巴增生性障碍(PTLD),以及与癥瘕病(phakomatoses)相关的异常血管增殖、水肿(如与脑肿瘤相关的)和Meigs'综合征。在某些实施方案中,癌症可以是早期癌症或晚期癌症。在某些实施方案中,癌症可以是原发性癌症。在某些实施方案中,癌症可以是源自上述任一种类型癌症的在第二部位的转移性肿瘤。

[0303] 在某些实施方案中,用于所公开的方法中的多特异性抗体,例如,双特异性抗-KLB抗体,可以存在于药物组合物中。在某些实施方案中,药物组合物可以包括药物学上可接受的载体。另外地或替换地,药物组合物可以包括第二治疗剂。将抗体与另一种治疗剂一起施用,两者可以以任意顺序或同时施用。

[0304] 对于疾病的预防或治疗,单独或组合一种或多种其他另外的治疗剂使用时,本发明公开主题的抗体的合适剂量,例如,治疗有效量,将取决于待治疗疾病的类型、抗体类型、疾病的严重性和过程、抗体是施用于预防或治疗目的、之前的治疗、患者的临床病史和对抗体的响应,以及主治医生的判断。

[0305] 在某些实施方案中,可以将抗体一次性地或在一系列治疗中施用于患者。例如,但不是限制,如本文中公开的抗体和/或含有抗体的药物制剂可以施用于受试者,每天两次、每天一次、每两天一次、每三天一次、每四天一次、每五天一次、每六天一次、每周一次、每两周一次、每三周一次、每个月一次、每两个月一次、每三个月一次、每六个月一次或每年一次。在某些实施方案中,如本文中公开的抗体和/或含有抗体的药物制剂可以一周一次或一月一次施用于受试者。

[0306] 在某些实施方案中,根据疾病的类型和严重性,约 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ 至约 $15\text{mg}/\text{kg}$ (例如, $0.1\text{mg}/\text{kg}$ - $10\text{mg}/\text{kg}$)的抗体可以是用于施用于患者的初始候选剂量,不管是例如通过一次或多次分开施用,或通过连续输注。根据以上提及的因素,一个典型的日剂量范围可以为约 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ 至约 $100\text{mg}/\text{kg}$ 。在某些实施方案中,日剂量可以高于约 $100\text{mg}/\text{kg}$ 。在一些方法中,调节剂量,以获得 1 - $1000\mu\text{g}/\text{ml}$ 的血浆抗体浓度,并且在一些方法中, 25 - $300\mu\text{g}/\text{ml}$ 。或者,抗体可以作为持续释放制剂来施用,在该情况中,需要较低频率的施用。剂量和频率可以基于抗体在患者中的半衰期而改变。

[0307] 对于在几天或更长时间内的重复施用,根据病症,治疗通常将持续直至出现所需的疾病病症抑制。在某些实施方案中,抗体的剂量可以在约 $0.05\text{mg}/\text{kg}$ 至约 $10\text{mg}/\text{kg}$ 的范围中。例如,可以将一个或多个约 $0.5\text{mg}/\text{kg}$ 、 $2.0\text{mg}/\text{kg}$ 、 $4.0\text{mg}/\text{kg}$ 或 $10\text{mg}/\text{kg}$ 的剂量(或其任意组合)施用于患者。这样的剂量可以间歇地施用,例如,每周或每三周(例如,使得患者接收约两剂至约二十剂抗体,或例如约六剂抗体)。可以施用初始较高的负荷剂量,接着一个或多个较低剂量。

[0308] 在某些实施方案中,所述方法可以进一步包括监测受试者并确定治疗的有效性。例如,可以通过常规技术和测定试验来监测这个治疗的进程。

[0309] B. 诊断和检测方法

[0310] 本发明公开的主题提供了使用本文中公开的抗体用于诊断和/或检测疾病的方法。在进一步的方面中,提供了用于检测生物样品中抗原的存在和/或水平的方法。如本文中使用的术语“检测”包括定量和/或定性检测。

[0311] 样品的非限制性实例包括,但不限于,培养物中的细胞、细胞上清液、细胞裂解物、血清、血浆、生物流体(例如,血液、血浆、血清、粪便、尿液、淋巴液、腹水、导管灌洗液(ductal lavage)、乳头抽吸物、唾液、支气管肺泡灌洗液、泪液和脑脊髓液),以及组织样品。样品的来源可以是实体组织(例如,来自新鲜、冷冻和/或保存的器官、组织样品、活检物或吸出物)、血液或任何血液成分、体液(例如,尿液、淋巴、脑脊髓液、羊水、腹腔液或间质液),或来自个体的细胞。在某些实施方案中,生物样品是来自肝脏的组织 and/或细胞。

[0312] 在某些实施方案中,诊断或检测方法包括在允许双特异性抗KLB抗体结合KLB的条件下将生物样品接触双特异性抗KLB抗体,并且检测双特异性抗KLB抗体与KLB之间是否形成了复合物。这样的方法可以是体外或体内方法,例如,免疫荧光或western印迹。在某些实施方案中,将本文中公开的双特异性抗KLB抗体用于选择适于使用抗KLB抗体治疗的受试者,例如,在KLB是用于患者选择的生物标志物的情况中。

[0313] 在某些实施方案中,可以标记用于方法中的所公开的抗体。标记包括,但不限于,可以直接检测的标记或部分,如荧光、发色团、电子致密、化学发光、放射性标记,以及(例如,通过酶反应或分子相互作用)间接检测的部分,如酶或配体。标记的非限制性实例包括,但不限于,放射性同位素³²P、¹⁴C、¹²⁵I、³H和¹³¹I,荧光团如稀土螯合物或荧光素及其衍生物、若丹明及其衍生物、丹磺酰、伞形酮、荧光素酶(例如,萤火虫荧光素酶和细菌荧光素酶(参见美国专利No.4,737,456))、虫荧光素、2,3-二氢酞嗪二酮、辣根过氧化物酶(HRP)、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、葡萄糖淀粉酶、溶菌酶、糖氧化酶(例如,葡萄糖氧化酶、半乳糖氧化酶和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶)、杂环氧化酶(如尿酸酶和黄嘌呤氧化酶),结合利用过氧化氢来氧化染料前体的酶如HRP,乳过氧化物酶或微过氧化物酶、生物素/抗生物素蛋白、自旋标记物、噬菌体标记、稳定的自由基等。

[0314] V. 药物制剂

[0315] 本发明公开的主题进一步提供了含有本文中所述的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)与药物学上可接受载体的药物制剂。在某些实施方案中,药物组合物可以包括本发明公开主题的多个(例如,两个或多个)分离的多特异性(例如,双特异性)抗体和/或其抗原结合部分的组合。

[0316] 在某些实施方案中,可以通过将具有所需纯度的公开的多特异性(例如,双特异性)抗KLB抗体与一种或多种药物学上可接受载体(Remington's Pharmaceutical Sciences,第16版,Osol,A.编辑(1980))混合来制备所公开的药物制剂,以冻干制剂或水溶液的形式。例如,但不是限制,冻干抗体制剂描述于美国专利No.6,276,958中。在某些实施方案中,含水抗体制剂可以包括美国专利No.6,171,586和WO 2006/044908中所述的那些,后面的制剂包括组氨酸-醋酸盐缓冲液。

[0317] 在某些实施方案中,本发明的抗体可以是高于约80%、高于约90%、高于约91%、

高于约92%、高于约93%、高于约94%、高于约95%、高于约96%、高于约97%、高于约98%、高于约99%、高于约99.1%、高于约99.2%、高于约99.3%、高于约99.4%、高于约99.5%、高于约99.6%、高于约99.7%、高于约99.8%或高于约99.9%的纯度。

[0318] 药物学上可接受的载体在采用的剂量和浓度下对接受者一般是无毒的,并且包括但不限于:缓冲剂,如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(如十八基二甲基苄基氯化铵;氯己双铵;苯扎氯铵;苄索氯铵;苯酚、丁醇或苯甲醇;对羟基苯甲酸烷基酯例如对羟基苯甲酸甲或丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(小于约10个残基)多肽;蛋白质,如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水聚合物,如聚(乙烯吡咯烷酮);氨基酸,如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖及其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,如EDTA;糖,如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨糖醇;成盐抗衡离子,如钠;金属络合物(例如Zn-蛋白质络合物);和/或非离子型表面活性剂,如聚乙二醇(PEG)。其它非限制性示例性药物学上可接受的载体包括间质(interstitial)药物分散剂,如可溶性中性-活性透明质酸酶糖蛋白(sHASEGP),例如人可溶性PH-20透明质酸酶糖蛋白,例如rhuPH20(HYLENEX[®], Baxter International, Inc.)。美国专利公开No.2005/0260186和2006/0104968中描述了某些示例性sHASEGP及其使用方法,包括rhuPH20,这些文献的内容完整地通过引用而并入。在某些实施方案中,将sHASEGP与一种或多种另外的葡萄糖胺聚糖酶(如软骨素酶)组合。

[0319] 载体可以适用于静脉内、肌内、皮下、胃肠外、脊柱或表皮施用(例如,通过注射或输注)。根据施用途径,活性化合物(即,双特异性抗体)可以包裹在保护化合物免受酸和可能灭活化合物的其他天然条件的作用的材料中。

[0320] 本发明的药物组合物还可以在联合治疗中施用,即,组合其他药剂。在某些实施方案中,本文中公开的药物组合物还可以针对所治疗的特定适应症按照需要含有超过一种活性成分,例如,具有互补活性且不会不利地彼此影响的那些成分。在某些实施方案中,药物制剂可以包括用于治疗第一种治疗剂治疗的相同疾病的第二活性成分。此类活性成分适于以对于预期目的有效的量组合存在。

[0321] 本发明的组合物可以通过各种本领域已知的方法来施用。施用的途径和/或方式根据所需的结果来改变。可以用保护化合物对抗快速释放的载体来制备活性化合物,如控释制剂,包括植入物、经皮贴剂和微胶囊递送系统。可以使用生物可降解的、生物相容的聚合物,如乙烯醋酸乙烯酯、聚酐、聚乙醇酸、胶原蛋白、聚原酸酯和聚乳酸。用于制备这样的制剂的许多方法描述于例如Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson编辑, Marcel Dekker, Inc., New York, 1978。在某些实施方案中,依据美国食品药品监督管理局的良好生产规范(GMP)条件来制造药物组合物。

[0322] 还可以制备含有公开的双特异性抗KLB抗体的持续释放制剂。持续释放的制剂的合适实例包括,但不限于,含有抗体的固体疏水聚合物的半透性基质,所述基质可以为成形物品的形式,例如,薄膜或微囊。在某些实施方案中,活性成分可以截留在例如通过凝聚技术(coacervation)或通过界面聚合制备的微囊中(例如分别地羟甲基纤维素或明胶-微囊和聚-(甲基丙烯酸甲酯)微囊)、在胶体药物递送系统(例如脂质体、白蛋白微球体、微乳液、纳米颗粒和纳米囊)中,或在粗乳液中。此类技术公开于Remington's Pharmaceutical Sciences, 第16版, Osol, A编辑, (1980)。

[0323] 为了通过某些施用途径来施用本发明的抗体,可能需要用防止其失活的材料覆盖化合物,或将化合物与防止其失活的材料共施用。例如,化合物可以在合适的载体中施用于受试者,所述载体例如为脂质体或稀释剂。药物学上可接受的稀释剂包括盐水和缓冲剂水溶液。脂质体包括水包油包水型CGF乳液以及常规的脂质体(Strejan等,(1984) J.Neuroimmunol.7:27)。

[0324] 药物学上可接受的载体包括无菌水溶液或分散体和用于临时制备无菌注射液或分散体的无菌粉末。这样的介质和试剂用于药物活性物质的用途是本领域已知的。除非常规介质或试剂与活性化合物不相容,否则考虑其在本发明药物组合物中的使用。补充性活性化合物也可以掺入组合物中。

[0325] 治疗性组合物通常必须是无菌的、基本上等渗的,并且在制造和储存条件下是稳定的。组合物可以配制成溶液、微乳液、脂质体或其他适用于高药物浓度的有序结构。载体可以是溶剂或分散介质,其含有例如水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等),及其合适的混合物。可以维持适当的流动性,例如,通过使用包衣,如卵磷脂,在分散体的情况中通过维持所需的颗粒大小和通过使用表面活性剂。在许多情况中,优选在组合物中包括等渗剂,例如,糖、多元醇(如甘露醇、山梨糖醇)或氯化钠。通过在组合物中包括延迟吸收的试剂,例如,单硬脂酸盐和明胶,可以获得可注射组合物延长的吸收。

[0326] 可以通过将所需量的双特异性抗体掺入合适溶剂接着无菌微过滤中来制备无菌注射液,按照需要,所述溶剂可以含有以上列举的一种组分或组分的组合。通常,通过将活性化合物掺入无菌溶媒中来制备分散体,所述无菌溶媒含有基础性分散介质和来自以上列举的所需其他成分。在用于制备无菌注射液的无菌粉末的情况中,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥(冻干),从之前无菌过滤的溶液产生活性成分加上任何其他所需成分的粉末。

[0327] 治疗组合物还可以结合本领域已知的医疗设备来施用。例如,本发明的治疗组合物可以用无针皮下注射装置来施用,例如美国专利No.5,399,163、5,383,851、5,312,335、5,064,413、4,941,880、4,790,824或4,596,556中所述的设备。本发明中有用的植入物和模块的实例包括:美国专利No.4,487,603,其公开了可植入的微输注泵,用于以控制的速率分配药物;美国专利No.4,486,194,其公开了用于通过皮肤施用药物的治疗装置;美国专利No.4,447,233,其公开了用于以精确的输注速率递送药物的药物输注泵;美国专利No.4,447,224,其公开了用于持续药物递送的可变流动可植入输注装置;美国专利No.4,439,196,其公开了具有多室区隔的渗透药物递送系统;和美国专利No.4,475,196,其公开了渗透药物递送泵。许多其他这样的植入物、递送系统和模块是已知的。

[0328] 对于治疗组合物,本发明的制剂包括适用于口、鼻、局部(包括颊和舌下)、直肠、阴道和/或胃肠外施用的制剂。制剂可以方便地以单位剂型呈现并且可以通过药物领域中已知的任何方法来制备。可以与载体材料组合来产生单剂型的双特异性抗体量,可以根据待治疗的受试者和特定的施用方式来改变。可以与载体材料组合来产生单剂型的双特异性抗体的量,通常是产生治疗效果的组合物的量。通常,在百分之一百中,这个含量范围为约0.01%至99%活性成分,约0.1%至约70%,或约1%至约30%。

[0329] 适用于阴道施用的本发明公开主题的制剂还包括含有本领域已知合适的此类载体的阴道栓剂、卫生棉塞、霜剂、凝胶、糊剂、泡沫或喷雾制剂。用于本发明组合物的局部或

经皮施用的剂型包括粉末、喷雾、膏剂、糊剂、霜剂、洗剂、凝胶、溶液、贴剂和吸入剂。可以在无菌条件下,将活性化合物与药物学上可接受的载体混合,并且与任何防腐剂、缓冲剂或可能需要的推进剂混合。

[0330] 短语“胃肠外施用”和“通过胃肠外施用的”表示除了肠和局部施用以外的其他施用方式,通常通过注射,并且包括,不限于,静脉内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心脏内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、硬膜外和胸骨内注射和输注。

[0331] 这些药物组合物还可以含有助剂,如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。可以通过如上的灭菌程序,和通过包含各种抗细菌和抗真菌剂,例如,对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚山梨酸等,确保防止微生物的存在。还可能期望在组合物中包括等渗剂,如糖、氯化钠等。此外,可以通过包含延迟吸收的试剂,如单硬脂酸铝和明胶,实现可注射药物形式的吸收延长。

[0332] 当本发明的抗体作为药物施用于人和动物时,它们可以单独或作为药物组合物给予,所述药物组合物含有例如约0.01%至99.5%(或约0.1至约90%)双特异性抗体、以及药物学上可接受的载体。

[0333] VI. 制成品和药盒

[0334] 本发明公开的主题进一步涉及制成品和药盒。例如,但不限于,本发明的制成品和/或药盒可以包括一种或多种本文中公开的多特异性抗体,例如,双特异性抗体。

[0335] 在某些实施方案中,制成品包括容器和在容器上或与容器结合的标签或包装说明书。合适的容器的非限制性实例包括例如瓶、小瓶、注射器和IV溶液袋。容器可以由多种材料(如玻璃或塑料)形成。容器可以容纳组合物自身或与对于治疗、预防和/或诊断所述病症有效的另一种组合物组合的组合物,且可以具有无菌入口(例如容器可以是具有可被皮下注射针穿透的塞子的静脉溶液袋或小瓶)。

[0336] 在某些实施方案中,本发明的制成品和/或药盒含有对于上述病症的治疗、预防和/或诊断有用的物质。在某些实施方案中,组合物中的至少一种活性剂是本发明公开主题的抗体。标签或包装说明书可以指示组合物用于治疗所选择的病症。

[0337] 在某些实施方案中,制成品可以包括(a)其中含有组合物的第一容器,其中所述组合物包括本发明公开主题的本发明双特异性抗体;和(b)其中含有组合物的第二容器,其中所述组合物包含其它的细胞毒性剂或治疗剂。在某些实施方案中,制成品可以进一步包含指示组合物可以用于治疗特定病症的包装说明书。

[0338] 在某些实施方案中,制成品可以进一步包括另外的容器,例如,第二或第三容器,其包括药物学上可接受的缓冲液,如,但不限于,抑菌注射用水(BWFI)、磷酸盐缓冲盐水、林格氏溶液和葡萄糖溶液。制成品可以包括从商业和用户观点来看希望的其他材料,包括其他缓冲液、稀释剂、滤器、针头和注射器。

[0339] 以下实施例只是本发明公开主题的举例说明,并且不应当认为以任何方式构成限制。

实施例

[0340] 实施例1:抗KLB抗体的开发和表征

[0341] 本实施例描述了抗KLB单克隆抗体的产生。为了产生抗KLB单克隆抗体,用50 μ g分开表达KLB或FGFR1c的pRK或pCMV载体,或用表达人KLB和FGFR1c的pCMV.hKLB.IRES.hFGFR1c载体,免疫KLB敲除(KLB.ko)小鼠(Genentech, South San Francisco, CA),使用或未用在乳酸林格溶液中稀释的mFlt3配体(DNA)和mGM-CSF(DNA)(Genetech),经由流体尾静脉(HTV)注射,以1-4周间隔,注射总共3-13次;或用稀释于PBS中的稳定转染了人KLB和FGFR1c的5百万个300.19细胞免疫,每周经由腹膜内(i.p.)注射,总共12次注射。小鼠经由HTV接受了KLB和FGFR1c质粒DNA各50 μ g或经由i.p.注射接受了5百万个300.19-KLB/FGFR1c转染细胞连同2 μ g人和猕猴KLB蛋白的融合前加强。

[0342] 最后一次免疫后3天收获脾脏。来自这些小鼠的脾细胞(通过FACS,所有小鼠的血清都表现出与超表达人KLB和/或KLB/FGFR1c复合物的293细胞的强烈结合)经由电融合(Cyto Pulse CEEF-50 apparatus, BTX Harvard Apparatus, Holliston, MA)与P3X63-Ag8U.1小鼠骨髓瘤细胞(American Type Culture Collection, Manassas, VA)融合。用Cytofusion培养基C(BTX Harvard Apparatus 47-0001)洗涤两次后,将分离的脾细胞与骨髓瘤细胞以1:1比例混合并且随后以10百万细胞/ml重悬浮在Cytofusion培养基C中。根据制造商的指导进行电融合。将融合的细胞在ClonaCell-HY培养基C(Stemcell Technologies, Cat#03803)中在7% CO₂培养箱中在37℃培养过夜。第二天,将融合的细胞离心并且随后重悬浮于10ml含有抗小鼠IgG-FITC(Jackson Immunoresearch, West Grove, PA)的ClonaCell-HY培养基C中,并随后与90ml含有HAT组分的基于甲基纤维素的ClonaCell-HY培养基D(Stemcell Technologies, Cat#03804)温和地混合。将细胞涂布于OmniTray平板(Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY)上,并使其在7% CO₂培养箱中在37℃下生长。6-7天孵育后,使用Clonepix FL(Molecular Devices, Sunnyvale, CA)选择荧光集落并转移至含有200 μ L/孔ClonaCell-HY培养基E(Stemcell Technologies, Cat#03805)的96-孔平板(Becton Dickinson, Cat#353075)中。在ELISA筛选前3天,更换杂交瘤培养基。在挑取后七天,通过针对抗小鼠IgG的ELISA筛选了上清液。扩增通过ELISA证明了小鼠IgG表达的杂交瘤,并针对与超表达人KLB β 、小鼠KLB、猕猴KLB、人KLB/FGFR1c复合物、猕猴KLB/FGFR1c复合物、人FGFR1c和/或人KLB α /KLB的293细胞的结合,通过基于细胞的ELISA和/或FACS进行了筛选;还针对与抗KLB 8C5抗体(Genentech)的结合竞争,通过FACS进行了筛选。还针对激动活性,在GAL/E1k1荧光素酶测试中,使用超表达人FGFR1c和KLB β /FGFR1c复合物的293细胞,筛选了所有IgG阳性上清液。使用RNeasy试剂盒(Qiagen, Hilden, 德国),从FACS阳性和激动剂杂交瘤细胞系提取RNA,产生cDNA并扩增用于序列测定。将重链和轻链的可变区基因插入pRK质粒载体(Genentech)中,用于表达。在293细胞中重组表达来自显示出FACS结合和激动活性的独特克隆的质粒DNA。随后按照之前所述的,通过蛋白A亲和色谱纯化上清液(Hongo等, Hybridoma 19:303, 2000)。

[0343] 使用上述方法,鉴定出大约4个不同的杂交瘤,2C12、4H7、23B3和28B7,产生结合KLB的单表位的单克隆抗KLB抗体。

[0344] 使用以下实验方法鉴定出第五个单克隆抗体,12B8。用稳定表达hFGFR1c和hKLB蛋白的HEK293细胞免疫Balb/c小鼠。在12周后收集脾并产生杂交瘤。使用用于免疫的HEK293细胞,通过FACS分析鉴定出产生抗-hKLB抗体的杂交瘤。简而言之,用FACS缓冲液(PBS中0.5% BSA)中稀释的杂交瘤上清液和PE-缀合的山羊抗小鼠IgG抗体(Jackson Labs),染色

表达单独的hKLB、单独的hFGFR1或两者的293细胞。将相同的FACS缓冲液用于洗涤染色的细胞。通过FACSscan(Becton Dickinson)和FlowJo FACS分析软件(Tree Star)分析了染色的细胞。将编码IgG重链和轻链的cDNA克隆至表达载体中。

[0345] 这五个抗KLB抗体,12B8、2C12、4H7、23B3和28B7,显示出起到KLB/FGFR1c激动剂抗体的作用(图4和5)。这5个抗体的重链可变区和轻链可变区CDR序列分别显示于表2和3中。这些抗KLB抗体的全长重链和轻链序列显示于表4和图13-17中。这些抗体在本文中称为亲本抗体。

[0346] 表2. 抗KLB抗体的重链可变区CDR序列

抗体	CDR H1	CDR H2	CDR H3
12B8	NYGMN (SEQ ID NO: 3)	WIDTDTGEATYTDDFKG (SEQ ID NO: 8)	EEYGLFGFPY (SEQ ID NO: 13)
2C12	SGYYWT (SEQ ID NO: 4)	YIKYDGGNYYNPSLRN (SEQ ID NO: 9)	GDYYASPYGAMDS (SEQ ID NO: 14)
4H7	NYDIN (SEQ ID NO: 5)	WIYPRDGS AKYNAKFKG (SEQ ID NO: 10)	RPLYYGSTHWYFDV (SEQ ID NO: 15)
23B3	SGYYWN (SEQ ID NO: 6)	YIRYDGNSNYNPFLKN (SEQ ID NO: 11)	KGAYYSSFDALDY (SEQ ID NO: 16)
28B7	DYYIN (SEQ ID NO: 7)	DINPNNGDTTYNQKFA (SEQ ID NO: 12)	RFYSSPFDS (SEQ ID NO: 17)

[0348] 表3. 抗KLB抗体的轻链可变区CDR序列

抗体	CDR L1	CDR L2	CDR L3
12B8	KASEDIYNRLA (SEQ ID NO: 18)	AATSLET (SEQ ID NO: 23)	QQYWSNPLT (SEQ ID NO: 28)
2C12	HASQDIDVWLS (SEQ ID NO: 19)	KSSILHT (SEQ ID NO: 24)	QQGLSYPFT (SEQ ID NO: 29)
4H7	KASQSVDYDGDSYMN (SEQ ID NO: 20)	AASNLKS (SEQ ID NO: 25)	QQSNEDPRT (SEQ ID NO: 30)
23B3	KASQDIRSYLS (SEQ ID NO: 21)	RANRLVD (SEQ ID NO: 26)	LQYDEFPLT (SEQ ID NO: 31)
28B7	KSGQSLLYSRNQKNYLA (SEQ ID NO: 22)	WASTRES (SEQ ID NO: 27)	QQYYSYPYT (SEQ ID NO: 32)

[0350] 表4. 鉴定的抗KLB抗体的重链和轻链可变区

[0351]

抗体	轻链可变区	重链可变区
12B8	DIQMTQSSSFSVSLGDRVITITCKASEDI YNRLAWYQQKPGSAPRLISAATSLETG VPSRFGSGSGKDYTLSTSLQTEDVATY YCQQYWSNPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO: 33)	QIQLVQSGPELKKPGETAKISCKASGYAFSN YGMNWVKQAPGKDLKWMGWIDTDTGEA TYTDDFKGRFVFSLETSASTAYLQINNPKNE DMATYFCAREEYGLFGFPYWGHTLVTVS A (SEQ ID NO: 34)
2C12	DIVMTQSPSSLSASLGDTITITCHASQDID VWLSWYQQKPGNVQPLLISKSSILHTGV PSRFGSGSGTGFTLTISLQPEDATYYC QQGLSYPFITFGSGTKLKIK (SEQ ID NO: 35)	EVQLQQSGPGLVKPSQSLTCSVTGYSITS GYYWTWIRQFPGNKLEWMGYIKYDGGNY YNPSLRNRISITRDTSKNHFFLKFYSVTAED TATYFCARGDYASPYGAMDSWGQGSVT VSS (SEQ ID NO: 36)
4H7	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSV DYDGDSYMNWYQQKPGQPPKLLIYAAS NLKSGIPARFSGSGSGTDFTLNHPVEEE DAATYYCQQSNEDPRTFGGGTRLEIK (SEQ ID NO: 37)	QVQLQQSGPELVKPGASVKLSCKASGYTFT NYDINWVRQRPQGQLEWIGWIYPRDGSAAK YNAKFKGKATLTVDTSSTAYMELHSLTSE DSAVYFCARRPLYYGSTHWYFDVWGTGTT VTVSS (SEQ ID NO: 38)
23B3	DIVMTQSPSSMYASLGERVTISCKASQDI RSYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVDG VPSRFGSGSGQDYSLTITSLEFGDVGLY YCLQYDEFPLTFGAGTKLKIE (SEQ ID NO: 39)	EVQLQESGPGLVKPSQSLTCSVTGYSITS GYYWNWIRQFPGNKLEWMGYIRYDGNSSN YNPFLKNRVSITRDTSKNQFFLKLNSVTTED TATYYCTRKGAYYSSFDALDYWGQGSVT VSS (SEQ ID NO: 40)
28B7	DIVMTQSPSSLAVSVGEKVTLSCKSGQSL LYSRNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLISW ASTRESGVPRFTGSGSGTDFTLTISVK TEDLAVYHCQQYYSPYTFGGGTRLEIK (SEQ ID NO: 41)	EVQLQQSGPELVQPGTSVKISCEASGYTFTD YYINWVKQSRGKSLEWIGDINPNNGDTTY NQKFKAKATLTVDRSSNTAYMELRSLTSED SVVYYCARRFYSSPFDSWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 42)

[0352] 实施例2:双特异性抗KLB抗体的筛选

[0353] 在此实施例中,筛选双特异性抗KLB抗体并且在293T细胞中测试了双特异性抗KLB抗体的KLB/FGFR1c激动剂活性。

[0354] 使用以上表1和2中所列的亲本抗体的抗KLB抗体序列,产生了结合KLB上的两个结合位点(例如,表位)的双特异性抗体。表5概述了产生的双特异性抗体。这些双特异性抗体使用“杵进臼”杂二聚化技术产生,其中以VLfH(可变轻链完全重链)形式,单个轻链可变区连接至全长重链(参见图1)。参见Ridgway等,Protein Engineering, Vol.9:7, p617-621 (1996); Atwell等, J. Mol. Biol. 270, 26-35 (1997); Spiess等, Nat. Biotech. 31, 753-759 (2013)。

[0355] 为了筛选呈现出KLB/FGFR1c激动剂活性的双特异性抗体,以VLfH形式表达每条轻链和重链。如图1中所示,VLfH形式包括通过接头连接可变轻链结构域的全长重链,所述接头包括具有SEQ ID NO:68中所列序列的氨基酸。为了产生VLfH形式的具有轻链可变结构域和全长重链的多肽,商业合成了cDNA,所述cDNA编码ATGAYA (SEQ ID NO:83) -至R108的轻链可变结构域(根据EU编号系统) -GGGGSGGGSGGGSGGGGS(接头;SEQ ID NO:68) -包括至CH1残基F126的重链可变结构域(根据EU编号系统),并含有5'端BsiWI限制位点和3'端PspOMI/ApaI限制位点。用限制酶BsiWI和PspOMI消化cDNA,用于亚克隆至标准pRK载体中,编码具有

各种同种型以及铰链变体的全长重链(包括在CH3中的杵和臼突变)。所得到的翻译的多肽包括以下形式:MGWSCIIILFLVATATGAYA(信号肽;SEQ ID NO:69)-至R108的轻链可变结构域(根据EU编号系统)-GGGSGGGSGGGSGGGGS(接头;SEQ ID NO:68)-全长重链。

[0356] 将相同的轻链恒定链(CL)结构域用于每对VLfH多肽。通过聚合酶链式反应(PCR),从含有人卡帕(κ)轻链的cDNA的质粒,扩增CL结构域,所述cDNA包含以下SEQ ID NO:66所列的核苷酸序列,其中使用以下引物:5'-TTCCCTTTATCGATTGAATCCACCATGGGATGGTCATGTATCATCCTTTTCTAGTAGCAACTGCAACTGGAGTACATTCAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTC-3'(SEQ ID NO:63);5'-TTCCCTTTAA GCTTA ACACTCT CCCCTGTTG AAGCTCTTTGT-3'(SEQ ID NO:64)。以下提供了SEQ ID NO:66。

[0357] CGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGC TTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCCGTGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAA TCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGC TGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCCGTAC AAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT(SEQ ID NO:66)。

[0358] SEQ ID NO:66编码以下提供的SEQ ID NO:65中所列的氨基酸序列。

[0359] RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL SSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(SEQ ID NO:65)。

[0360] 随后用限制酶ClaI和HindII消化扩增的DNA,用于亚克隆至标准pRK载体中,所述载体含有与开放阅读框(ORF)开始前和终止密码子后的独特位点相同的限制酶位点,形成具有以下提供的SEQ ID NO:67中所列氨基酸序列的多肽。

[0361] MGWSCIIILFLVATATGVHSTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDYSLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(SEQ ID NO:67)。

[0362] 该 κ 恒定轻链开始于T109(根据EU编号系统),但不限于T109,并包括R108和之前的肘状(elbow)残基。这个恒定轻链(CL)DNA只克隆一次并且重复用于与以上公开的VLfH DNA进行配对。

[0363] 按照之前所述的,将等量的VLfH和CL pRK DNA混合,用于在各种体积的CHO(Wong等,(2010)Biotechnol.Bioeng.,106:751-763)或HEK293T(Bos等,(2014)Journal of Biotechnology,180:10-16)细胞的瞬时转染培养物中表达,以促进双特异性抗体的杂二聚化。CL结构域作为不同于VLfH多肽的多肽表达。之前已经显示出CL结构域自主折叠并且在折叠过程中不与BiP相互作用(Hellman等(1999)J.Cell Biol.144:21-30)。此外,因为不具有阻碍分泌的ER驻留信号,CL结构域自身可以有效地分泌,直至其与重链(HC)配对。轻链(LC)和替代轻链(λ 5)(Bankovich等(2007)Science 316:291-294)可以经由两个结构域与HC相互作用。除了CL:CH1界面,VL(对于LC)和第一 β 链(对于 λ 5)在相互作用过程中提供了另外的稳定性。目前尚不清楚,对于分离的CL,缔合动力学是否足够快和牢固,以致能够成功地(i)置换伴侣蛋白,如CH1上的BiP,(ii)稳定地与CH1配对,和(iii)稳定CH1以使得在CH1中最终脯氨酸异构化以进入最终折叠状态(Feige等(2009)Mol Cell.34:569-579)。没有可变结构域的相互作用的促进,CL:CH1相互作用可能会太短暂,以致不能允许CH1正确折叠和拯救VL-HC融合物的折叠缺陷。

[0364] 为了确定两个VLfH多肽的共表达是否导致杂二聚化,进行了质谱。使用Agilent

6230TOF LC-MS系统和1290Infinity HPLC(Agilent Technology,Santa Clara,CA,USA)获取了质谱数据。使用4.6mm×50mm PLRP-S反相柱(Agilent Technology)纯化双特异性抗体。使用MassHunter软件(Qualitative Analysis B.04.00),通过最大熵去卷积(Maximum Entropy Deconvolution),获得了完整质量。如图2A-B中所示,VLfH的共表达导致了两个VLfH多肽的杂二聚化。所公开的方法导致了高于95%的杂二聚化和低于5%的同型二聚化。

[0365] 表5. 双特异性抗KLB抗体

[0366]	12B8-2C12	12B8-28B7	2C12-23B3	4H7-28B7	23B3-28B7
	12B8-4H7	2C12-4H7	2C12-28B7	4H7-23B3	12B8-23B3

[0367] 为了测定VLfH形式双特异性抗体的激动活性,进行了荧光素酶测定。将HEK293T细胞在Dulbecco's改良Eagle培养基(DMEM)+10%胎牛血清(FBS)、GlutaMax(Life Technologies)和Antibiotic-Antimycotic(Life Technologies)中培养,并用编码Renilla荧光素酶(pRL-SV40,Promega)、FGFR1c、转录激活物(pFA2-Elk1,Stratagene)以及由GAL4结合位点驱动的萤火虫荧光素酶报告分子(pFR-Luc,Stratagene)的表达载体进行瞬时转染,其中使用FuGENE®HD转染试剂(Roche)。第二天,将转染的细胞在无血清培养基中另外培养6-8h,并且以递增浓度测试每种双特异性抗KLB抗体和相应的亲本单克隆抗体。在一些荧光素酶实验中,将重组人FGF21(R&D)用作参照。用被动裂解缓冲液(Promega)裂解细胞,并且在4℃下孵育一小时,或在-20℃下过夜。使用DUAL-GLO®荧光素酶测定系统(Promega)和EnVision®多标签阅读器(PerkinElmer)测定了细胞荧光素酶活性。将萤火虫荧光素酶活性相对于共表达的Renilla荧光素酶活性进行标化,并且以相对光单位(RLU)作为配体浓度的函数,将结果作图。

[0368] 在HEK293Tde1FGFR1细胞中,用CRISPR/Cas9技术灭活FGFR1基因,其中使用向导RNA aacttcactgtcttggcagccgg和gatctccaggtacagggcgagg。用CMV启动子驱动的Cas9-表达质粒以及在U6启动子控制下表达各向导RNA的质粒转染细胞。转染后三天,在含有条件培养基的96-孔平板中,以每孔一个细胞,分选集落,所述培养基由75% DMEM和25%来自之前通过22微米滤器过滤的转染培养物的上清液组成。通过FACS,筛选不存在FGFR1c表面表达的集落。使用引物ATGCTCTCCCCTCCTCGG(SEQ ID NO:84)和AGGCCCTGTGCAATAGATG(SEQ ID NO:85),使用基因组DNA PCR,进一步证实了FGFR1c-缺陷型克隆在FGFR1基因座中带有缺失。将一个FGFR1-阴性克隆扩增并用于荧光素酶报告分子测试。

[0369] 如图3中所示,VLfH形式的双特异性抗体(tcBsIgG)呈现出激动活性。例如,VLfH形式的双特异性抗体12B8/23B3呈现出高于VLfH形式的亲本抗体(单独的12B8和23B3)的激动剂活性(图3)。此外,VLfH形式的双特异性抗体12B8/23B7呈现出高于VLfH形式的亲本抗体(单独的12B8和23B7)的激动剂活性(图3)。这些结果表明,鉴定双特异性抗体的基于VLfH的筛选方法没有显著影响激动活性并且可以用作双特异性抗体的通用筛选方法。随后以相同的tcBsIgG形式产生了五个双表位抗体和亲本抗体,但使用双柱纯化来除去HMW物质和其他潜在杂质。这些单分散性tcBsIgG制备物与单特异性亲本相比保留了优良的激动活性(数据未显示),证实了在初筛过程中不需要另外的纯化。

[0370] 实施例3: 双特异性抗KLB抗体的表征

[0371] 将实施例2中鉴定的双特异性抗体重新制备成双特异性IgG抗体形式,并使用实施例2中所述的荧光素酶针对KLB/FGFR1c激动剂活性进行分析。如图4和5中所示,鉴定为呈现

出激动活性的VLFH形式的双特异性抗体(tcBsIgG),在重新制备成IgG抗体形式时,也显示出了活性,表明实施例2中所述的筛选方法没有导致任何假阳性。例如,双特异性抗体12B8/23B3呈现出高于亲本抗体(单独的12B8和23B3)的激动剂活性。对于双特异性抗KLB抗体12B8/2C12、12B8/28B7、2C12/28B7和4H7/28B7,观察到了相似结果(图4和图5)。这些结果表明,公开的双特异性抗体呈现出高于其相应单独的亲本单特异性抗体的激动剂活性。

[0372] 与相应亲本抗体对的1:1混合物的活性比较,分析了双特异性抗KLB抗体的有效性。例如,将双特异性抗体23B3-28B7的活性与23B3和28B7的1:1混合物的活性相比。如图6中所示,一对复合特异性的抗KLB双特异性抗体,23B3/28B7,需要锁固的双特异性,即,23B3和28B7结合位点的激动效果,在这些可变区构成同一双特异性抗体的部分时,比在这些可变区作为两个不同单克隆抗体的部分起作用时,更高。

[0373] 实施例4:KLB双特异性抗体的激动剂活性需要FGFR1c

[0374] 在本实施例中,进一步分析了所公开的双特异性抗体,以确定它们的激动剂活性是否依赖于FGFR1c和/或KLB的表达。

[0375] 在表达FGFR1c和KLB、或表达FGFR2c和KLB的HEK293T细胞中,在基于GAL4-E1k1的荧光素酶测定中测试时,观察到抗KLB抗体的激动剂活性需要KLB的表达并且需要FGFR1c的表达(图7)。观察到双特异性抗体在表达重组FGFR1c和hKLB的细胞中以剂量依赖性方式诱导荧光素酶活性,但在表达FGFR2c(FGFR2c是与FGFR1c非常密切相关的受体)和KLB的细胞中则没有,表明这些双特异性抗体作为KLB依赖性FGFR激动剂起作用(图7)。

[0376] 此外,双特异性抗KLB抗体呈现出在人原代脂肪细胞中诱导MAPK信号中间体(如ERK)磷酸化的活性,所述脂肪细胞代表了FGF21的抗糖尿病活性的相关细胞类型(图8)。将FGF21、抗KLB/抗FRFR1c双特异性抗体(BsAb2)(具有FGFR1c臂和KLB臂的双特异性抗体(先导抗体))和曲妥珠单抗(同种型匹配的抗体)用作对照。

[0377] 为了进一步了解双特异性抗KLB抗体的作用方式,使用基于荧光素酶的报告分子测定,定量了这些抗体在表达KLB和FGFR1c的HEK293T细胞中启动MAPK磷酸化级联的能力。

[0378] 通过流式细胞术测定了抗体结合。将细胞以 2×10^4 细胞/孔接种于96孔组织培养平板中,并生长过夜。第二天,根据制造商的说明书,使用FugeneHD转染试剂(Roche),每个孔转染100ng质粒DNA。48小时后,解离细胞,用补充了3%胎牛血清(FCS)的冷PBS洗涤,冰上与 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ 所述的抗KLB抗体孵育45分钟,再次洗涤,随后用 $4\mu\text{g}/\text{ml}$ 抗人IgG-Alexa 488(Life Technologies)在冰上孵育45分钟。使用FACSCalibur分析仪(Becton Dickinson),通过流式细胞术分析了细胞。如以下表6中所示,与先导抗KLB/抗FGFR1c双特异性抗体BsAb2相比,所述的双特异性抗体呈现出高 EC_{50} 。例如,使用基于荧光素酶的报告分子测定,与BsAb2相比,双特异性抗KLB抗体23B3/28B7呈现出0.63nM的非常高 EC_{50} 值(参见表6)。

[0379] 表6

[0380]

抗体	EC_{50} (nM)
BsAb2	0.75nM
12B8/2C12	1.36nM
12B8/23B3	0.95nM
23B3/28B7	0.63nM
2C12/28B7	0.58nM

4H7/28B7	1.21nM
----------	--------

[0381] 实施例5:抗KLB抗体的表位作图

[0382] 在本实施例中,通过FACS (图9),通过基于荧光素酶报告分子测定 (图10) 和通过表位分仓 (epitope binning) (图11A-11B),进行了实施例1中鉴定的抗KLB抗体的表位作图。

[0383] 在HEK293T或HEK293Tde1FGFR1细胞的表面上瞬时表达以下描述的嵌合人/大鼠KLB蛋白 (图9和图10) 或嵌合人FGFR1c/FGFR2c蛋白 (图10),用所示的抗体染色,并通过流式细胞术 (图9) 或通过基于荧光素酶的报告分子测定 (图10) 分析。在图9和10中,将KLB和FGFR嵌合体表示为卡通图,黑色显示人KLB或FGFR1c序列,白色显示大鼠KLB或人FGFR2c序列。

[0384] 基于这些分析,可以推断,单克隆抗体12B8结合KLB的以下氨基酸序列的至少一部分,

[0385] IQFYNKVISSRGFPFENSSSRCSQTQENTECTVCLFLVQKKPLIFLGCCFFSTLVLLLSIAIFQRQKRRKFWK
AKNLQHIPLKKGKRVVS (SEQ ID NO: 43).

[0386] 单克隆抗体2C12、23B3和4H7结合KLB的以下氨基酸序列的至少一部分:

[0387] ADSHWRAAERFLQFEIAWFAEPLFKTGDPYPAAMREYIASKHRRGLSSALPRLTEAERRLLKGTVDFCAL
NHFTTRFVMHEQLAGSRYDSRDI (SEQ ID NO: 44).

[0388] 单克隆抗体28B7结合KLB的以下氨基酸序列的至少一部分:

[0389] FSGDGRAIWSKNPNFTPVNESQLFLYDTFPKNFFWGIGTGALQVEGSWKKDGKGPSIWDHFIHHLKNVS
STNGSSDSYIFLEKDLSALDFIGVSFYQFSISWPRLFPDGIVTVANAKGLQYYSTLLDALVLRNIEPIVTLYH
WDLPLALQEKYGGWKNNDTIIDIFNDYATYCFQMFGDRVYKWIHNPYLVAWHGYGTGMHAPGEKGNL
AAVYTVGHNLIAHSAKSVWHNYNTHFRPHQKGWLSITLGSHWIEPNRSENTMDIFKCQQSMVSVLGWFA
NPIHGDGDYPEGMRKKLFSVLPIFSEAEKHEMRGTADFFAFSFGPNNFKPLNTMAKMGQNVSLNREAL
NWIKLEYNNPRILIAENGWFTDSRVKTEDTTAIYMMKNFLSQVLQAIRLDEIRVFGYTAWSLLDGFEWQD
AYTIRRGFLFYVDFNSKQKERKPKSSAHYYKQIIRENGFSLKESTPDVQGGQFPCDFSWGVTESVLKPESVAS
SPQFSDPHLYVWNATGNRLLHRVEGVRLKTRPAQCTDFVNIKKQLEMLARMKVTHYRFALDWASVLPT
GNLSAVNRQA (SEQ ID NO: 45).

[0390] 相似地,以下FGFR1c序列是单克隆抗体12B8、23B3、4H7和28B7发挥激动活性所需的:

[0391] KTVALGSNVEFMCKVYSDPQPHIQWLKHIEVNGSKIGPDNLPPYVQILKTAGVNTTDKEMEVLHLRNVSF
EDAGEYTCLAGNSIGLSHSAWLTVLEALEERPAMT (SEQ ID NO: 46).

[0392] 将以下的人/大鼠KLB和人FGFR1c/FGFR2c蛋白及嵌合体克隆至载体中,并在HEK293T表面上表达用于FACS分析,或在HEK293Tde1FGFR1表面上表达用于荧光素酶测定。人KLB序列以粗体描绘,而人/大鼠序列连接处附近的同源序列以斜体描绘。类似地,FGFR2c以粗体描绘,而FGFR1c和FGFR2c之间同源的连接处序列以斜体描绘。

[0393] 人KLB:

[0394] **FSGDGRAIWSKNPNFTPVNESQLFLYDTFPKNFFWGIGTGALQVEGSWKKDGKGPSIWDHFIHHL**
KNVSSTNGSSDSYIFLEKDLSALDFIGVSFYQFSISWPRLFPDGIVTVANAKGLQYYSTLLDALVLRNI

[0395] EPIVTLYHWDLPALQEKYGGWKNNDTHIDIFNDYATYCFQMFGDRVKYWITIHNPYLVAWHGYGT
GMHAPGEKGNLAAYTVGHNLIAHASKVWHNYNTHFRPHQKGWLSITLGSHWIEPNRSENTMDI
FKCQQSMVSVLGVFANPIHGDGDYPEGMRKKLFSVLPIFSEAEKHEMRGTADFFAFSFGPNNFKPL
NTMAKMGQNVSLNLRALNWKLEYNNPRILIAENGWFTDSRVKTEDTTAIYMMKNFLSQVLQAI
RLDEIRVFGYTAWSLLDGFEWQDAYTIRRGFLFYVDFNSKQKERKPKSSAHYYKQIIRENGFSLKES
TPDVQGQFPCDFSWGVTESVLKPESSVASSPQFSDPHLYVWNATGNRLLHREGEVRLKTRPAQCTD
FVNIKKQLEMLARMKVTHYRFALDWASVLTGNSAVNRQALRYRCVVSEGLKLGISAMVTLY
YPTHAHLGLPELLHADGWLNPSTAEAFQAYAGLCFQELGDLVKLWITINEPNRLSDIYNRSNDT
YGAHNLLVAHALAWRLYDRQFRPSQRGA VSLSLHADWAEPANPYADSHWRAAERFLQFEIAWF
AEPLFKTG DYPAAMREYIASKHRRGLSSSALPRLTEAERRLLKGTVD FFCALNHFTTRFVMHEQLA
GSRYSDDRDIQFLQDITRLSSPTRLAVIPWGVRLKLRWVRRNYGDMDIYITASGIDDDALEDDRRLR
KYYLGKYLQEV LKAYLIDKVKIKGYAFAKLAEEKSKPRFGFFTSDFKAKSSIQFYNKVISSRGFPFE
NSSSRCSQTQENTECTVCLFLVQKKPLIFLGCCFFSTLVLLLSIAIFQRQKRRKFWKAKNLQHIPLK
KGKRVVS (SEQ ID NO: 47).

[0396] 相应于KLB蛋白A的同源大鼠区:

FSGDGKAIWDKKQYVSPVNPGLFLYDTFPPKNFSWGVGTGAFQVEGSWKADGRGPSIWDRIYVDSHLR
GVNSTDRSTDSYVFLEKDLLALDFLGVSFYQFSISWPRLFPNGTVAAVNAKGLQYYRALLDSLVRNIEPI
VTLYHWDLPALTQEEYGGWKNATMIDLFNDYATYCFQTFGDRVKYWITIHNPYLVAWHGFGTGMHAP
GEKGNLTAVTVGHNLIAHASKVWHNYDNFRPHQKGWLSITLGSHWIEPNRTENMEDVINCQHSMS
VLGVFANPIHGDGDYPEFMKTSSVIPEFSEAEKEEVRGTDADFFAFSFGPNNFRPSNTTVKMGQNVSLNLR
QVLNWKLEYDNPRILISENGWFTDSYIKTEDTTAIYMMKNFLNQVLQAIKFDEIQVFGYTAWTLLDGFE
WQDAYTTRRGFLFYVDFNSEQKERKPKSSAHYYKQIIDNGFPLQESTPDMKGQFPCDFSWGVTESVLKP
EFTVSSPQFTDPHLYVWNVTGNRLLYRVEGEVRLKTRPSQCTDYVSIKKRVEMLAKMKVTHYQFALDWT
SILPTGNSKINRQVLRYRCVVSEGLKLGISPMVTLYHPTHSHLGLPMLSSGGWLNNTAKAFQDYA
GLCFKELGDLVKLWITINEPNRLSDMYNRTSNDTYRAAHNLMIAHAQVWHLYDRQYRPVQHGA VLSL
HSDWAEPANPYVESHWKAAERFLQFEIAWFADPLFKTG DYPLAMKEYIASKKQRLSSSVLPRFTLKES
RLVKGTIDFYALNHFTTRFVIHKQLNTNCSVADRVDQFLQDITRLSSPSRLAVTPWGMRLKLGWIRRNRYR
DMDIYVTANGIDDLALEDQIRKYYLEKYVQEALKAYLIDKVKIKGYAFAKLTTEKSKPRFGFFTSDFKA
KSSVQFYSKLISSSGFSSENRSACGQPPEDTECAICSFLTQKKPLIFFGCCFISTLAALLSITIFHHRKRRKF
QKARNLQNIPLKKGHSRVFS (SEQ ID NO: 48).

[0398] 人/大鼠KLB嵌合体:

FSGDGRAIWSKNPNFTPVNESQLFLYDTFPPKNFFWGIGTGALQVEGSWKDKGKGPSIWDHFIHTHL
KNVSSTNGSSDSYIFLEKDLSALDFIGVSFYQFSISWPRLFPDGIVTVANAKGLQYYSTLLDALVLRNI
EPIVTLYHWDLPALQEKYGGWKNNDTHIDIFNDYATYCFQMFGDRVKYWITIHNPYLVAWHGYGT
GMHAPGEKGNLAAYTVGHNLIAHASKVWHNYNTHFRPHQKGWLSITLGSHWIEPNRSENTMDI
FKCQQSMVSVLGVFANPIHGDGDYPEGMRKKLFSVLPIFSEAEKHEMRGTADFFAFSFGPNNFKPL
NTMAKMGQNVSLNLRALNWKLEYNNPRILIAENGWFTDSRVKTEDTTAIYMMKNFLSQVLQAI
RLDEIRVFGYTAWSLLDGFEWQDAYTIRRGFLFYVDFNSKQKERKPKSSAHYYKQIIRENGFSLKES
TPDVQGQFPCDFSWGVTESVLKPESSVASSPQFSDPHLYVWNATGNRLLHREGEVRLKTRPAQCTD
FVNIKKQLEMLARMKVTHYRFALDWASVLTGNSAVNRQALRYRCVVSEGLKLGISAMVTLYHPT
HSHLGLPMLSSGGWLNNTAKAFQDYAGLCFKELGDLVKLWITINEPNRLSDMYNRTSNDTYRAAH
NLMIAHAQVWHLYDRQYRPVQHGA VLSLHSDWAEPANPYVESHWKAAERFLQFEIAWFADPLFKTG
DYPLAMKEYIASKKQRLSSSVLPRFTLKESRLVKGTIDFYALNHFTTRFVIHKQLNTNCSVADRVDQFL
QDITRLSSPSRLAVTPWGMRLKLGWIRRNRYRDMDIYVTANGIDDLALEDQIRKYYLEKYVQEALKAYL
IDKVKIKGYAFAKLTTEKSKPRFGFFTSDFKAKSSVQFYSKLISSSGFSSENRSACGQPPEDTECAICSFLT
QKKPLIFFGCCFISTLAALLSITIFHHRKRRKFQKARNLQNIPLKKGHSRVFS (SEQ ID NO: 49).

[0401] 人/大鼠KLB嵌合体:

[0402]

FSGDGRAIWSKNPNFTPVNESQLFLYDTFPPKNFFWGIGTGALQVEGSWKKDGGKPSIWDHFIHHLKKNVSTNGSSDSYIFLEKDLSALDFIGVSFYQFSISWPRLFPDGIVTVANAKGLQYYSTLLDALVLRNIEPIVTLYHWDLPALQEKYGGWKNDTHIDIFNDYATYCFQMFGDRVKYWITIHNPLYVAWHGYGTGMHAPGEKGNLAAVYTVGHNLIAHASKVWHNYNTHFRPHQKGWLSITLGSHWIEPNRSENTMDIFKCQQSMVSVLGWFANPIHGDGDYPEGMRKKLFSVLPIFSEAEKHEMRGTADFFAFSFGPNNFKPLNTMAKMGQNVSLNLRALNWKLEYNNPRILIAENGWFTDSRVKTEDTTAIYMMKNFLSQVLQAI RLDEIRVFGYTAWSLLDGFEWQDAYTIRRGFLFYVDFNSKQKERKPKSSAHYYKQIIRENGFSLKES TPDVQGGQFPCDFSWGVTE SVLKPE SVASSPQFS DPHLYVWNATGNRLLHRVEGVRLKTRPAQCTDFVNIKKQLEMLARMKVTHYRFALDWASVLTGNLSAVNRQALRYRCVVSEGLKLGISAMVTLYYPTHAHLGLPEPLLHADGWLNPSTAEAFQAYAGLCFQELGDLVKLWITINEPNRLSDIYNRS GNDTYGAAHNLLVAHALAWRLYDRQFRPSQRGAVSLSLHADWAEPANPYVESHWKAERFLQFEIAWFADPLFKTG DYPLAMKEYIASKKQ RGLSSSVLPRFTLKESRLVKGTIDFYALNHFTTRFVIHKQLNTNCSVADR DVQFLQDITRLSSPSRLAVTPWGM RKL LGWIRRN YRDMDIYVTANGIDDLALED DQIRKYYLEKYVQEAL KAYLIDKVKIKGY YAFKLTEEKSKPRFGFFTSDFKAKSSVQFY SKLISSSGFSSENRSPACGQPPEDTECAICSFLTQKKPLIFFGCCFISTLAALLSITIFHHRKRRKFQKARNLQNIPLKKGHSRVFS (SEQ ID NO: 50).

[0403]

人/大鼠KLB嵌合体:

FSGDGRAIWSKNPNFTPVNESQLFLYDTFPPKNFFWGIGTGALQVEGSWKKDGGKPSIWDHFIHHLKKNVSTNGSSDSYIFLEKDLSALDFIGVSFYQFSISWPRLFPDGIVTVANAKGLQYYSTLLDALVLRNIEPIVTLYHWDLPALQEKYGGWKNDTHIDIFNDYATYCFQMFGDRVKYWITIHNPLYVAWHGYGTGMHAPGEKGNLAAVYTVGHNLIAHASKVWHNYNTHFRPHQKGWLSITLGSHWIEPNRSENTMDIFKCQQSMVSVLGWFANPIHGDGDYPEGMRKKLFSVLPIFSEAEKHEMRGTADFFAFSFGPNNFKPLNTMAKMGQNVSLNLRALNWKLEYNNPRILIAENGWFTDSRVKTEDTTAIYMMKNFLSQVLQAI RLDEIRVFGYTAWSLLDGFEWQDAYTIRRGFLFYVDFNSKQKERKPKSSAHYYKQIIRENGFSLKES TPDVQGGQFPCDFSWGVTE SVLKPE SVASSPQFS DPHLYVWNATGNRLLHRVEGVRLKTRPAQCTDFVNIKKQLEMLARMKVTHYRFALDWASVLTGNLSAVNRQALRYRCVVSEGLKLGISAMVTLYYPTHAHLGLPEPLLHADGWLNPSTAEAFQAYAGLCFQELGDLVKLWITINEPNRLSDIYNRS GNDTYGAAHNLLVAHALAWRLYDRQFRPSQRGAVSLSLHADWAEPANPYADSHWRAAERFLQFEIAWFADPLFKTG DYPAAMREYIASKHRRGLSSSALPRLTEAERRLLKGTVD FCA LNHFTTRFVMHEQLA GSR YDS DRDIQFLQDITRLSSPSRLAVTPWGM RKL LGWIRRN YRDMDIYVTANGIDDLALED DQIRKYYLEKYVQEAL KAYLIDKVKIKGY YAFKLTEEKSKPRFGFFTSDFKAKSSVQFY SKLISSSGFSSENRSPACGQPPEDTECAICSFLTQKKPLIFFGCCFISTLAALLSITIFHHRKRRKFQKARNLQNIPLKKGHSRVFS (SEQ ID NO: 51).

[0405]

人/大鼠KLB嵌合体:

FSGDGKAIWDKKQYVSPVNPQGLFLYDTFPPKNFSWGVGTGAFQVEGSWKADGRGPSIWD RYVDSHLRGVNSTDRSTDSYVFLEKDLLALDFLGVSFYQFSISWPRLFPNGTVAAVNAKGLQYYRALLDSLVRNIEPIVTLYHWDLPALTQEEYGGWK NATMIDLFNDYATYCFQTFGDRV KYWITIHNPLYVAWHGFGTGMHAPGEKGNLTAVYTVGHNLIAHASKVWHNYDNFRPHQKGWLSITLGSHWIEPNRTENMEDVINCQHSMS SVLGWFANPIHGDGDYPEFMKTSSVIPEFSEAEKEEVRGTADFFAFSFGPNNFRPSNTVVKMGQNVSLNLRQVLNWKLEYDNPRILISENGWFTDSYIKTEDTTAIYMMKNFLNQVLQAIKFDEIQVFGYTAWTLLDGFEWQDAYTTRRGFLFYVDFNSEQKERKPKSSAHYYKQIIQDNGFPLQESTPDMKGQFPCDFSWGVTE SVLKPEFTVSSPQFTDPHLYVWNVTGNRLLYRVEGVRLKTRPSQCTDYVSIKKRVEMLAKMKVTHYQFALDWT SILPTGNLSKINRQVLRYRCVVSEGLKLGISPMVTLYHPTHSHLGLPMPLLSSGGWLNTNTAKAFQDYA GLCFKELGDLVKLWITINEPNRLSDMYNRTSNDTYRAAHNLMIAHAQVWHLYDRQYRPVQHGA VSLSLHSDWAEPANPYVESHWKAERFLQFEIAWFADPLFKTG DYPLAMKEYIASKKQ RGLSSSVLPRFTLKESRLVKGTIDFYALNHFTTRFVIHKQLNTNCSVADR DVQFLQDITRLSSPTRLAVIPWGV RKL LRWVRRNY GDMDIYITASGIDDQALEDDR LRKY YLGKYLQEV LKAYLIDK VRIKGY YAFKLAE EKSKPRFGFFTSDFKAKSSIQFY NKVISSRGFPFENSSSRCSQTQENTECTVCLFLVQKKPLIFLGCCFFSTLVLLLSIAI FQRQKR RKF WKAKNLQHIPLKKGKR VVS (SEQ ID NO: 52).

[0407]

[0408] 人/大鼠KLB嵌合体:

FSGDGKAIWDKKQYVSPVNPQGFLYDTFKNFSWGVGTGAFQVEGSWKADGRGPSIWDRYVDSHLR
GVNSTDRSTDSYVFLEKDLLALDFLGVSFYQFSISWPRLFPNGTVAAVNAKGLQYYRALLDSLVLNIEPI
VTLYHWDPLTLQEEYGGWKNATMIDLFNDYATYCFQTFGDRVKYWITHNPYLVAWHGFGTGMHAP
GEKGNLTAVYTVGHNLKAHSKVWHNYDKNFRPHQKGWLSITLGSHWIEPNRTENMEDVINCQHSMS
VLGWFANPIHGDGDYPEFMKTSSVIPEFSEAEKEEVRGTADFFAFSFGPNFRPSNTTVKMGQNVSLNLR
QVLNWKLEYDNPRILISENGWFTDSYIKTEDTTAIYMMKNFLNQVLQAIKFDEIQVFGYTAWTLLDGF
WQDAYTTRRGLFYVDFNSEQKERKPKSSAHYYKQIIQDNGFPLQESTPDMKGQPCDFSWGVTESVLKP
EFTVSSPQFTDPLYVWNVGTGNRLLYRVEGVRLKTRPSQCTDYVSIKKRVEMLAKMKVTHYQFALDWT
SILPTGNLSKINRQVLRYYRCVVSEGLKLGISPMVTLYHPTHSHLGLPMPLSSGGWLNNTAKAFQDYA
GLCFKELGDLVKLWITINEPNRLSDMYNRTSNDTYRAAHNLMIAHAQVWHLYDRQYRPVQHGA VLSL
HSDWAEPANPYVESHWKAERFLQFEIAWFADPLFKTG DYPLAMKEYIASKKQRLSSSVLPRFTLKE
RLVKGTIDFYALNHFTTRFVIHKQLNTNCSVADR DVQFLQDITRLSSPSRLAVTPWGMRLKLGWIRNYR
DMDIYVTANGIDDALEDDRLRKYYLGKYLQEV LKAYLIDKVRIKGYAFKLAEEKSKPRFGFFTS
**DFKAKSSIQFYNKVISSRGFPFENSSSRCSQTQENTECTVCLFLVQKKPLIFLGCCFFSTLVLLLSIAIF
QRQRRKFWKAKNLQHIPLKKGKRVVS** (SEQ ID NO: 53).

[0410] 人/大鼠KLB嵌合体:

FSGDGKAIWDKKQYVSPVNPQGFLYDTFKNFSWGVGTGAFQVEGSWKADGRGPSIWDRYVDSHLR
GVNSTDRSTDSYVFLEKDLLALDFLGVSFYQFSISWPRLFPNGTVAAVNAKGLQYYRALLDSLVLNIEPI
VTLYHWDPLTLQEEYGGWKNATMIDLFNDYATYCFQTFGDRVKYWITHNPYLVAWHGFGTGMHAP
GEKGNLTAVYTVGHNLKAHSKVWHNYDKNFRPHQKGWLSITLGSHWIEPNRTENMEDVINCQHSMS
VLGWFANPIHGDGDYPEFMKTSSVIPEFSEAEKEEVRGTADFFAFSFGPNFRPSNTTVKMGQNVSLNLR
QVLNWKLEYDNPRILISENGWFTDSYIKTEDTTAIYMMKNFLNQVLQAIKFDEIQVFGYTAWTLLDGF
WQDAYTTRRGLFYVDFNSEQKERKPKSSAHYYKQIIQDNGFPLQESTPDMKGQPCDFSWGVTESVLKP
EFTVSSPQFTDPLYVWNVGTGNRLLYRVEGVRLKTRPSQCTDYVSIKKRVEMLAKMKVTHYQFALDWT
SILPTGNLSKINRQVLRYYRCVVSEGLKLGISPMVTLYHPTHSHLGLPMPLSSGGWLNNTAKAFQDYA
GLCFKELGDLVKLWITINEPNRLSDMYNRTSNDTYRAAHNLMIAHAQVWHLYDRQYRPVQHGA VLSL
HSDWAEPANPYVESHWKAERFLQFEIAWFADPLFKTG DYPLAMKEYIASKKQRLSSSVLPRFTLKE
RLVKGTIDFYALNHFTTRFVIHKQLNTNCSVADR DVQFLQDITRLSSPSRLAVTPWGMRLKLGWIRNYR
DMDIYVTANGIDDALEDDQIRKYYLEKYVQEAL KAYLIDKVRIKGYAFKLTEEKSKPRFGFFTSDFKA
KSSIQFYNKVISSRGFPFENSSSRCSQTQENTECTVCLFLVQKKPLIFLGCCFFSTLVLLLSIAIFQRQK
RRKFWKAKNLQHIPLKKGKRVVS (SEQ ID NO: 54).

[0412] 人/大鼠KLB嵌合体:

FSGDGKAIWDKKQYVSPVNPQGFLYDTFKNFSWGVGTGAFQVEGSWKADGRGPSIWDRYVDSHLR
GVNSTDRSTDSYVFLEKDLLALDFLGVSFYQFSISWPRLFPNGTVAAVNAKGLQYYRALLDSLVLNIEPI
VTLYHWDPLTLQEEYGGWKNATMIDLFNDYATYCFQTFGDRVKYWITHNPYLVAWHGFGTGMHAP
GEKGNLTAVYTVGHNLKAHSKVWHNYDKNFRPHQKGWLSITLGSHWIEPNRTENMEDVINCQHSMS
VLGWFANPIHGDGDYPEFMKTSSVIPEFSEAEKEEVRGTADFFAFSFGPNFRPSNTTVKMGQNVSLNLR
QVLNWKLEYDNPRILISENGWFTDSYIKTEDTTAIYMMKNFLNQVLQAIKFDEIQVFGYTAWTLLDGF
WQDAYTTRRGLFYVDFNSEQKERKPKSSAHYYKQIIQDNGFPLQESTPDMKGQPCDFSWGVTESVLKP
EFTVSSPQFTDPLYVWNVGTGNRLLYRVEGVRLKTRPSQCTDYVSIKKRVEMLAKMKVTHYQFALDWT
SILPTGNLSKINRQVLRYYRCVVSEGLKLGISPMVTLYHPTHSHLGLPMPLSSGGWLNNTAKAFQDYA
GLCFKELGDLVKLWITINEPNRLSDMYNRTSNDTYRAAHNLMIAHAQVWHLYDRQYRPVQHGA VLSL
HSDWAEPANPYVESHWKAERFLQFEIAWFADPLFKTG DYPLAMKEYIASKKQRLSSSVLPRFTLKE
RLVKGTIDFYALNHFTTRFVIHKQLNTNCSVADR DVQFLQDITRLSSPSRLAVTPWGMRLKLGWIRNYR
DMDIYITASGIDDALEDDRLRKYYLGKYLQEV LKAYLIDKVRIKGYAFKLAEEKSKPRFGFFTS
**DFKAKSSVQFYSKLISSSGFSENRSACGPPEDECAICSF LTQKKPLIFFGCCFISTLAALLSITIFHHRKR
RKFKQARNLQNIPLKKGHSRVFS** (SEQ ID NO: 55).

[0415] 人/大鼠KLB嵌合体:

[0416] FSGDGKAIWDKKQYVSPVNPQGFLYDTFPPKNSWVGVTGAFQVEGSKADGRGPSIWDRYVDSHLR
GVNSTDRSTDSYVFLEKDLLALDFLGVSFYQFSISWPRLFPNGTVAAVNAKGLQYYRALLDSLVRNIEPI
VTLYHWDLPPLTLQEEYGGWKNATMIDLFNDYATYCFQTFGDRVKYWIHNPYLVAWHGFGTGMHAP
GEKGNLTAVYTVGHNLIAHSAKVVHNYDKNFRPHQKGWLSITLGSHWIEPNRTENMEDVINCQHSMS
VLGWFANPIHGDGDYPEFMKTSSVIEFSEAEKEEVRGTAFFAFSFGPNFRPSNTTVVKMGQNVSLNLR
QVLNWKLEYDNPRILISENGWFTDSYIKTEDTTAIYMMKNFLNQVLQAIFDEIQVFGYTAWTLLDGF
WQDAYTTRRGLFYVDFNSEQKERKPKSSAHYYKQIIQDNGFPLQESTPDMKGQFPCDFSWGVTESVLKP
EFTVSSPQFTDPHLYVWNVGTGNRLLYRVEGVRLKTRPSQCTDYVSIKKRVEMLAKMKVTHYQFALDWT
SILPTGNLSKINRQVLRYYRCVVSEGLKLGISPMVTLYHPTHSHLGLPMPLLSSGGWLNNTAKAFQDYA
GLCFKELGDLVKLWITINEPNRLSDMYNRTSNDTYRAAHNLMIAHAQVWHLYDRQYRPVQHGA VLSL
HSDWAEPANPYVESHWKAERFLQFEIAWFADPLFKTG DYPLAMKEYIASKKQRLSSSVLPRFTLKE
RLVKGTIDFYALNHFTTRFVIHKQLNTNCSVADR DV *QFLQDITRLSSPTRLA VIPWGVVRKLLRWVRRNY*
GDMDIYITASGIDDLALEDDQIRKYYLEKYVQEALKAYLIDKVKIKGYAFLKTEESKPRFGFTSDFK
AKSSVQFYSKLISSSGFSSENRSACGQPPEDTECAIC SFLTQKKPLIFFGCCFISTLAALLSITIFHHRKRR
FQKARNLQNIPLKKGHSRVFS (SEQ ID NO: 56).

[0417] 人FGFR1c:

RPSPTLPEQAQPWGAPVEVESFLVHPGDLQLRCRLRDDVQSINWLRDGVQLAESNRTRITGEEVE
VQDSVPADSGLYACVTSSPSGSDTTYFSNVSDALPSEDDDDDDSSSEEKETDNTKPNPVAPYWT
SPEKMEKKLHAVPAAKTVKFKCPSSGTPNPTLRWLKNGKEFKPDHRIGGYKVRYATWSIIMDSVV
PSDKGNYTCIVENEYGSINHTYQLDVVERSHPRPILQAGLPANKTVALGSNVEFMCKVYSDPQPHIQ
WLKHIEVNGSKIGPDNLPIVYQILKTAGVNTTDKEMEVLHLRNVSFEDAGEYTCLAGNSIGLSHSA
WLTVLEALEERPAVMTSPLYLEIHYCTGAFLISCMVGSVIVYKMKSGTKKSDFHQSMAVHKLAKSI
[0418] PLRRQVTVSADSSASMSGVLLVRPSRLSSSGTPMLAGVSEYELPEDPRWELPRDRLVLGKPLGEG
CFGQVVLAEAIGLDKDKPNRVTKVAVKMLKSDATEKDLSDLISEMEMMKMIGKHKNIINLLGACT
QDGPLYVIVEYASKGNLREYLQARRPPGLECYNPSHNPEEQLSKDLVSCAYQVARGMEYLASK
KCIHRDLAARNVLVTEDNVMKIADFG LARDIHHIDYKKTNGRLPVKWMAPAELFDRIYTHQSD
VWSFGVLLWEIFTLGGSPYPGPVVEELFKLLKEGHRMDKPSNCTNELYMMMRDCWHAVPSQRPT
FKQLVEDLDRIVALTSNQEYLDLSMPLDQYSPSPDTRSSSTCSSGEDSVFSHEPLPEEPCLPRHPAQL
ANGGLKRR (SEQ ID NO: 57).

[0419] 人FGFR2c:

RPSFSLVEDTTLEPEEPPTYQISQPEVYVAAPGESLEVRCLLKDAAVISWTKDGVHLGPNNRTVLIGEYL
QIKGATPRDSGLYACTASRTVDSETWYFMVNVTDAISSGDEDDTDGAEDFVSENSNNKRAPYWTNTE
KMEKRLHAVPAANTVKFRCPAGGNPMPTMRWLKNGKEFKQHRIGGYKVRNQHWSLIMESVPSDKG
NYTCVVENEYGSINHTYHLDVVERSHPRPILQAGLPANASTVVGGDVEFVCKVYSDAQPHIQWIKHVEK
NGSKYGPDLPLYLKVLAAGVNTTDKEIEVLYIRNVTFEDAGEYTCLAGNSIGISFHSAWLTVPAPGRE
KEITASPDYLEIAIYCIGVFLIACMVVTVILCRMKNNTKKPDFSSQPAVHKLTKRIPLRQVTVSAESSSSM
[0420] NSNTPLVRITRLSSTADTPMLAGVSEYELPEDPKWEFPRDKLTGKPLGEGCFGQVVM AEAVGIDKDKP
KEAVTVAVKMLKDDATEKDLSDLVSEMEMMKMIGKHKNIINLLGACTQDGPLYVIVEYASKGNLREYL
RARRPPGMEYSYDINRVPEEQMTFKDLVSCTYQLARGMEYLASQKCIHRDLAARNVLVTENNVMKIAD
FGLARDINNIDYKKTNGRLPVKWMAPAELFDRVYTHQSDVWSFGVLMWEIFTLGGSPYPGIPVEELF
KLLKEGHRMDKPANCTNELYMMMRDCWHAVPSQRPTFKQLVEDLDRILTLTTNEEYLDLSQPLEQYSP
SYPDTRSSCSSGDDSVFSPDPMPYEPCLPQYPHINGSVKT (SEQ ID NO: 58).

[0421] FGFR1c/FGFR2c嵌合体:

- [0422] **RPSPTLPEQAQPWGAPVEVESFLVHPGDLLQLRCRLRDDVQSINWLRDGVQLAESNRTRITGEEVE
VQDSVPADSGLYACVTSSPSGSDTTYFSVNVSDALPSEDDDDDDSSSEEKETDNTKPNPVAPYWT
SPEKMEKKLHAVPAAKTVKFKCPSSGTPNPTLRWLKNGKEFKPDHRIGGYKVRATWSIIMDSVV
PSDKGNYTCIVENEYGSINHTYQLDVVERSHPRPILQAGLPANKTVALGSNVEFMCKVYSDPQPHIQ
WLKHIEVNGSKIGPDNLPIYVQILKTAGVNTTDEKEMEVLHLRNVSFEDAGEYTCLAGNSIGLSHSA
WLTVLEALEERPAMVTS/DYLEIAIYCIGVFLIACMVVTVILCRMKNNTTKKPDFSSQPAVHKLTKRIPLR
RQVTVSAESSSSMNSNTPLVRITTRLSTADTPMLAGVSEYELPEDPKWEFPRDKLTLGKPLGEGCFGQV
VMAEAVGIDKDKPKEAVTVAVKMLKDDATEKDLSDLVSEMEMMKMIGKHKNINLLGACTQDGPLYVI
VEYASKGNLREYLRARRPPGMEYSYDINRVPEEQMTFKDLVSCTYQLARGMEYLASQKCIHRDLAARN
VLVTENVMKIADFGFLARDINNIDYKKTNGRLPVKWMAPALFDRVYTHQSDVWSFGVLMWEIFTL
GGSPYPGIPVEELFKLLKEGHRMDKPANCTNELYMMMRDCWHAVPSQRPTFKQLVEDLDRILTLTNEE
YLDLSQPLEQYSPSPDTRSSCGGDSVFSPPMPYEPCLPQYPHINGSVKT (SEQ ID NO: 59).**
- [0423] FGFR1c/FGFR2c嵌合体:
**RPSFSLVEDTTLEPEEPPTYQISQPEVYVAAPGESLEVRCLLKDAAVISWTKDGVHLGPNNRTVLIGEYL
QIKGATPRDSGLYACTASRTVDSETWYFMVNVTDIAISSGDEDDTDGAEDFVSENSNNKRAPYWTNTE
KMEKRLHAVPAANTVKFRCPAGGNPMPTMRWLKNGKEFKQEHRRIGGYKVRNQHWLIMESVVPDCKG
NYTCVVENEYGSINHTYHLDVVERSHPRPILQAGLPANASTVVGDDVEFVCKVYSDAQPHIQWIKHVEK
NGSKYGPDGLPYLKVLAAGVNTTDEKIEVLYIRNVTFEDAGEYTCLAGNSIGISFHSALWTLVPAPGRE
KEITAS/PLYLEIIIIYCTGAFLISCMVGSVIVYKMKSGTKKSDFHSMQMAVHKLAKSIPLRRQVTVSADS
SASMNSGVLLVRPSRLSSSGTPMLAGVSEYELPEDPRWELPRDRLVLGKPLGEGCFGQVVLAEIG
LDKDKPNRVTKVAVKMLKSDATEKDLSDLISEMEMMKMIGKHKNINLLGACTQDGPLYVIVEYA
SKGNLREYLQARRPPGLECYNPSHNPEEQLSKDLVSCAYQVARGMEYLASKKCIHRDLAARNV
LVTEDNMKIADFGFLARDIHHIDYKKTNGRLPVKWMAPALFDRIYTHQSDVWSFGVLLWEIF
TLGGSPYPGVPVEELFKLLKEGHRMDKPSNCTNELYMMMRDCWHAVPSQRPTFKQLVEDLDRIV
ALTSNQEYLDLSMPLDQYSPSPDTRSSCGGDSVFSHEPLPEEPCLPRHPAQLANGGLKRR (SEQ
ID NO: 60).**
- [0425] FGFR1c/FGFR2c嵌合体:
- [0426] **RPSPTLPEQAQPWGAPVEVESFLVHPGDLLQLRCRLRDDVQSINWLRDGVQLAESNRTRITGEEVE
VQDSVPADSGLYACVTSSPSGSDTTYFSVNVSDALPSEDDDDDDSSSEEKETDNTKPNPVAPYWT
SPEKMEKKLHAVPAAKTVKFKCPSSGTPNPTLRWLKNGKEFKPDHRIGGYKVRATWSIIMDSVV
PSDKGNYTCIVENEYGSINHTYQLDVVERSHPRPILQAGLPANASTVVGDDVEFVCKVYSDAQPHIQ
WIKHVEKNGSKYGPDGLPYLKVLAAGVNTTDEKIEVLYIRNVTFEDAGEYTCLAGNSIGISFHSAL
WLTVLPAPGREKEITAS/DYLEIAIYCIGVFLIACMVVTVILCRMKNNTTKKPDFSSQPAVHKLTKRIPLRR
QVTVSAESSSSMNSNTPLVRITTRLSTADTPMLAGVSEYELPEDPKWEFPRDKLTLGKPLGEGCFGQVV
MAEAVGIDKDKPKEAVTVAVKMLKDDATEKDLSDLVSEMEMMKMIGKHKNINLLGACTQDGPLYVIV
EYASKGNLREYLRARRPPGMEYSYDINRVPEEQMTFKDLVSCTYQLARGMEYLASQKCIHRDLAARNV
LVTENVMKIADFGFLARDINNIDYKKTNGRLPVKWMAPALFDRVYTHQSDVWSFGVLMWEIFTLG
GSPYPGIPVEELFKLLKEGHRMDKPANCTNELYMMMRDCWHAVPSQRPTFKQLVEDLDRILTLTNEEY
LDLSQPLEQYSPSPDTRSSCGGDSVFSPPMPYEPCLPQYPHINGSVKT (SEQ ID NO: 61).**
- [0427]
- [0428] FGFR1c/FGFR2c嵌合体:

RPSFSLVEDTTLEPEEPPTKYQISQPEVYVAAPGESLEVRCLLKDAAVISWTKDGVHLGPNNRTVLIGEYL
QIKGATPRDSGLYACTASRTVDSETWYFMVNVTDIAISSGDDDDTDGAEDFVSENSNNKRAPYWTNTE
KMEKRLHAVPAANTVKFRCPAGGNPMPTMRWLKNGKEFKQEHRIGGYKVRNQHWSLIMESVVP SDKG
NYTCVVENEYGSINHTYHLDVVERSPHRPILQAGLPANKTVALGSNVEFMCKKVYSDPQPHIQWLKHIEV
NGSKIGPDNLPLYVQILKTAGVNTT DKEMEV LHLRNV SFEDAGEYTCLAGNSIGLSHHS AWLTVLEA
LEERPAVMTSPLYLEIIYCTGAFLISCMVGSVIVYKMKSGTKKSD FHSQMAVHKLAKSIPLRRQVT
[0429] VSADSSASMNSGVLLVRPSRLSSSGTPMLAGVSEYELPEDPRWELPRDRLVLGKPLGEGCFGQVVL
AEAIGLDKDKPNRVTKVAVKMLKSDATEKDLSDLISEMEMMMKMIGKHKNINLLGACTQDGPLYV
IVEYASKGNLREYLQARRPPGLEICYNPSHNPEEQ LSSKDLVSCAYQVARGMEYLASKKCIHRDLA
ARNVLVTEDNVMKIADFG LARDIHHIDYKKT TNGRLPVKWM APEALFDRIYTHQSDVVSFGVLL
WEIFTLGGSPYPGPVVEELFKLLKEGHRMDKPSNCTNELYMMMRDCWHAVPSQRPTFKQLVEDL
DRIVALTSNQEYLDLSMPLDQYSPSPDTRSS TCSGSDSVFSHEPLPEECLPRHPAQLANGGLKRR
(SEQ ID NO: 62).

[0430] 在Octet Red384系统(Pall Life Sciences, Menlo Park, CA)上,使用抗小鼠Fc或抗人Fc捕获生物传感器,以8-通道或16-通道模式,通过生物膜层干涉术(BioLayer Interferometry)进行了表位分仓实验(图11A-11B)。该测定试验由七步结合循环组成:1)将抗小鼠Fc生物传感器浸入运行缓冲液(1×动力学缓冲液, ForteBio 18-5032)中1min以建立基线,2)捕获20μg/ml小鼠IgG2a(参照)抗体10分钟,3)建立另一个基线1.5分钟,4)加载100mM人KLB 10分钟,建立第三个基线1.5分钟,和6)允许5μg/ml人IgG1(测试)抗体结合10分钟,和7)解离10分钟。相似地进行了使用抗人Fc捕获生物传感器的表位分仓。图11中的总结表明了针对每个抗体确定的表位仓(bins)。

[0431] 图12举例说明了实例生物膜层干涉实验。在此实例中,2C12(人IgG1)与23B3竞争结合重组KLB,但不与28B7或8C5(小鼠IgG)竞争。

[0432] 实施例6:三链双特异性IgG:用于快速筛选双特异性抗体的抗体平台

[0433] 材料和方法

[0434] 通过毛细管电泳表征纯化的抗体

[0435] 在Caliper GX II微流体系统(PerkinElmer Biotechnology, Waltham, MA, USA)上分析了样品。所有样品按照之前所述的制备(Kim, 2016)。根据LabChip GXII使用者指南中提供的制造商说明书,准备芯片。

[0436] 通过LC-MS/MS表征纯化的抗体

[0437] 使用Agilent 6230TOF LC-MS系统和1290Infinity HPLC(Agilent Technology, Santa Clara, CA)来获取质谱数据。用4.6mm×50mm PLRP-S反相柱(Agilent Technology, Santa Clara, CA)来分离IgG。使用MassHunter软件(Qualitative Analysis B.04.00),通过最大熵去卷积,获得了完整质量。

[0438] Biacore动力学分析

[0439] 为了tcIgG和传统IgG的结合亲和力测定,使用BIAcore T200和蛋白A传感芯片进行表面等离子体共振测量(SPR),并且在25℃将作为分析物的单体人KLB的稀释液注射在固定的tcIgG或传统IgG上,以测定单价亲和力。使用简单一对一Langmuir结合模型计算了结合速率(kon)和解离速率(koff)。作为koff/kon比值计算了平衡解离常数(Kd)。

[0440] Western印迹

[0441] 从Lonza(Walkersville, MD)获取人原代皮下前脂肪细胞。根据供应商的实验方案,使细胞生长和分化。简而言之,将细胞生长于含有FBS、L-谷氨酰胺和GA-100的前脂肪细

胞基础培养基-2中。一旦汇合,将细胞在含有地塞米松、吡啶美辛和3-异丁基-甲基黄嘌呤(IBMx)的生长培养基中分化。对于ERK信号分析,将细胞分化10天,在无血清培养基中生长3小时,并随后进一步用所示抗体再培养一小时。通过在含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂片(Roche,USA)的 $2\times$ LDS缓冲液(Invitrogen,USA)中裂解细胞来产生细胞提取物。将样品通过标准方法用于western印迹分析。用于western印迹分析的抗体来自Cell Signaling Technology (Danvers,MA):pERK1/2(T202/204)(目录#4370)、ERK1/2(目录#4695)和HSP90(目录#4874)。

[0442] 结果

[0443] V_L -HC融合和 C_L 反式表达解决BsIgG的关连轻链配对问题

[0444] 新的三链BsIgG(tcBsIgG)形式的示意图显示于图18A中。在此新平台中,通过之前所述的“杵进臼”突变(Ridgway,1996;Atwell;1997)完成了重链的杂二聚化。为了设计 V_L -HC融合(VLfH)并获得正确的重-轻链配对,使用短的(Gly₄Ser)₄接头,将抗体VL结构域的C-末端栓系至重链的N-末端,与抗体scFv的设计相似(图18A,左)。蛋白A亲和柱纯化回收后基于毛细管电泳(CE-SDS),没有 C_L 的单独VLfH在HECK293细胞中的表达只导致微量的或没有VLfH表达(图18B,泳道1)。抗体CH1结构域的折叠需要与 C_L 结构域配对的之前观察结果,被归于此结果(Feige,2009)。与 C_L 结构域的配对被提出可以充当最后的质量控制步骤,并且确保只有正确折叠的抗体才被分泌(Feige,2014)。为了对此进行测试,本发明人尝试确定分离的 C_L 结构域是否可以弥补CH1结构域的折叠并允许VLfH杂合蛋白的生产性分泌(图18A,右),从而导致三-链IgG(tcIgG)。以IgG1、2和4同种型以及IgG1和IgG4的缺糖基化(aglycosylated)(N₂₉₇G)形式,制备了抗KLB抗体,克隆28B7单表位tcIgG。编码 C_L 结构域的分开质粒共转染后,抗体以与完整的亲本抗体相当的产量被成功回收(图18B)。尽管人IgG1同种型的BsIgG是用于目前临床研发的主要抗体类别,但其他同种型也用作常用手段用于单特异性抗体来调节抗体效应子功能和抗体活性。因此,评价了该tcIgG技术是否可以翻译成其他治疗上相关的人同种型IgG2和IgG4。 C_L 结构域的需求在IgG2和IgG4的VLfH的表达中是一致的,并且具有N297G突变的IgG1和IgG4的常见缺糖基化形式具有相似表现(图18B)。 C_L 共表达后的整体产量与相应野生型IgG同种型对照相当。通过电泳分析,证明有效地形成了 C_L 和CH1之间的链间二硫键。因此,对于抗体的生产性折叠和分泌,抗体 V_L 和 C_L 结构域不需要共价连接为单个多肽链。

[0445] 接着,针对双特异性抗体的潜在生产,评价了tcIgG形式是否与杵进臼突变相容。比较杵和臼半IgG在单独或共同表达时的表达和装配。如之前观察到的,杵或臼自身的表达主要导致了半抗体和一些共价同型二聚体(图18C)。在标准IgG和tcIgG形式之间没有观察到表达或装配的主要差异。杵和臼半抗体在同一细胞中的共同表达,在IgG1、IgG2和IgG4全部三种主要人同种型中,导致了150KDa物质的有效装配(图18C)。观察到人tcIgG2和tcIgG4作为单特异性二价tcIgG以及双特异性tcIgG形式的产量和产品质量,与其相应的IgG同种型相当。

[0446] 为了确保tcIgG杵和tcIgG臼的单细胞表达不影响抗体重链的杂二聚体形成,通过质谱分析了纯化的抗体(图18D)。只检测到少量的同型二聚体杂质。因为它们的丰量与传统的BsIgG相当,本发明人得出结论:具有分离的 C_L 结构域的栓系VLfH形式,在此称为三链IgG(tcIgG)形式,不会不利地影响杂二聚体形成。

[0447] tcBsIgG形式的抗KLB双表位抗体的产生

[0448] 为了产生源自上述五个抗KLB单克隆抗体的双表位抗体, 首先将每个抗体克隆至VLfH杆和VLfH臼载体中。这能够产生25个tcIgG形式的不同抗体(表8), 包括以两个重链方向(即, 杆/臼和臼/杆)的10种可能双表位组合。对于每个抗体组合, 为两个杆-臼方向提供了独立的重复。此外, 以tcIgG杆和tcIgG臼共表达形式产生了亲本单特异性抗体(表8, 灰色格)以作为基准, 并包括了阳性(表8; (+) Exp Ctrl)和阴性(表8; (-) Exp Ctrl)杆和臼tcIgG表达对照, 以与五个抗KLB单克隆抗体配对。

[0449] 表8在HEK293T细胞中表达并通过MabSelectSure纯化后tcIgG的回收产量 (mg/L)

杆\臼	(+) Exp Ctrl. 臼	(-) Exp Ctrl. 臼	12B8. 臼	2C12. 臼	23B3. 臼	28B7. 臼	4H7. 臼
(+) Exp Ctrl.杆	159	29	120	170	122	186	181
(-) Exp Ctrl.杆	41	5	55	44	43	37	54
12B8 杆	144	62	119	190	161	179	205
2C12 杆	179	38	150	184	132	152	199
23B3 杆	150	35	121	122	87	83	139
28B7 杆	179	47	219	246	173	208	235
4H7 杆	155	66	172	250	171	197	249

[0451] 通过毛细管电泳表征了所有25个tcIgG抗体并且证明了相当的装配效率。所有抗体的主要条带为约~150kDa, 表明正确的结构域配对和二硫键形成(图19A)。本发明人注意到, 亲本抗体的无效表达也限制所得到的双表位抗体的表达产量。这是通过杆进臼突变进行有效杂二聚化的结果。例如, 阴性表达对照tcIgG, 当作为二价抗体表达时以及当与任何其他抗体共表达时, 具有低产量(图19A和19B)。同时, 这确保了最少的同型二聚体形成, 如通过质谱分析所证实的。

[0452] 为了进一步表征tcIgG, 通过分析性大小排阻色谱(SEC)分析了这些抗体。HTP表达和通过蛋白A色谱的单柱纯化后, tcIgG具有1%至70%范围的高分子量(HMW)物质, 这看起来与亲本tcIgG的特性相关, 这也与其亲本标准IgG相关。共表达为杆和臼tcIgG的阳性表达对照tcIgG不具有HMW物质, 但两个相对低表达的抗KLB tcIgG(12B8和23B3)具有量高得多的HMW物质(图19C)。令人感兴趣地, 将表现良好的tcIgG半抗体与表现差的tcIgG半抗体共同表达时, HMW物质的量被平均, 与共表达阳性表达对照tcIgG和12B8 tcIgG以及共表达表现差的12B8 tcIgG和表现略好的23B3 tcIgG的情况相同(图19C)。尽管HMW可能影响每个抗体的活性, 但本发明人决定继续在荧光素酶报告分子测试中表征这25个抗体。额外的柱步骤将降低通量, 因此本发明人决定之后用更纯化的材料来验证活性。

[0453] 抗KLB tcBsIgG双表位抗体的体外筛选鉴定出5个优良的可以翻译成少接头BsIgG的对

[0454] 抗KLB tcBsIgG双表位抗体的体外筛选描述于实施例2中。鉴定出五个优良的可以翻译成少接头(linkless)BsIgG的对:12B8/23B3、12B8/2C12、23B3/28B7、2C12/28B7和4H7/28B7(图3-6)。

[0455] 为了确保tcIgG形式中的接头在筛选过程中不干扰双表位tcIgG的结合亲和力,以tcIgG1以及标准IgG1形式,通过Biacore评价了具有最高相对激动活性的抗体4H7和28B7的结合动力学。对于这两种形式,没有观察到结合动力学的显著差异,表明tcIgG形式保留了亲本抗体的结合动力学(表9)。

[0456] 表9. IgG和tcIgG形式的抗KLB抗体28B7和4H7的结合动力学。

[0457] 值是两个独立Biacore实验的平均值±范围。

	抗体克隆和形式	$K_{on}/10^5 (M^{-1} s^{-1})$	$k_{off}/10^{-4}$	$K_d (nM)$
[0458]	28B7 IgG	1.044 .044for	2.76 ± 0.08	2.65 ± 0.14
	28B7 tcIgG	1.172 ± 0.019	2.44 ± 0.09	2.06 ± 0.11
	4H7 IgG	5.710 ± 0.176	4.44 ± 0.13	0.78 ± 0.05
	4H7 tcIgG	3.322 ± 0.092	4.27 ± 0.07	1.29 ± 0.06

[0459] 抗体同种型对抗体激动剂活性的影响

[0460] 之前已经报道了抗体同种型可以调节抗体的激动剂和配体模拟活性(White, 2014; Sampei, 2014)。因此,本发明人研究了抗体同种型是否影响4H7/28B7双表位抗体的活性,所述抗体相对于其他双表位对具有最高的激动特性。以人IgG1、IgG2和IgG4同种型形式,产生了该抗体(体外装配),并在荧光素酶报告分子测试中比较了不同同种型的活性(图20A)。对于人IgG2构建体,将第二个铰链半胱氨酸(C233Kabat编号,与C220S EU编号相同)突变成丝氨酸,以允许最有效地体外装配。在这个测试中,IgG1同种型的4H7/28B7双表位抗体的活性大约是IgG2同种型的两倍,而IgG4同种型具有中间的活性水平。这三个抗体的EC50是相似的,与抗体同种型不影响结合亲和力的观点一致。

[0461] 接着,评价延伸至评估人原代脂肪细胞中的ERK1/2磷酸化。对于这个测试,用各种单克隆抗体处理分化的原代人脂肪细胞,并且通过western印迹评估了ERK1/2磷酸化的水平。使用原代细胞的该测试的结果与荧光素酶报告分子测试相一致;在IgG1、IgG2和IgG4同种型背景之任一个中,4H7/28B7双表位抗体都可以作为激动剂起作用(图20B和20C)。此外,与单个亲本分子活性相比,4H7和28B7抗体以1:1混合物组合或以单分子双表位抗体形式组合时,都呈现出较好的活性。

[0462] 讨论

[0463] 之前已经证明,双特异性和双表位抗体可以作为有效的配体模拟物起作用。然而,常常难以发现这些抗体,需要筛选多达上千个组合来鉴定独特的功能性组合(Zhang, 2012; Kitazawa, 2012; Kolumam, 2015)。本文描述的tcBsIgG形式提供了一种新的系统,可以简单地表达和产生BsIgG,从而允许高通量地筛选大量BsIgG组合。使用这种策略,证明了通过共配制或组合成双表位抗体,可以进一步增强激动剂抗体的活性。从亲本抗体的表征,完全不可能预期呈现增强活性的双表位组合,这证明了tcBsIgG系统的实用性。该观察结果可以延

伸至其他激动剂抗体,例如,靶向OX40、CD27或GITR和导致免疫刺激活性的那些激动剂抗体。

[0464] tcBsIgG形式在抗体结构中含有改变,特别是可能在体内引起免疫原性反应的接头和CL N-末端的新表位的添加。然而,这些问题对于体外筛选活性是不重要的。一旦鉴定出一些具有前景的抗体,可以将选定数量的BsIgG重新制备为常规BsIgG形式,用于下游临床前和临床研发。至此,对于任何筛选形式,重要的是可以将所获得的结果以常规BsIgG形式重现。本文中描述的tcIgG形式保留了抗体的整体结构,并且能够将结果翻译成对于临床应用更期望的少接头的BsIgG。这相对于其他技术是一个优势,所述其它技术如scFv与杂二聚Fc的融合(Moore, 2011),这种融合在生产双特异性分子时可能提供与tcBsIgG形式相似的通量,但会改变靶臂之间的几何形状和距离。此外,tcBsIgG形式优于其他BsIgG形式的另一个优势在于,需要克隆较少总量的质粒(即,对于每个半抗体,只需一个质粒)来产生双特异性抗体的矩阵。除了在药物研发中的抗体筛选,tcIgG形式具有产生用于诊断应用的双特异性抗体的潜能。在单细胞中产生IgG的能力提供了一种成本有效的生产BsIgG的方式。

[0465] tcIgG形式的另一个优势是,其适用于IgG2和IgG4同种型。已经报道了抗体同种型特异性活性。例如,之前已经报道,抗CD40的人IgG2抗体展示出优于人IgG1和IgG4同种型的超激动剂活性(White, 2014)。此外,已经报道,针对因子IXa/X的双特异性抗体的因子VIII配体模拟物活性的幅度取决于抗体类别(Sampe, 2014)。基于这些观察,比较了人IgG1、IgG2和IgG4同种型的4H7/28H7先导双表位IgG的激动剂活性。尽管在抗体同种型之间观察到了显著差异,但人IgG1显示出最佳激动剂活性。这可能部分归因于最初以人IgG1形式筛选抗KLB对的事实。可能地,如果使用所有同种型的BsIgG进行初筛,则可能选择出不同的对和同种型。tsIgG形式与其他人同种型的相容性使得能够进行这种筛选。此外,这也使得能够与Fc γ 受体不同缔合来形成三元复合物。尽管这在抗KLB模型系统中无关,但这可能对于开发靶向肿瘤的激动剂抗体是重要的。

[0466] 总之,tcBsIgG形式提供了一个筛选BsIgG用于宽泛应用的优良系统。

[0467] 实施例7:结合亲和力和测试

[0468] 在本实施例中,进一步分析了公开的双特异性抗体,以确定其结合亲和力。测定了IgG形式和tcIgG形式的抗KLB抗体克隆28B7和4H7的结合亲和力参数(k_a (1/Ms)、 k_d (1/s)和KD(nM)) (图21)。在每个抗体克隆内,传统IgG形式和tcIgG形式之间的结合亲和力差异是微小的。例如,克隆28B7的IgG形式和tcIgG形式的KD分别为2.65nM和2.05nM。克隆4H7的IgG形式和tcIgG形式的KD分别为0.78nM和1.29nM。

[0469] 参考文献

[0470] Atwell, S., Ridgway, J. B., Wells, J. A. 和 Carter, P. (1997) *J Mol Biol*, 270 26-35.

[0471] Feige, M. J. 和 Buchner, J. (2014) *Biochim. Biophys. Acta*, 1844 2024-2031.

[0472] Feige, M. J., Groscurth, S., Marcinowski, M., Shimizu, Y., Kessler, H., Hendershot, L. M. 和 Buchner, J. (2009) *Mol Cell*, 34 569-579.

[0473] Kim, H. S. (2016) *MAbs*, 8 1536-1547.

[0474] Kitazawa, T. 等 (2012) *Nat Medicine*, 18 1570-1574.

[0475] Kolumam, G. 等 (2015) *EBioMedicine*, 2 730-743.

- [0476] Moore, G.L. 等 (2011) MAbs, 3 546-557.
- [0477] Ridgway, J.B., Presta, L.G. 和 Carter, P. (1996) Protein Eng., 9 617-621.
- [0478] Sampei, Z. 等 (2014) MAbs 0-00.
- [0479] White, A.L. 等 (2014) Cancer Cell 1-25.
- [0480] Zhang, H., Wilson, I.A. 和 Lerner, R.A. (2012) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 109 15728-15733.
- [0481] 除了描述和要求保护的各个实施方案, 公开的主题还涉及具有本文中公开和要求保护的特征的其他组合的其他实施方案。因此, 本文中呈现的特定特征可以以其他方式在本公开主题的范围彼此组合, 由此本公开的主题包括本文中所公开特征的任何合适的组合。为了举例说明和描述的目的, 已经在之前对本公开主题的特定实施方案进行了描述。这不旨在为穷举性的, 不旨在将本公开的主题限于所公开的这些实施方案。
- [0482] 本领域技术人员将清楚在所公开主题的组合和方法中可以进行各种改变和变化, 而不脱离所公开主题的精神或范围。因此, 本公开的主题旨在包括落入后附权利要求及其等同范围内的改变和变型。本文中引用了各种出版物、专利和专利申请, 将其内容全部按引用并入本文中。

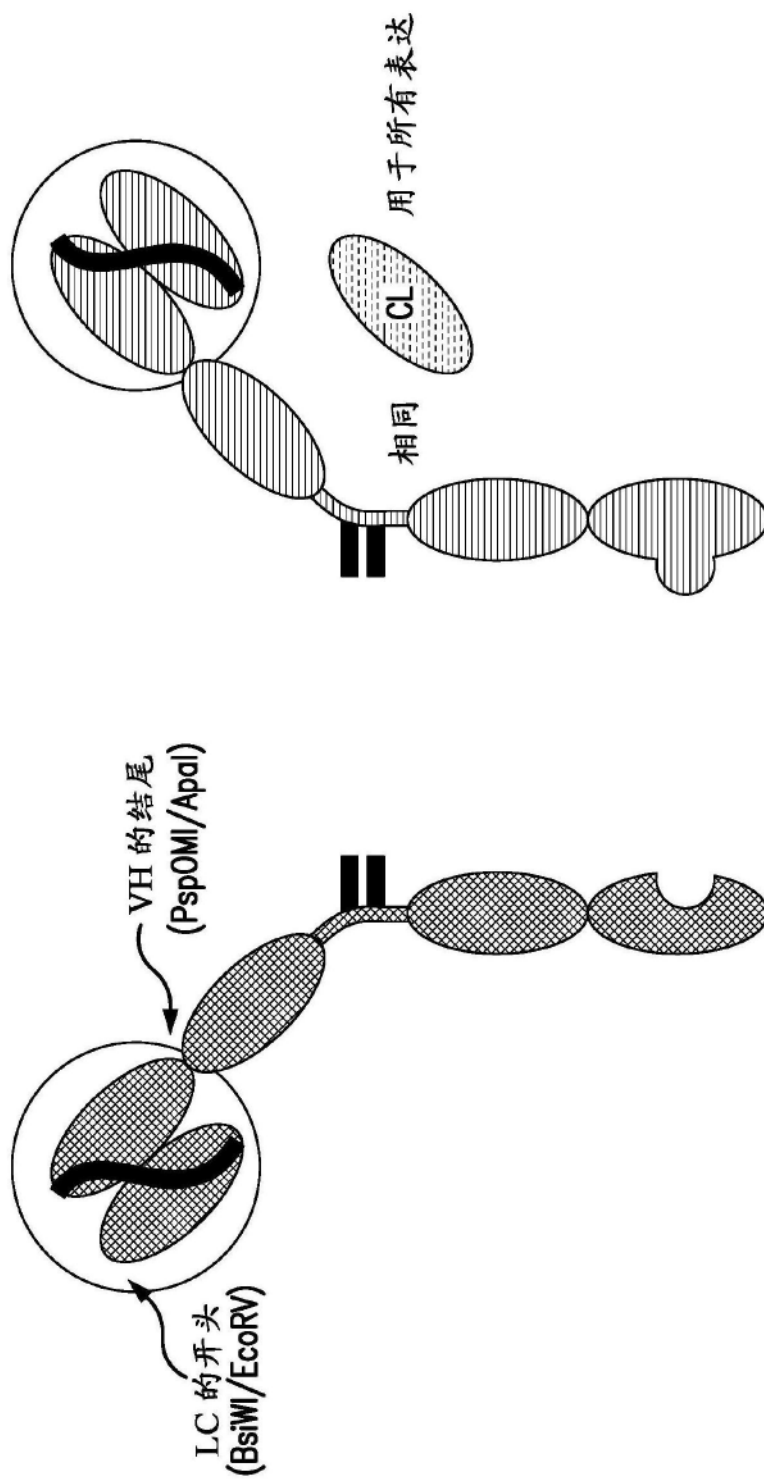


图1A

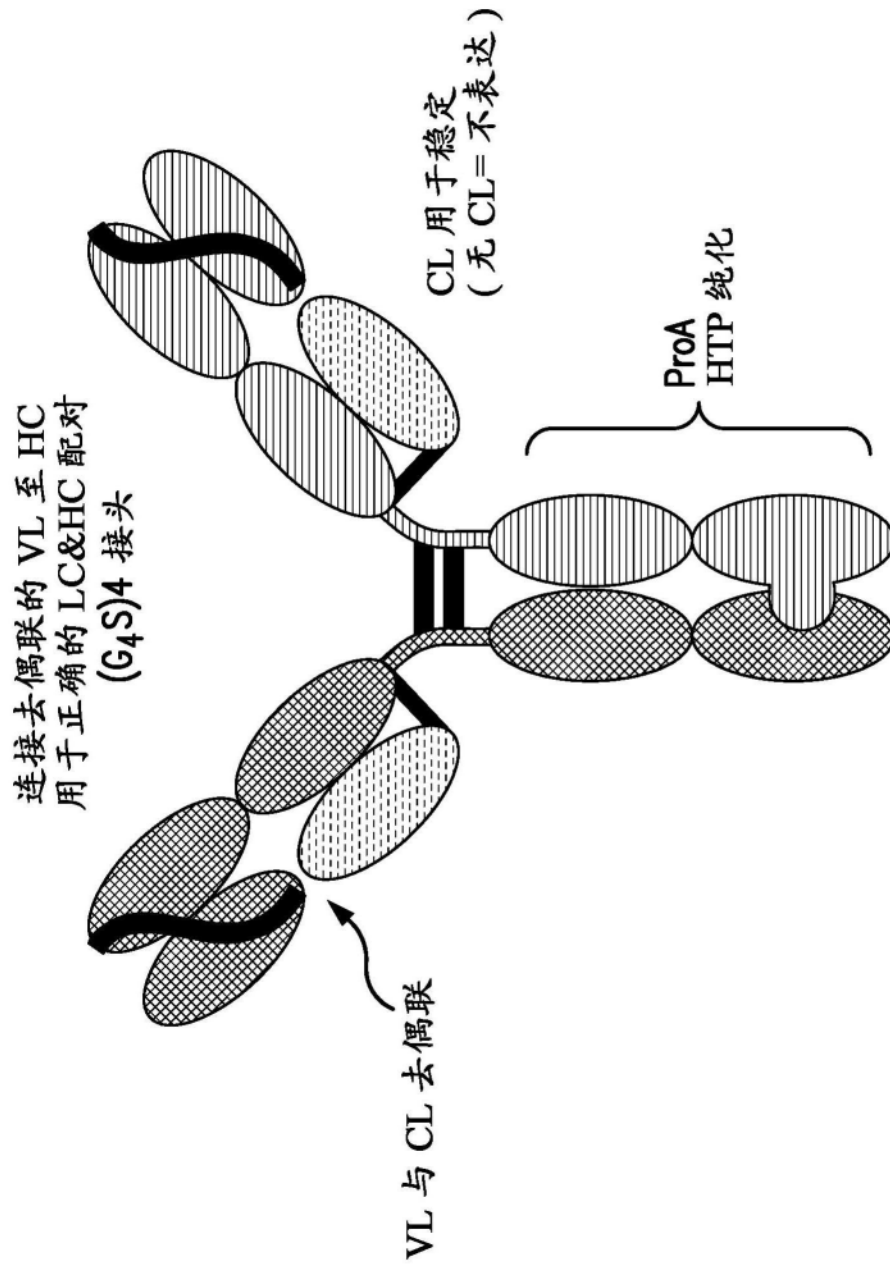


图1B

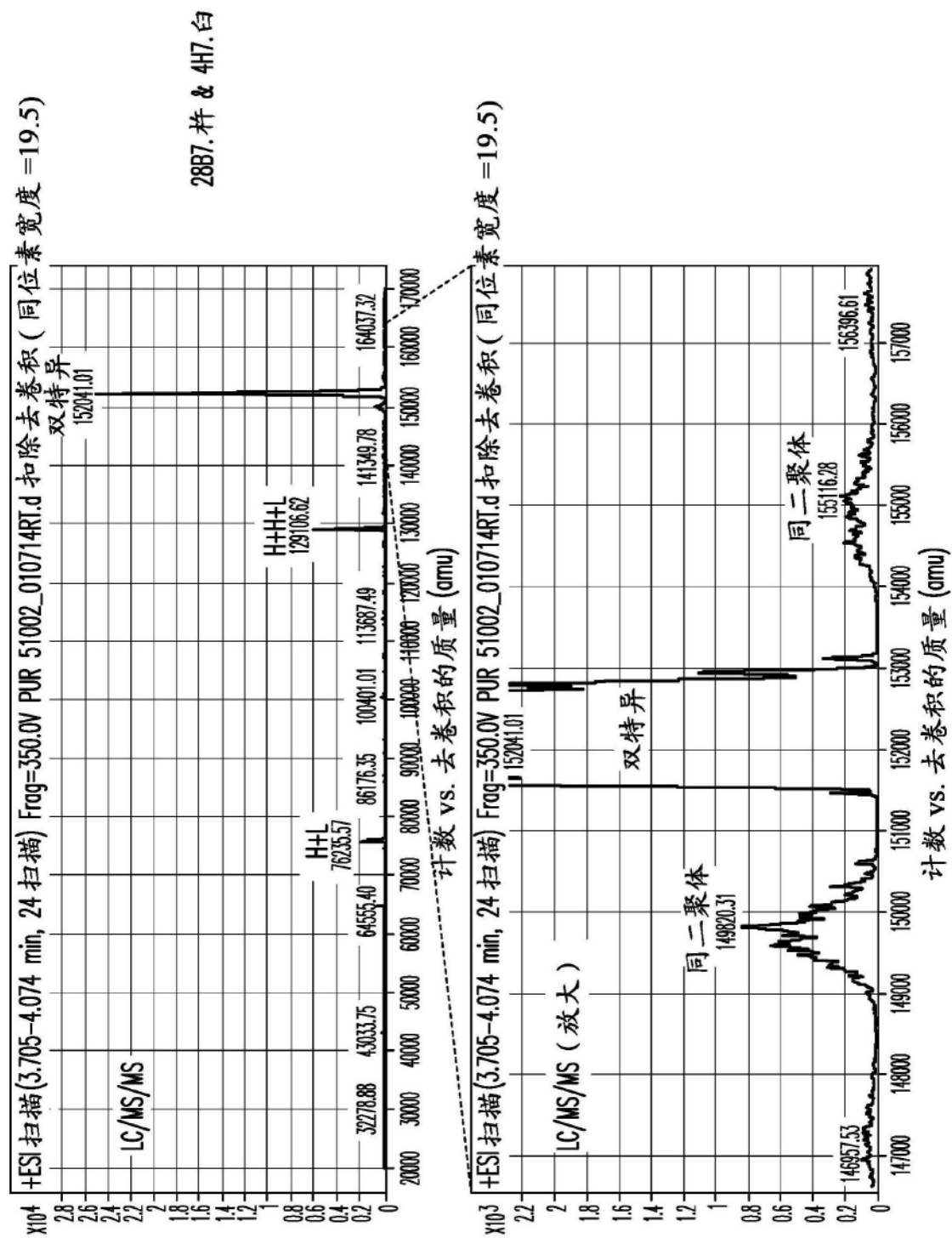


图2A

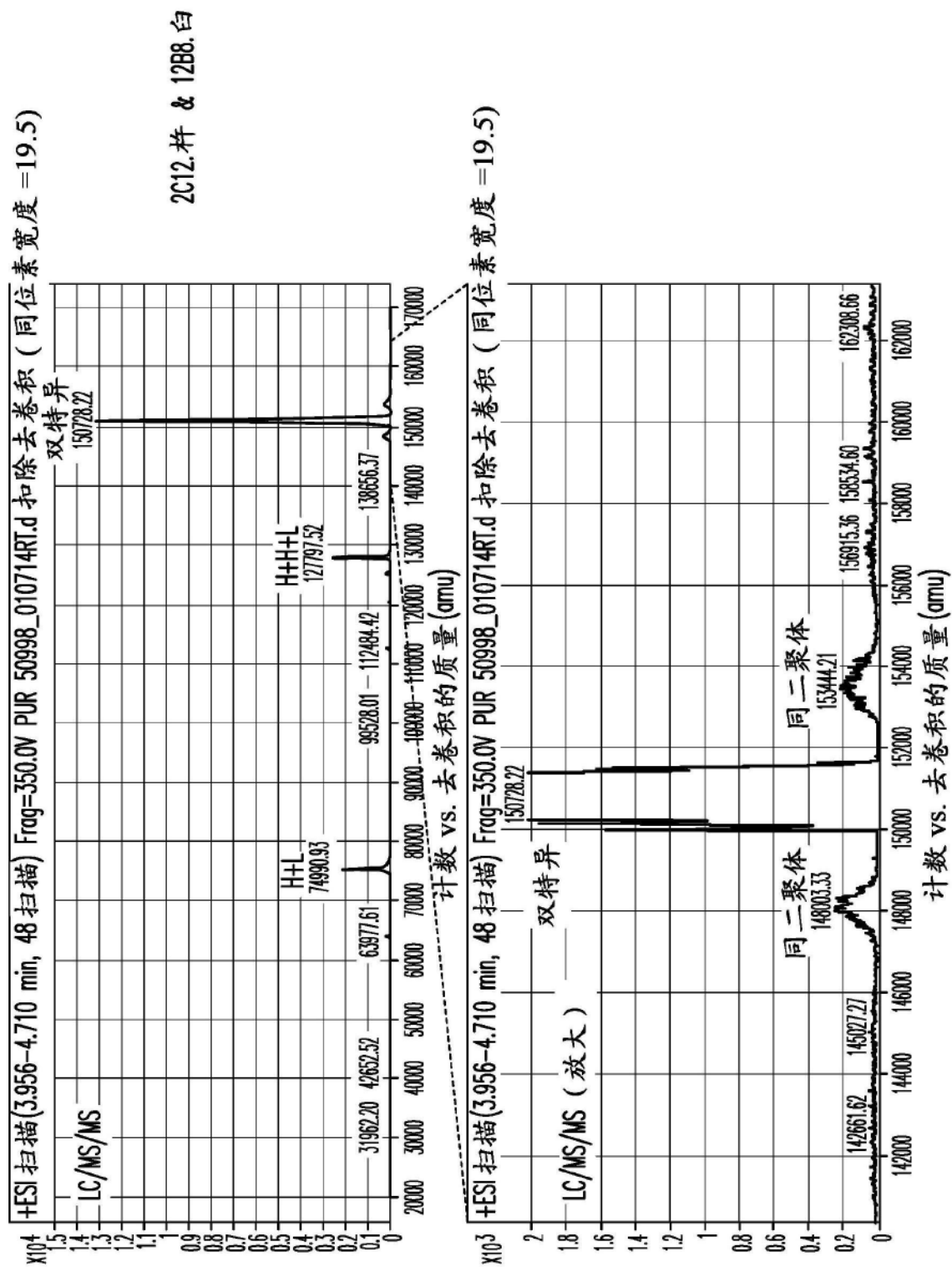


图2B

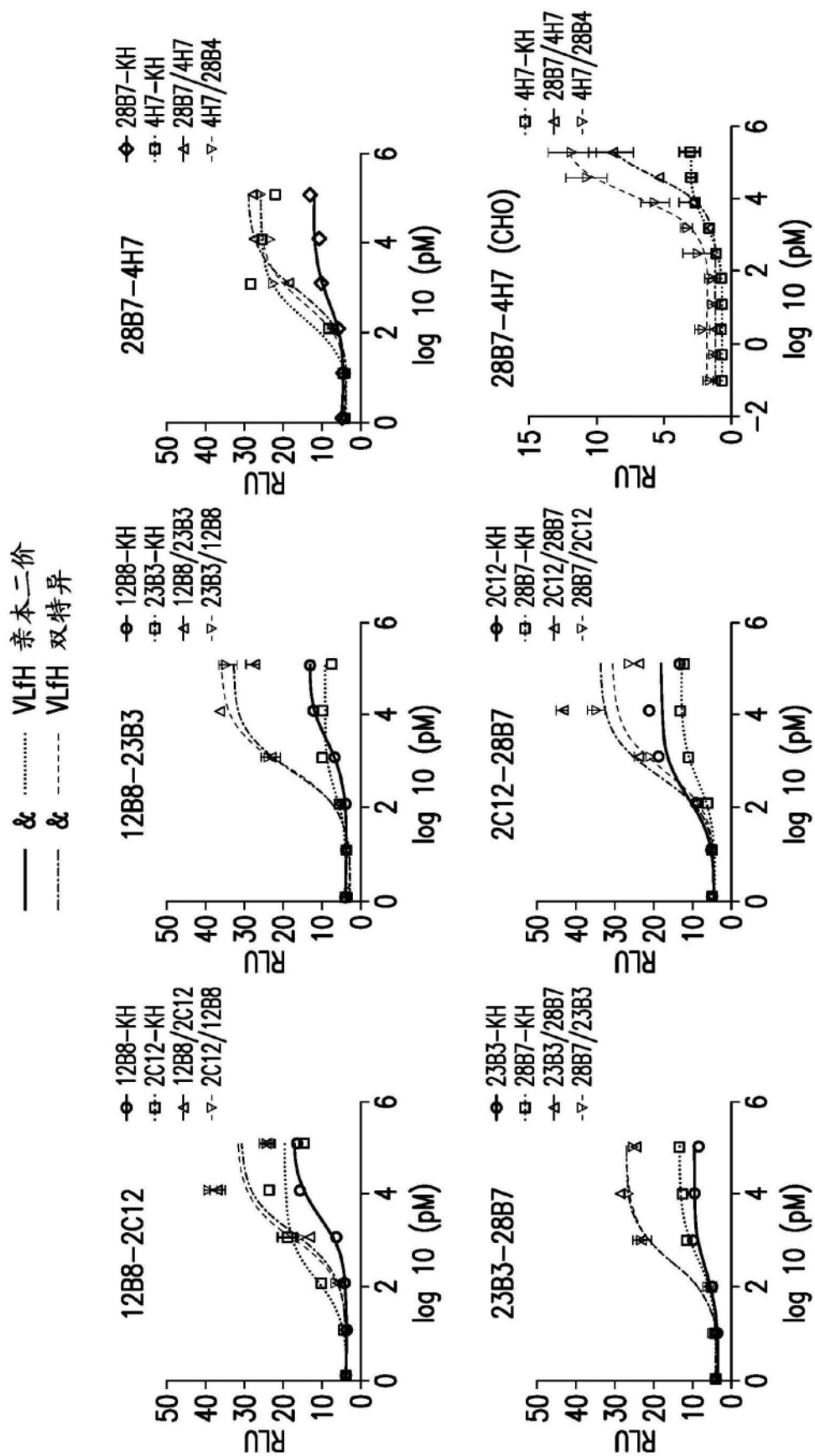


图3

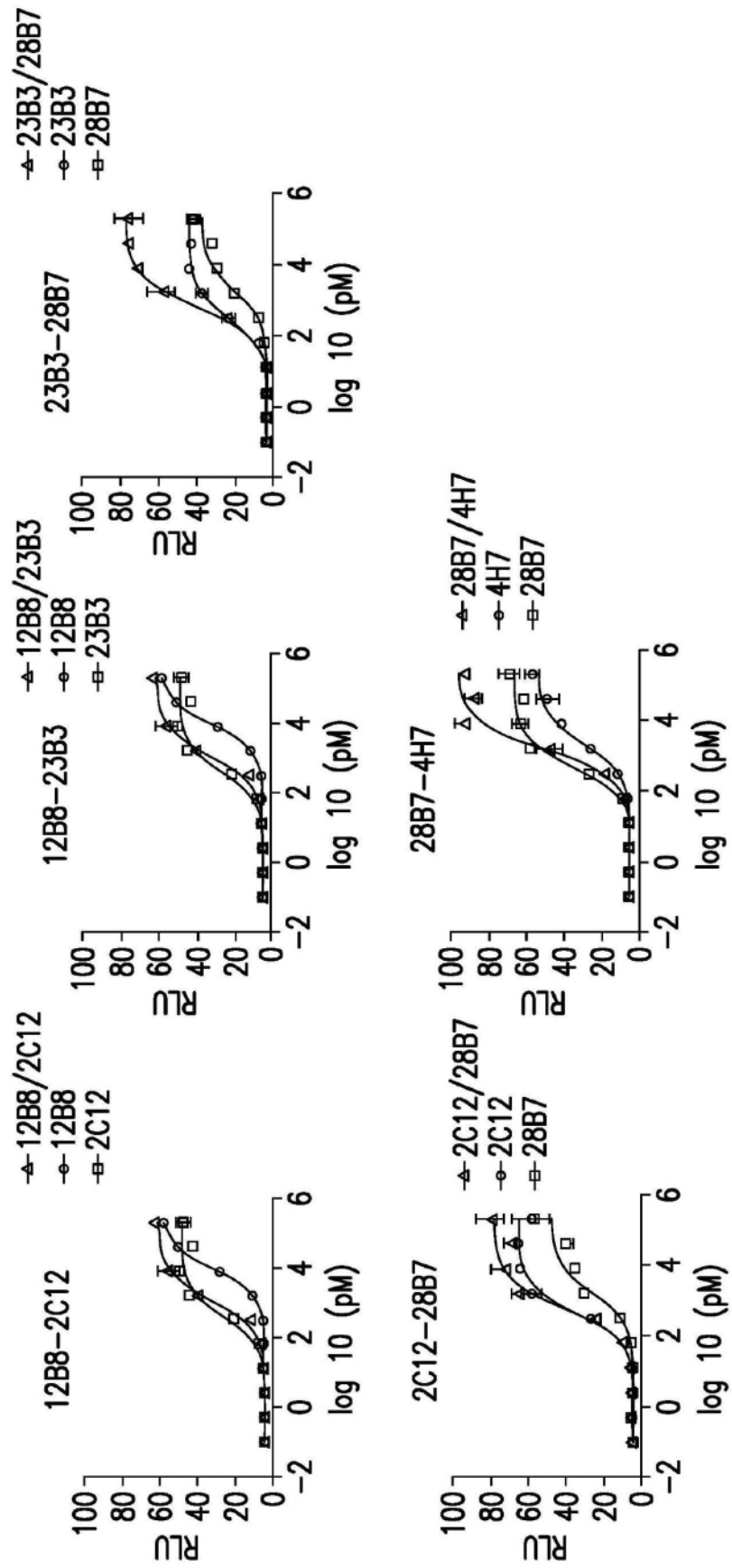


图4

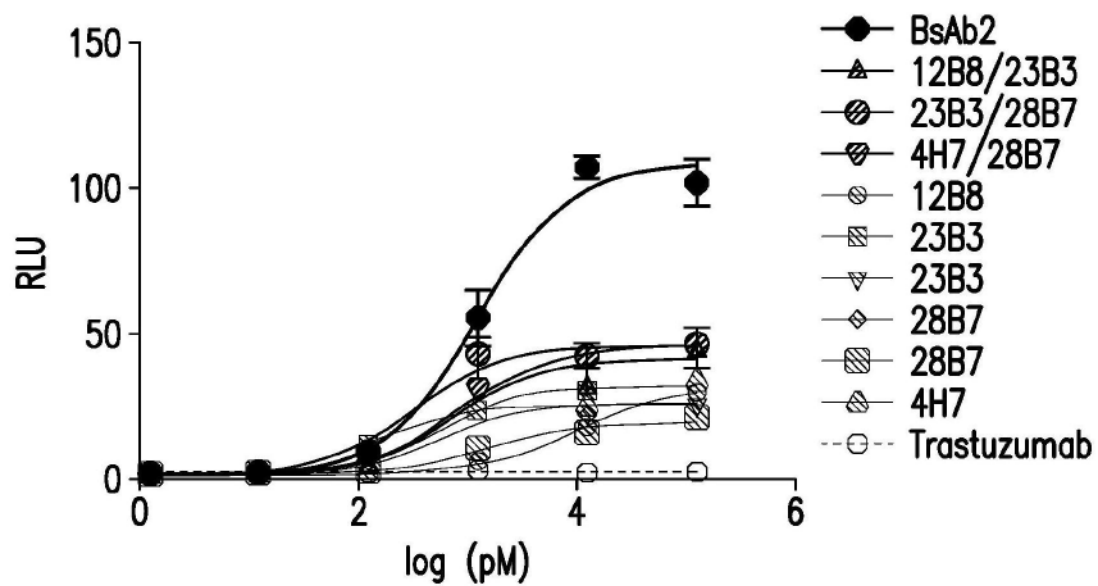


图5

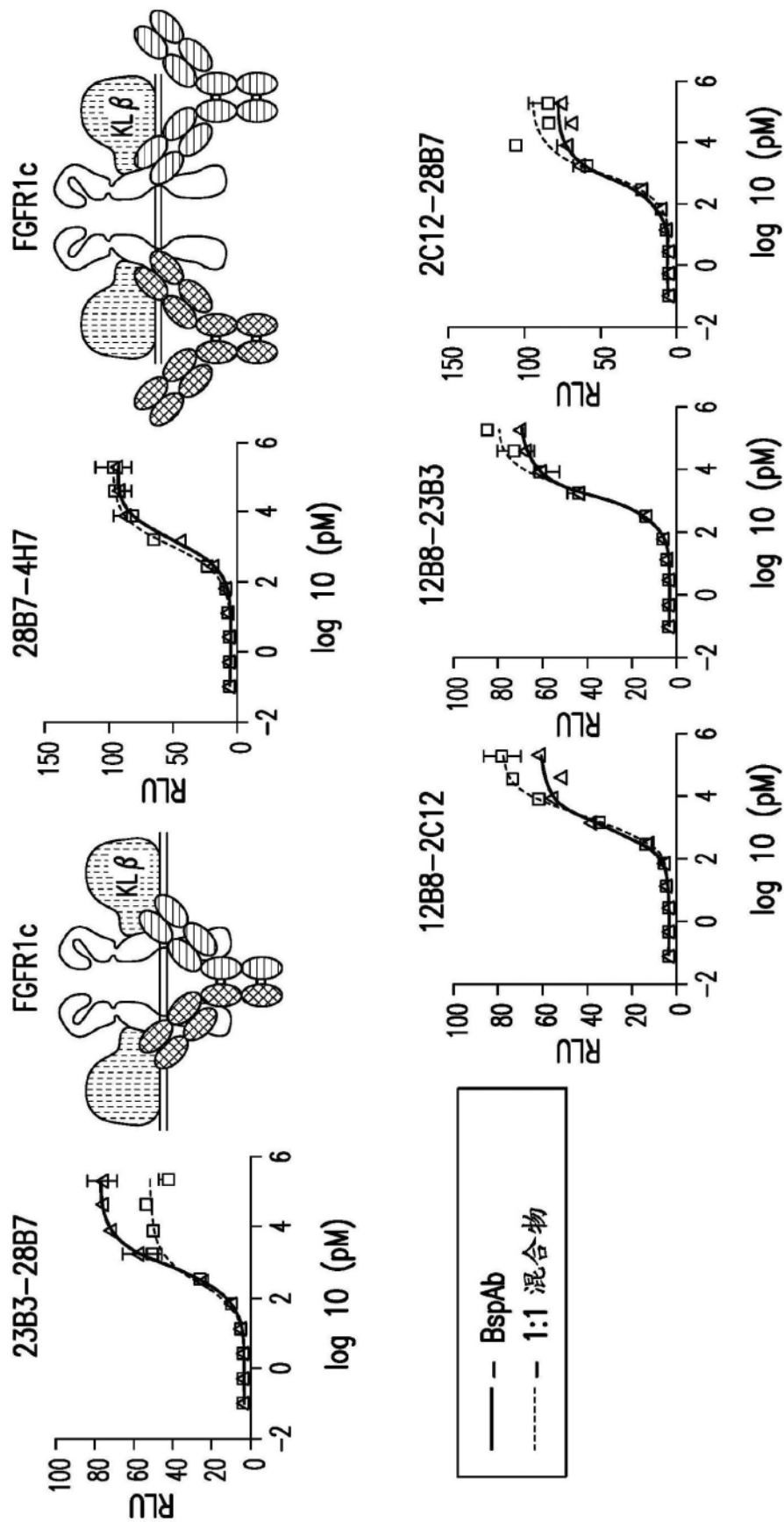


图6

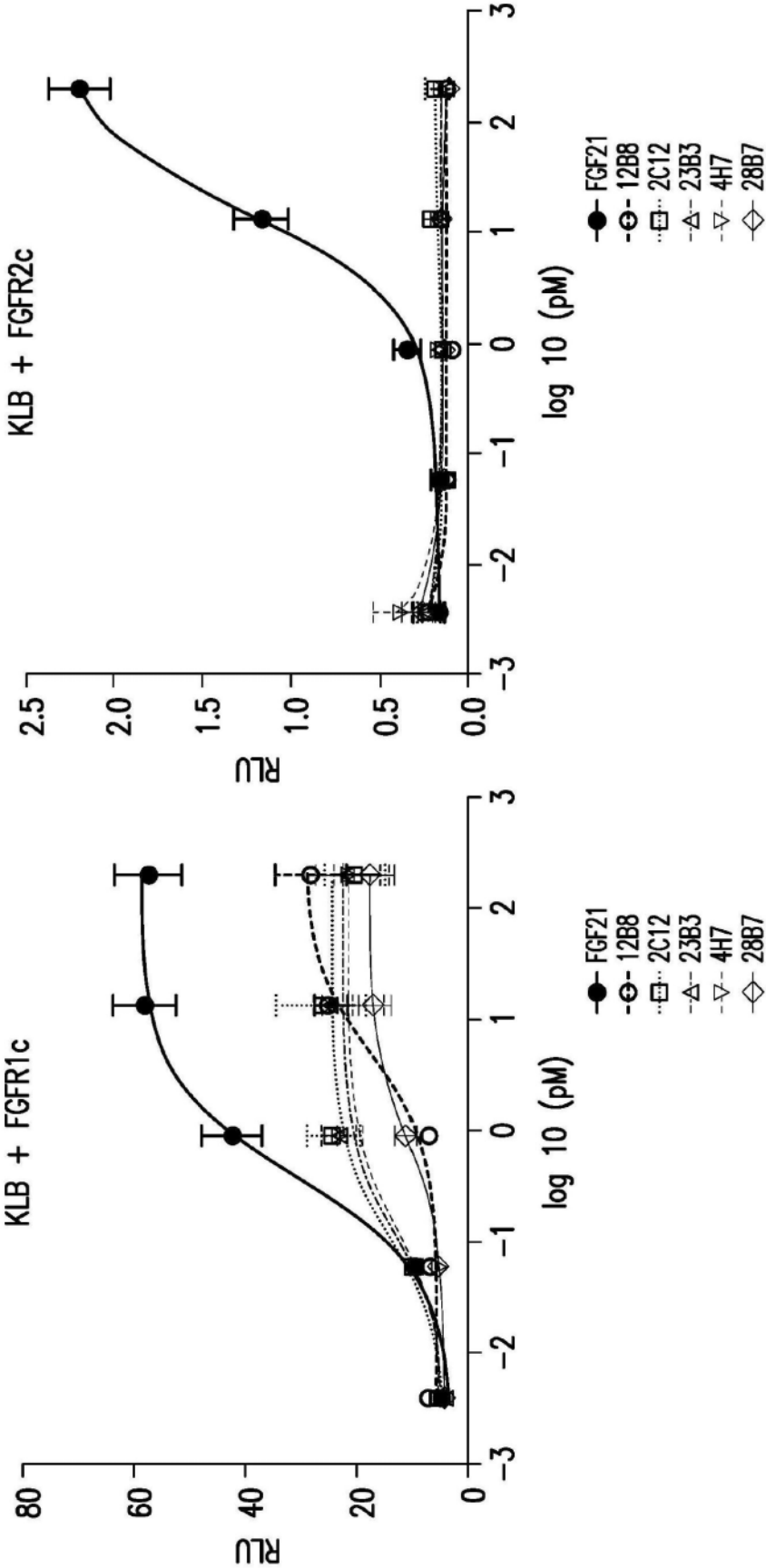


图7

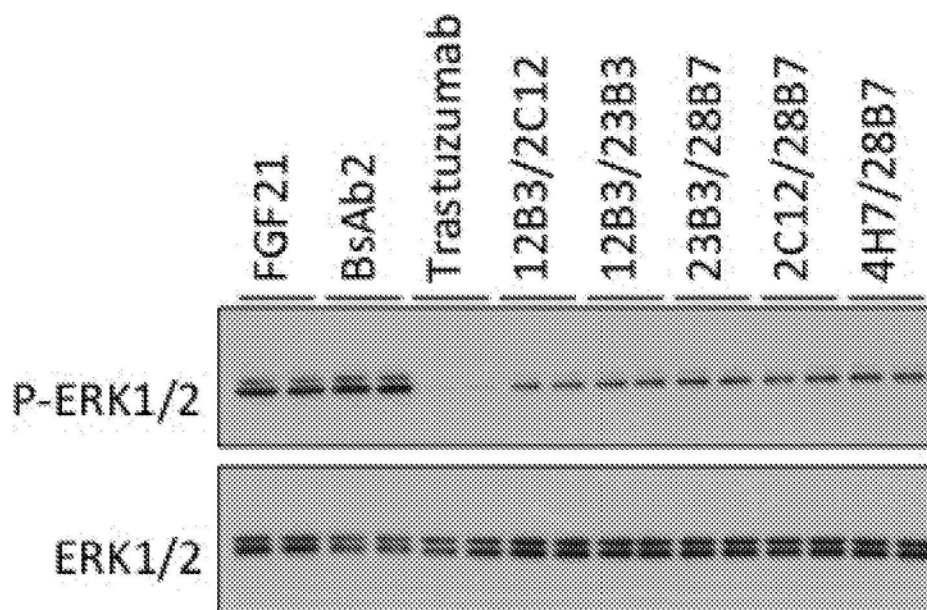


图8

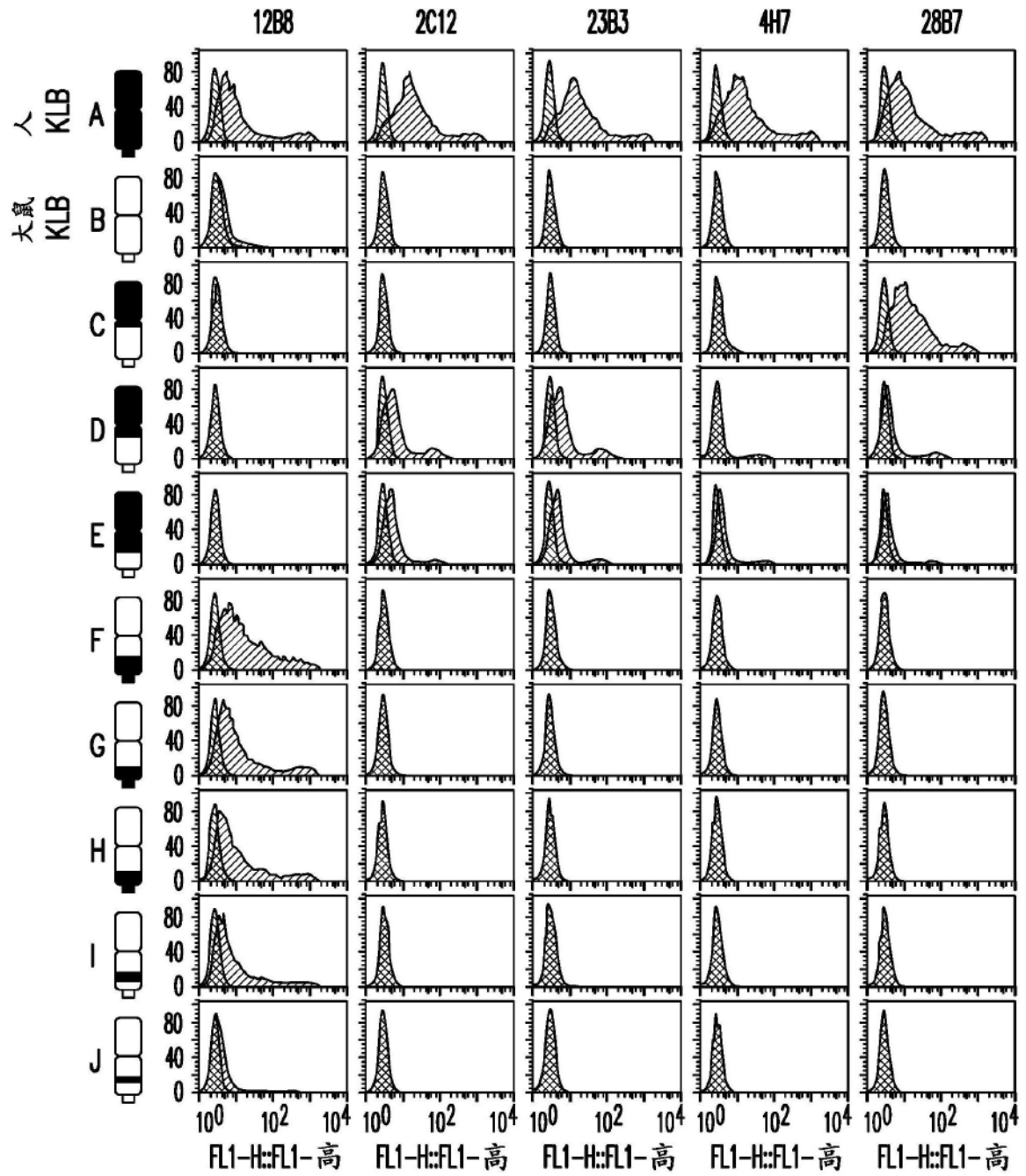


图9

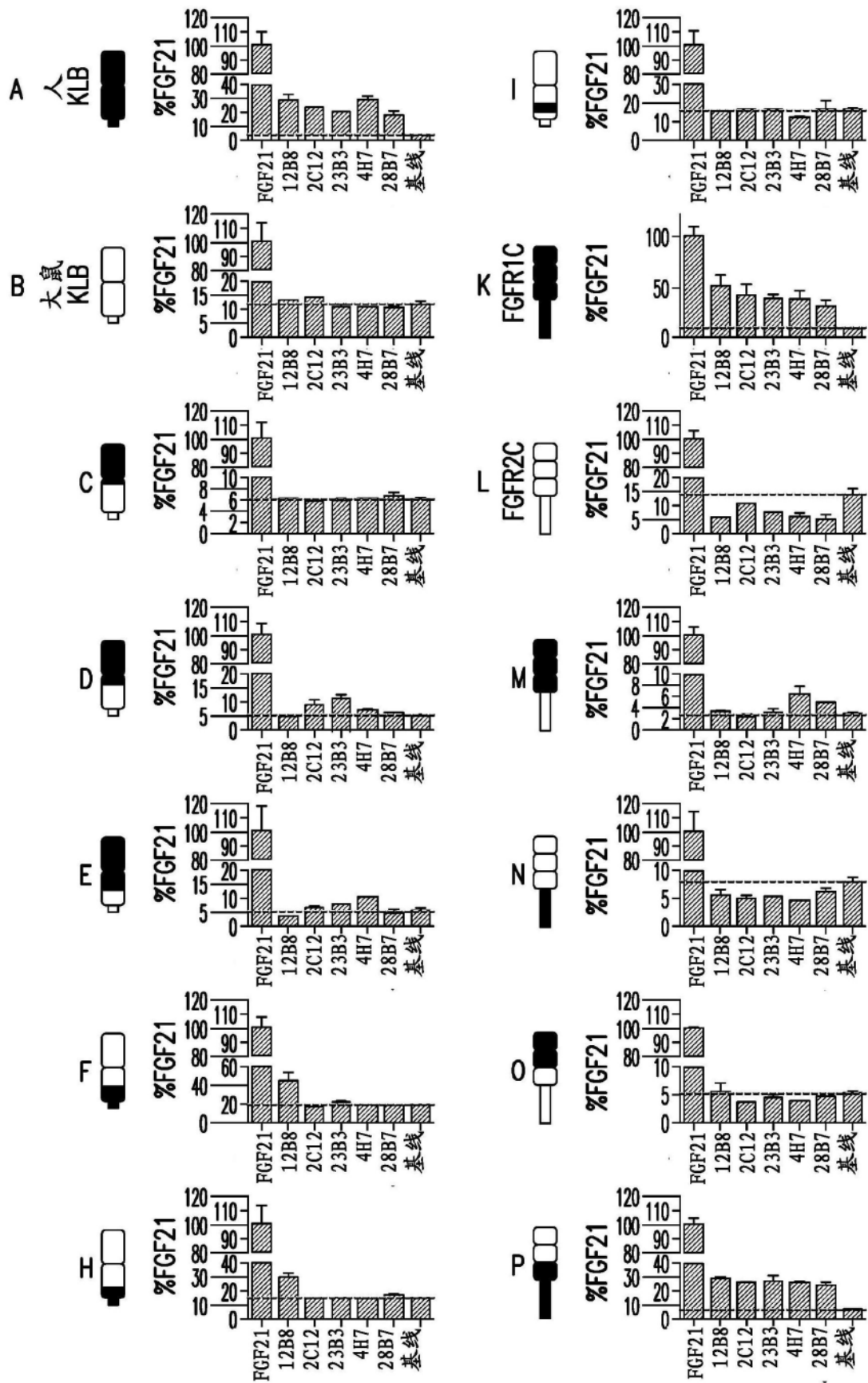


图10

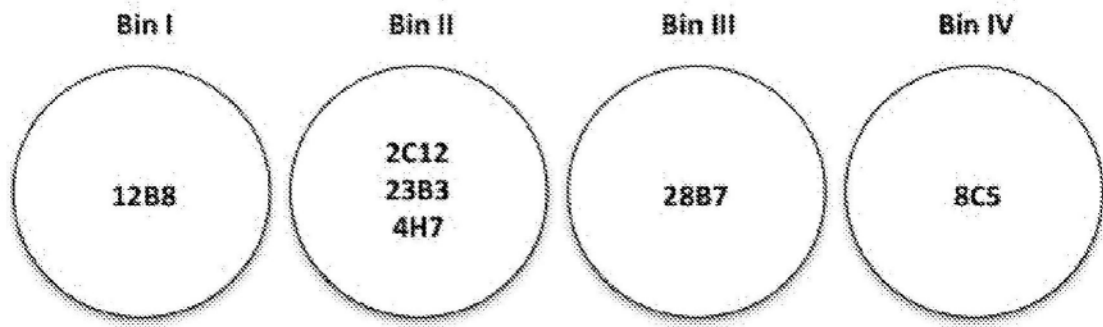
A

图11A

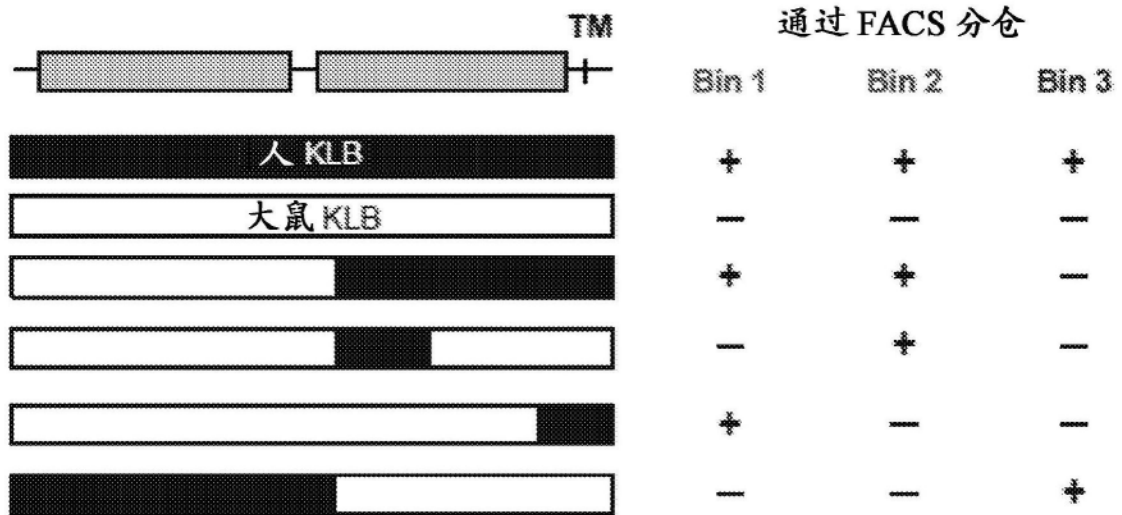
B

图11B

抗人 Fc 传感器 → 人 Ab (Ab1) → hKLB 蛋白 (传感器 H 除外) → 小鼠 Ab (Ab2)

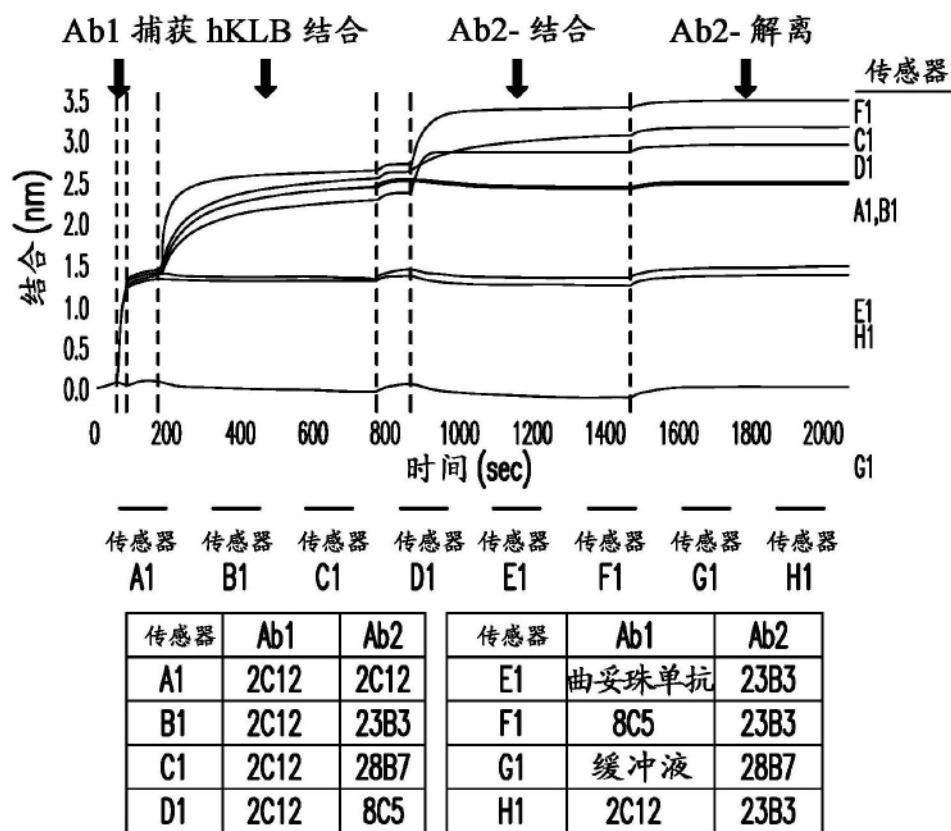


图12

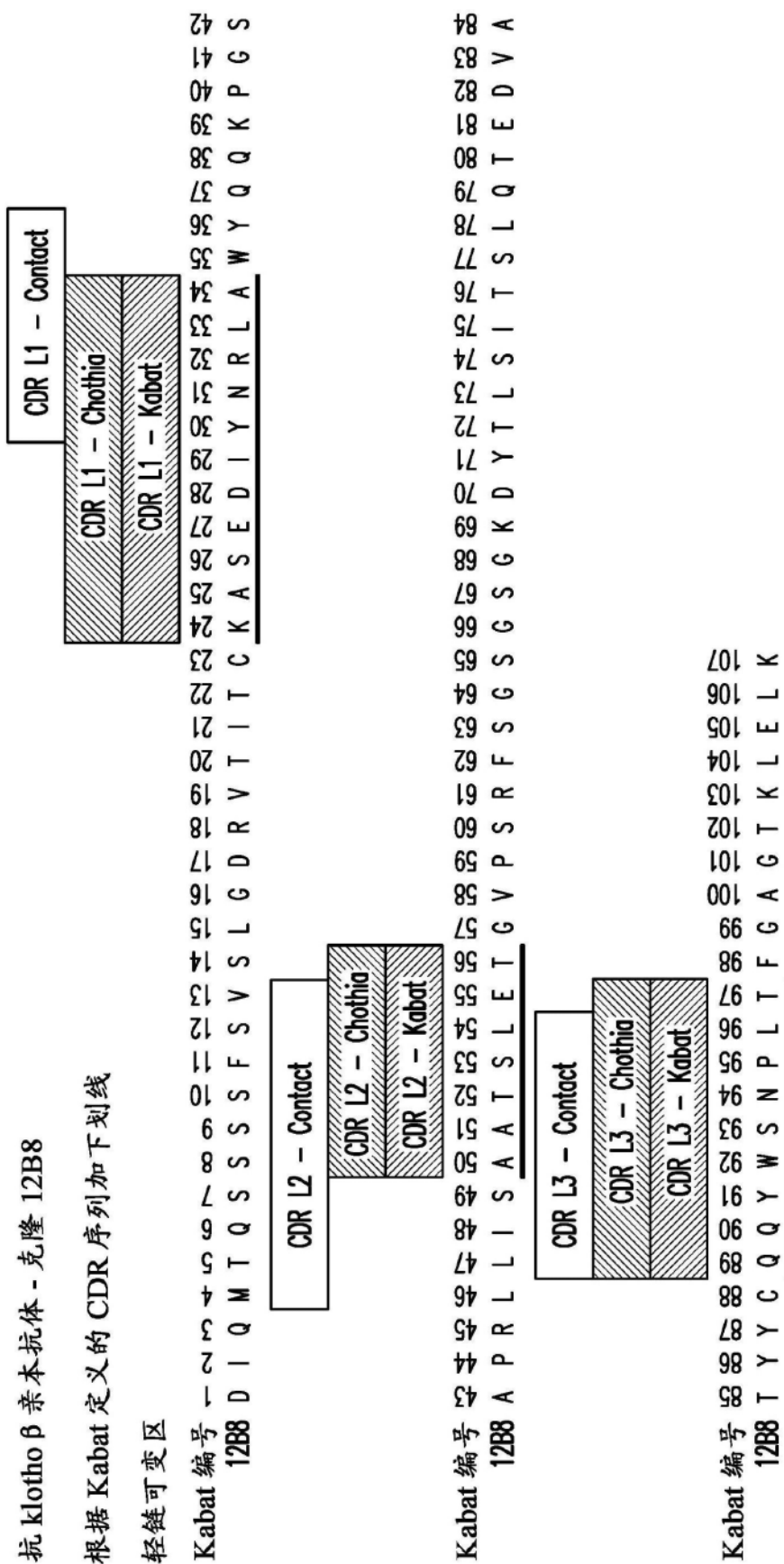


图13

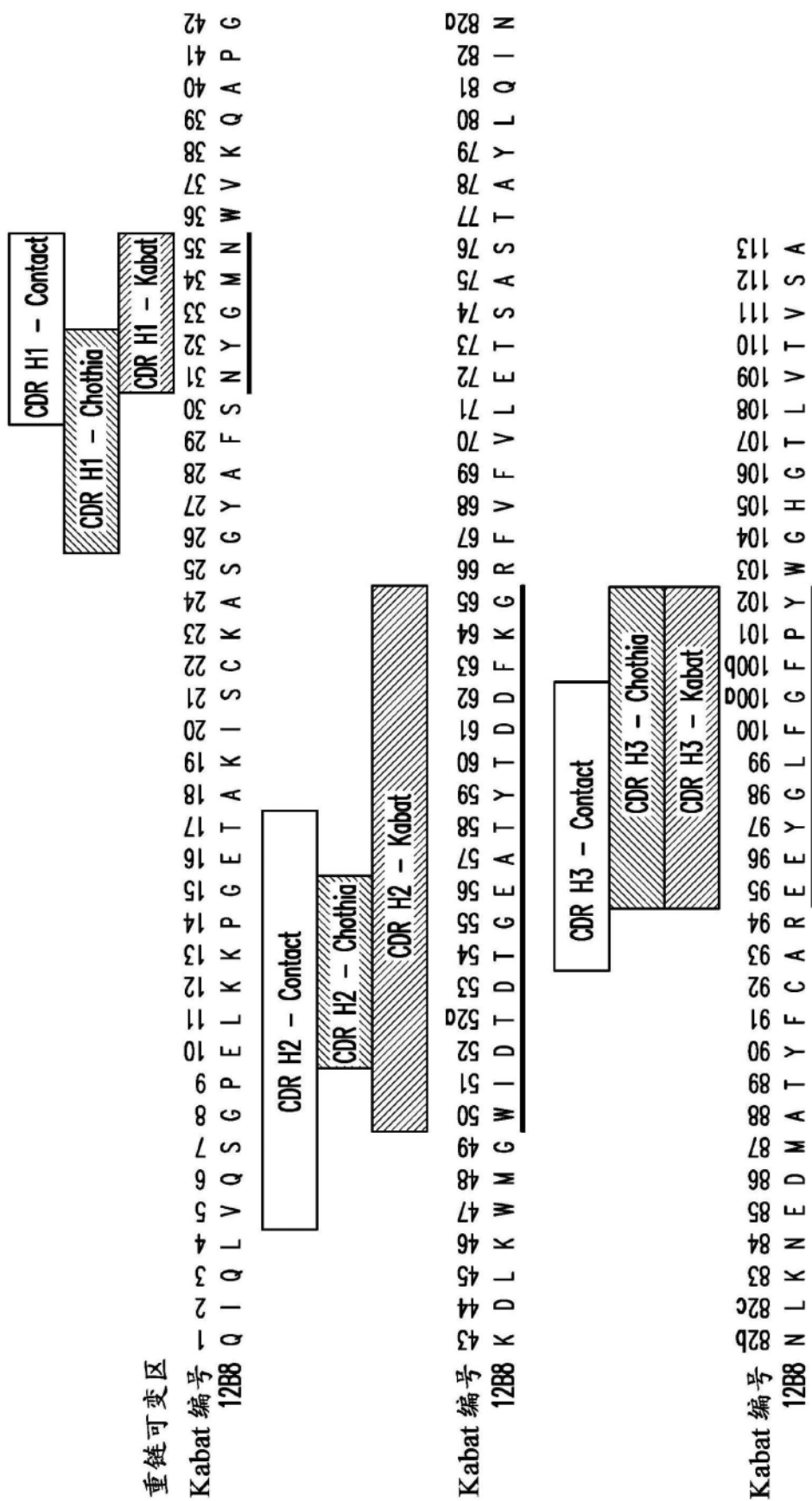


图13(续)

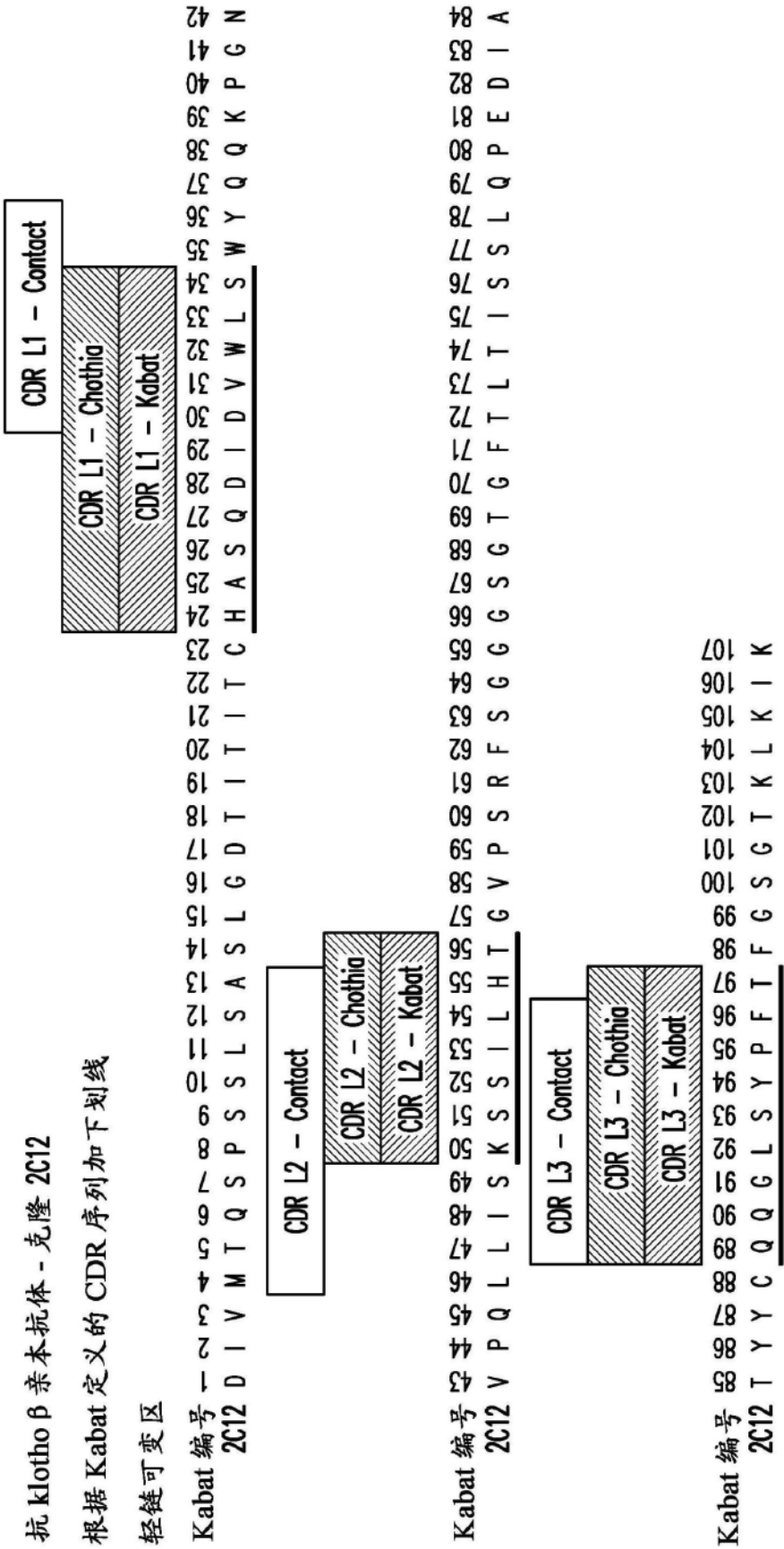


图14

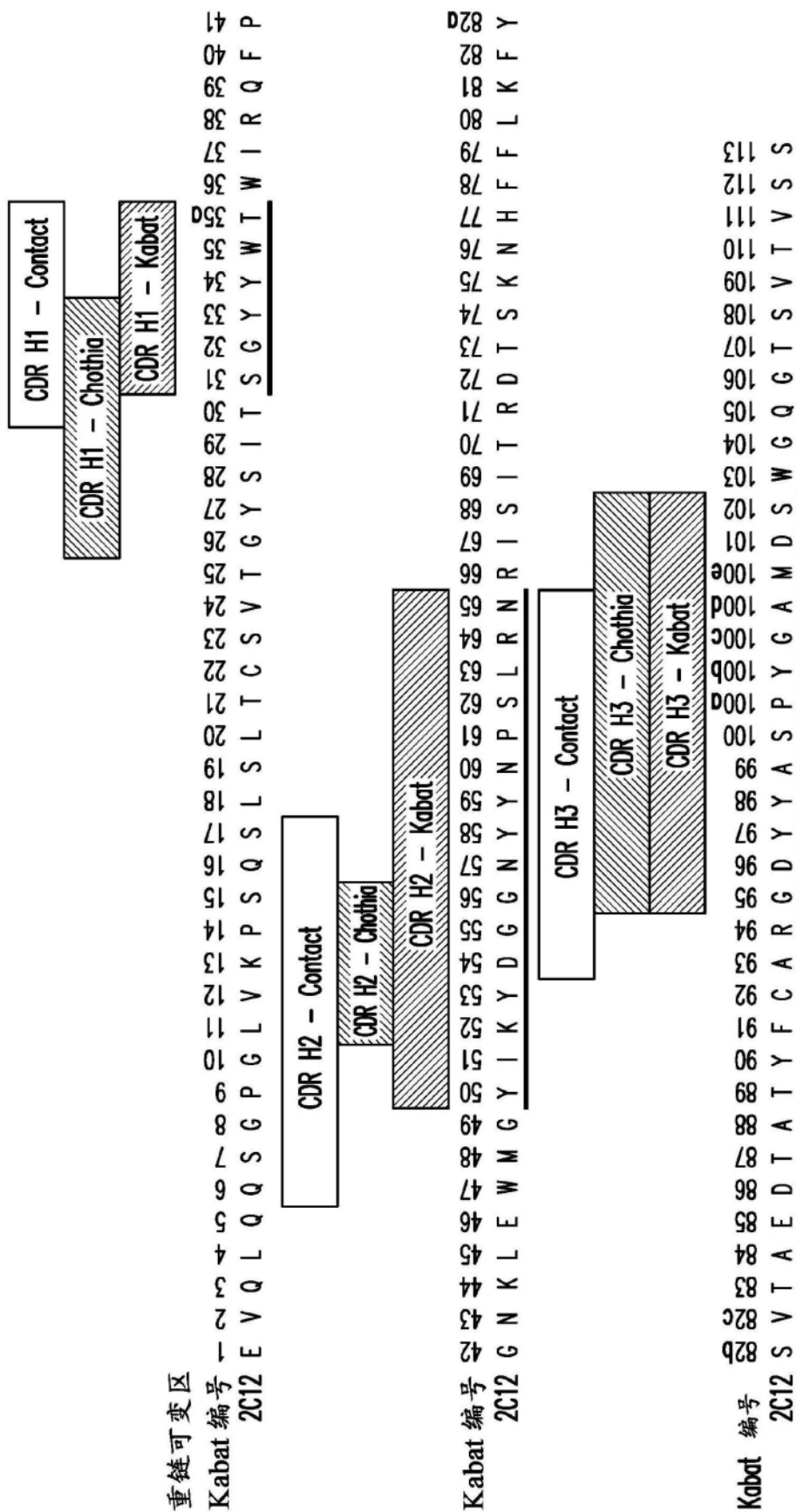


图14(续)

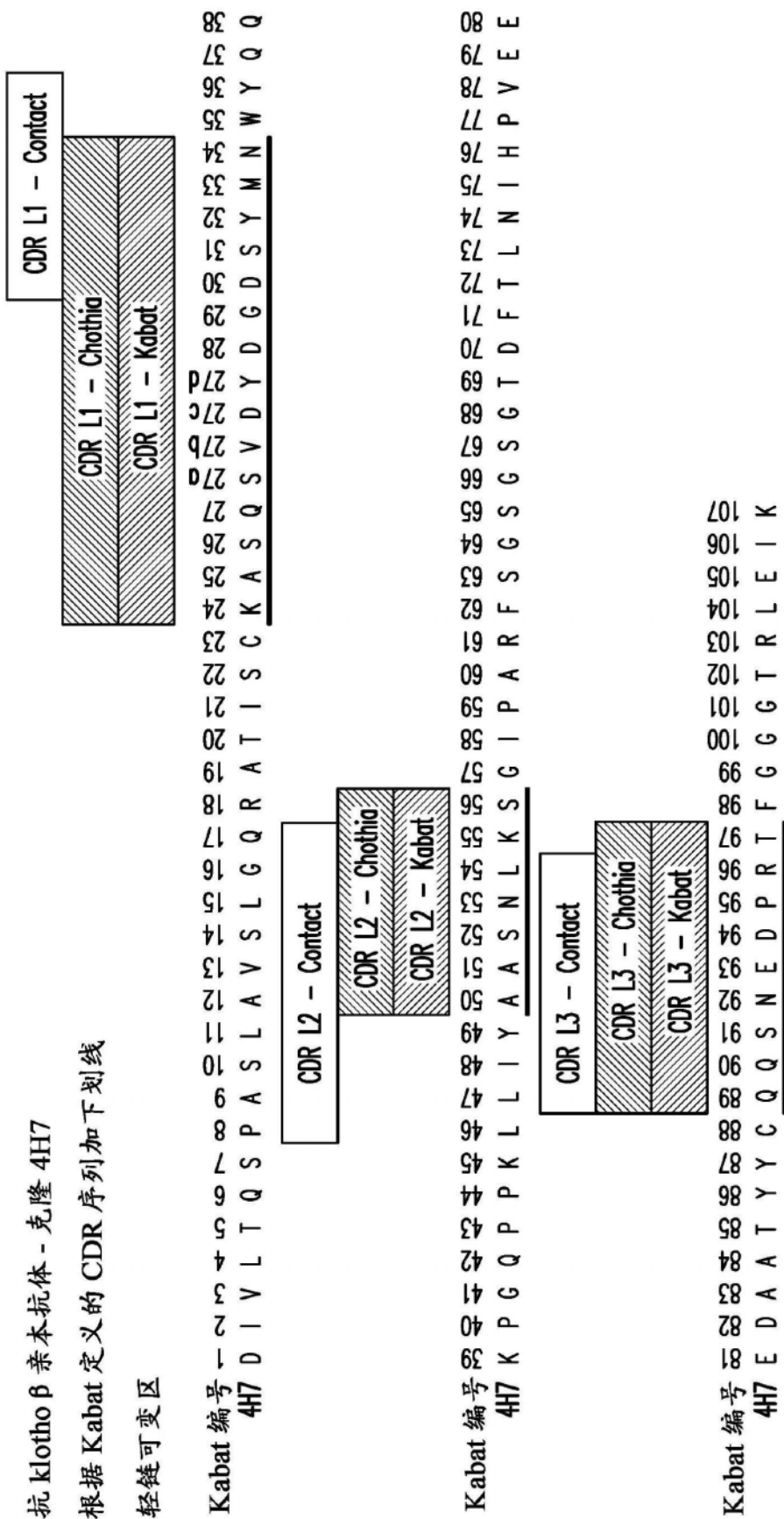


图15

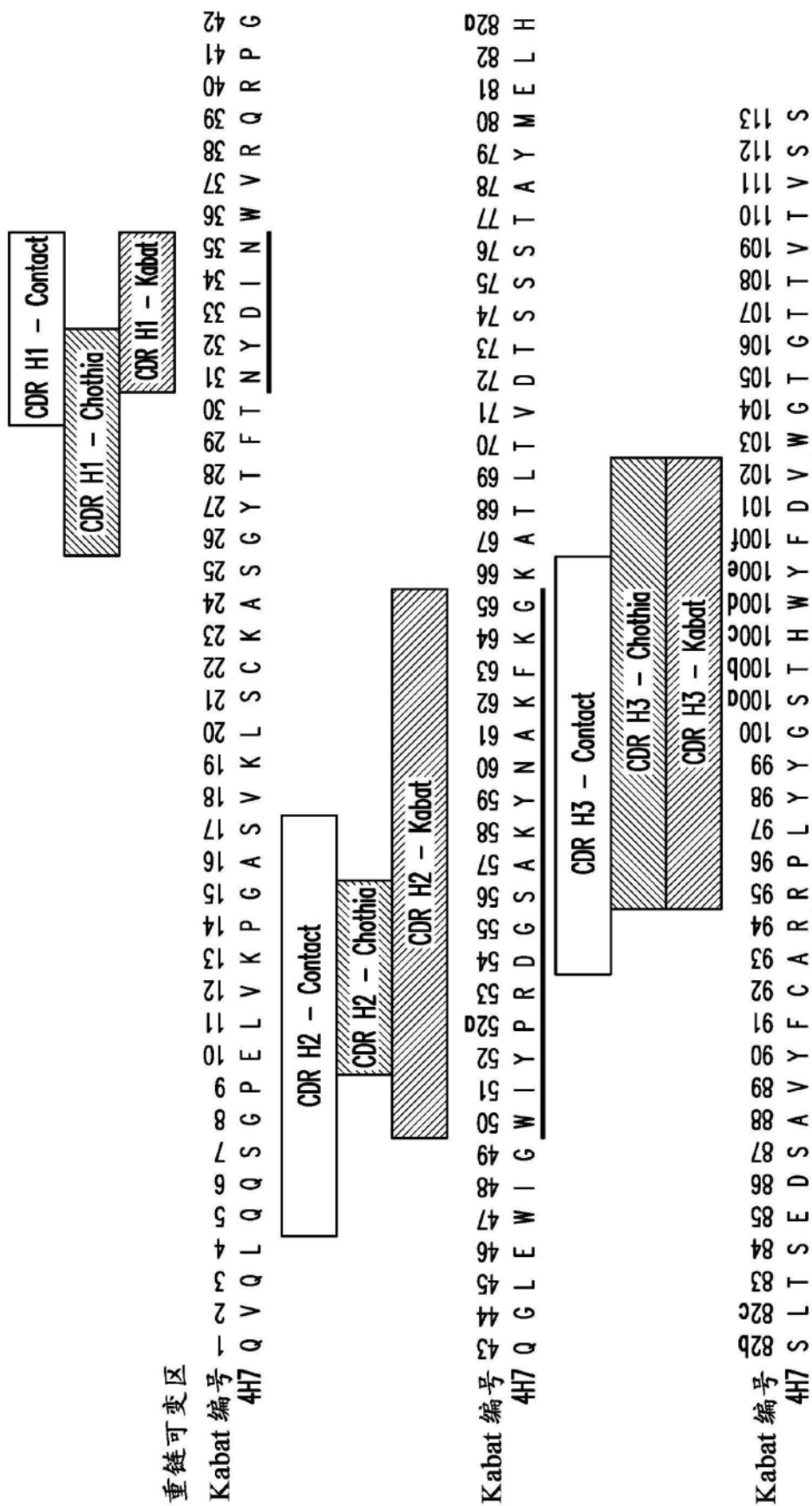


图15(续)

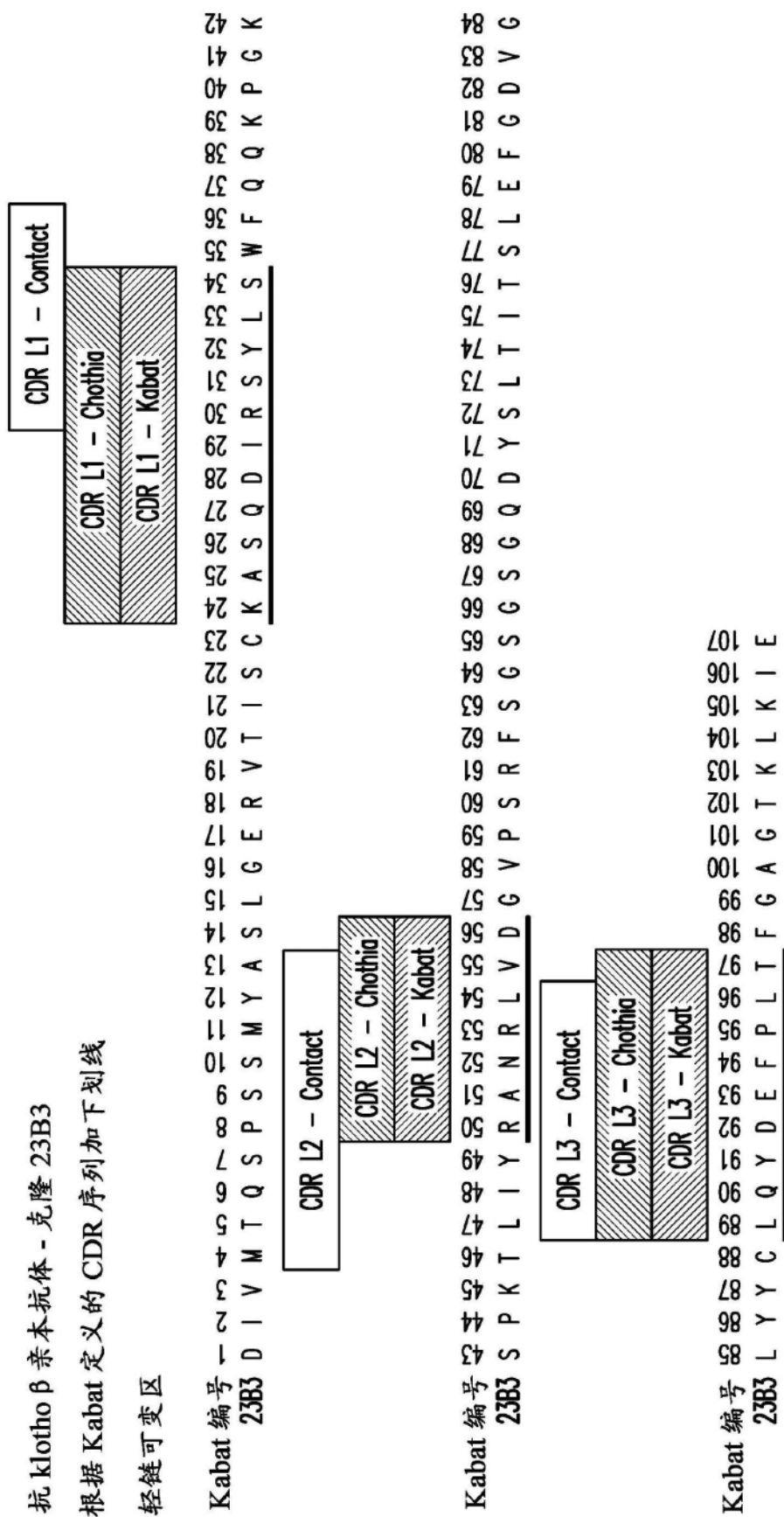


图16

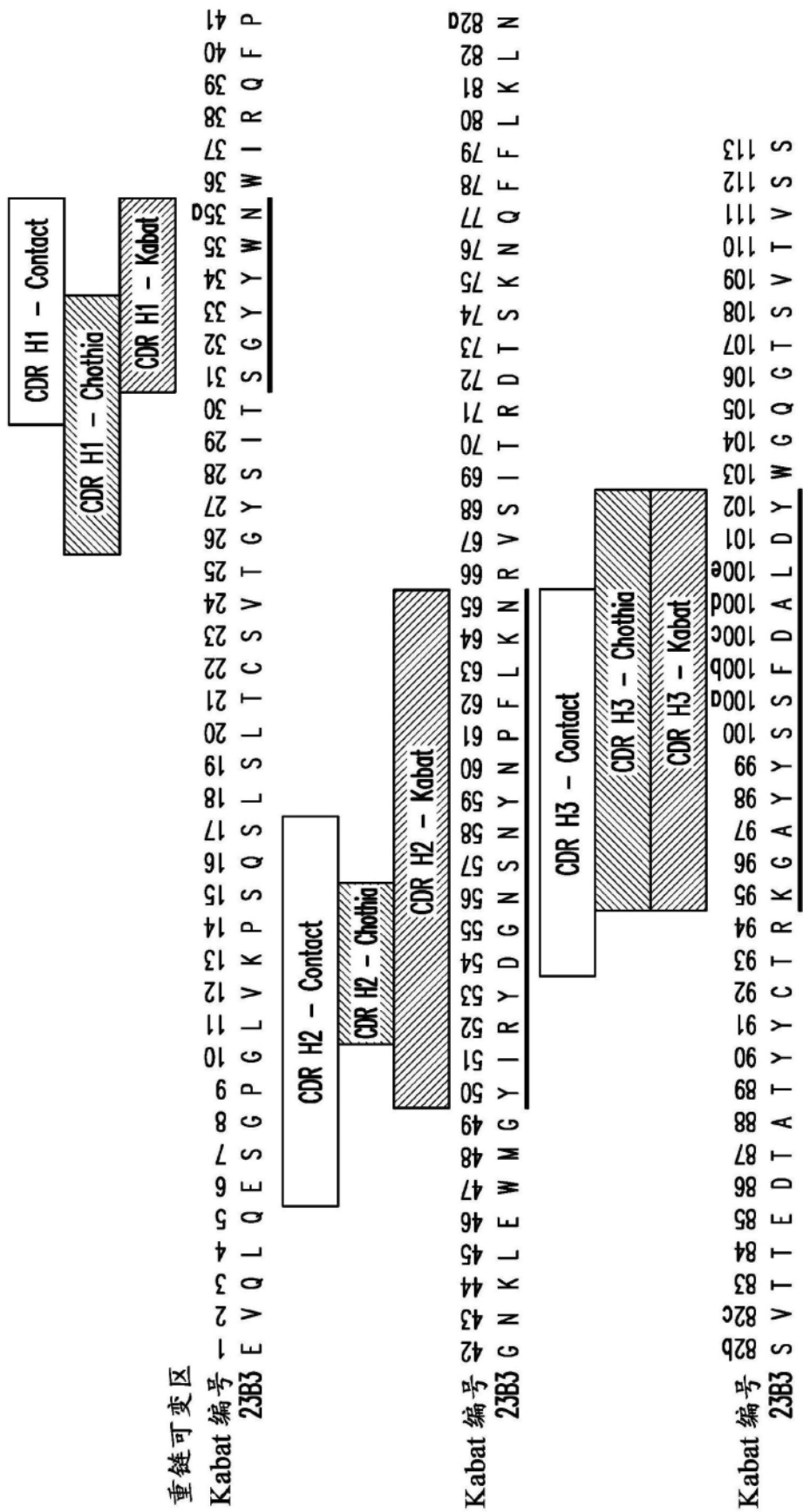


图16(续)

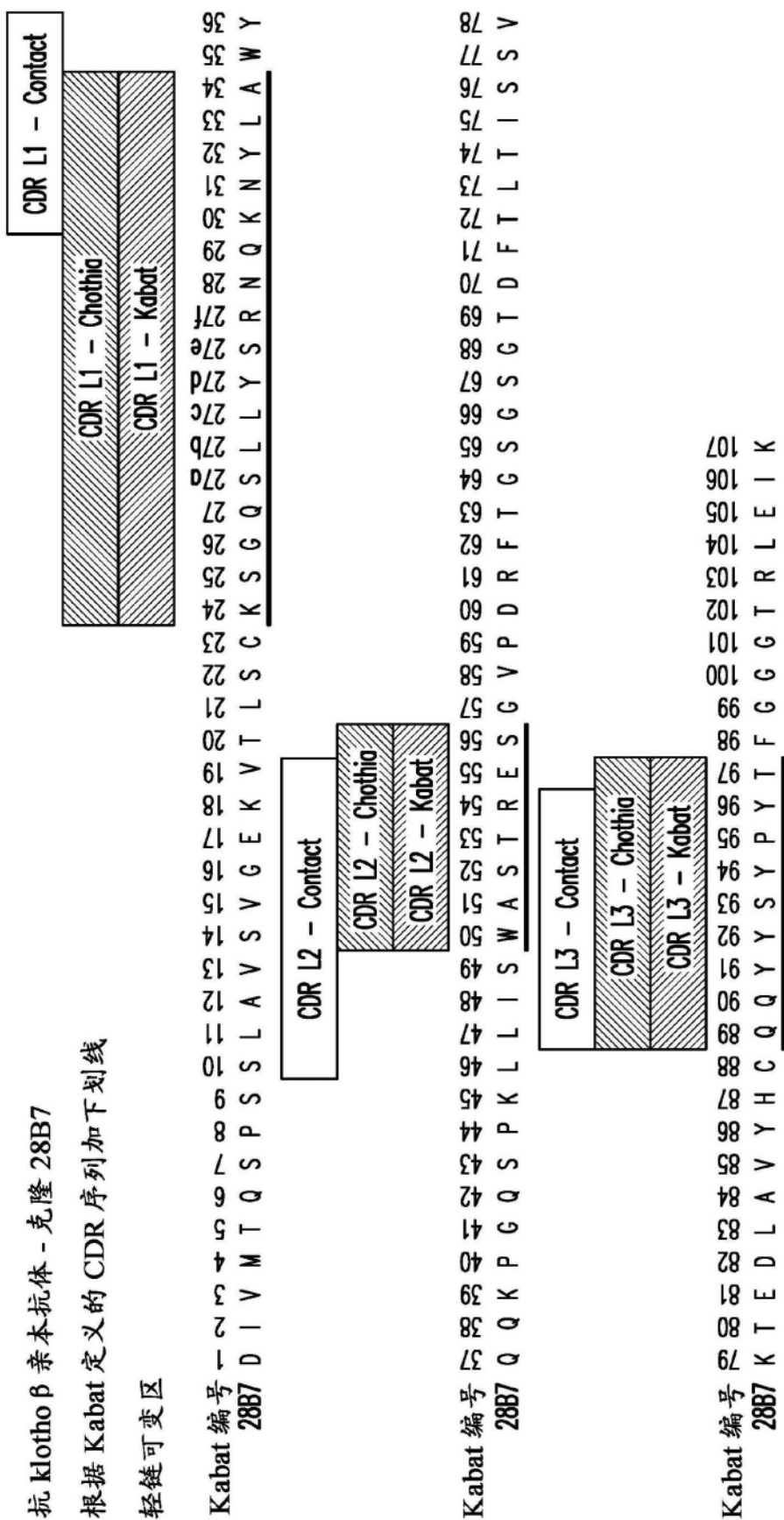


图17

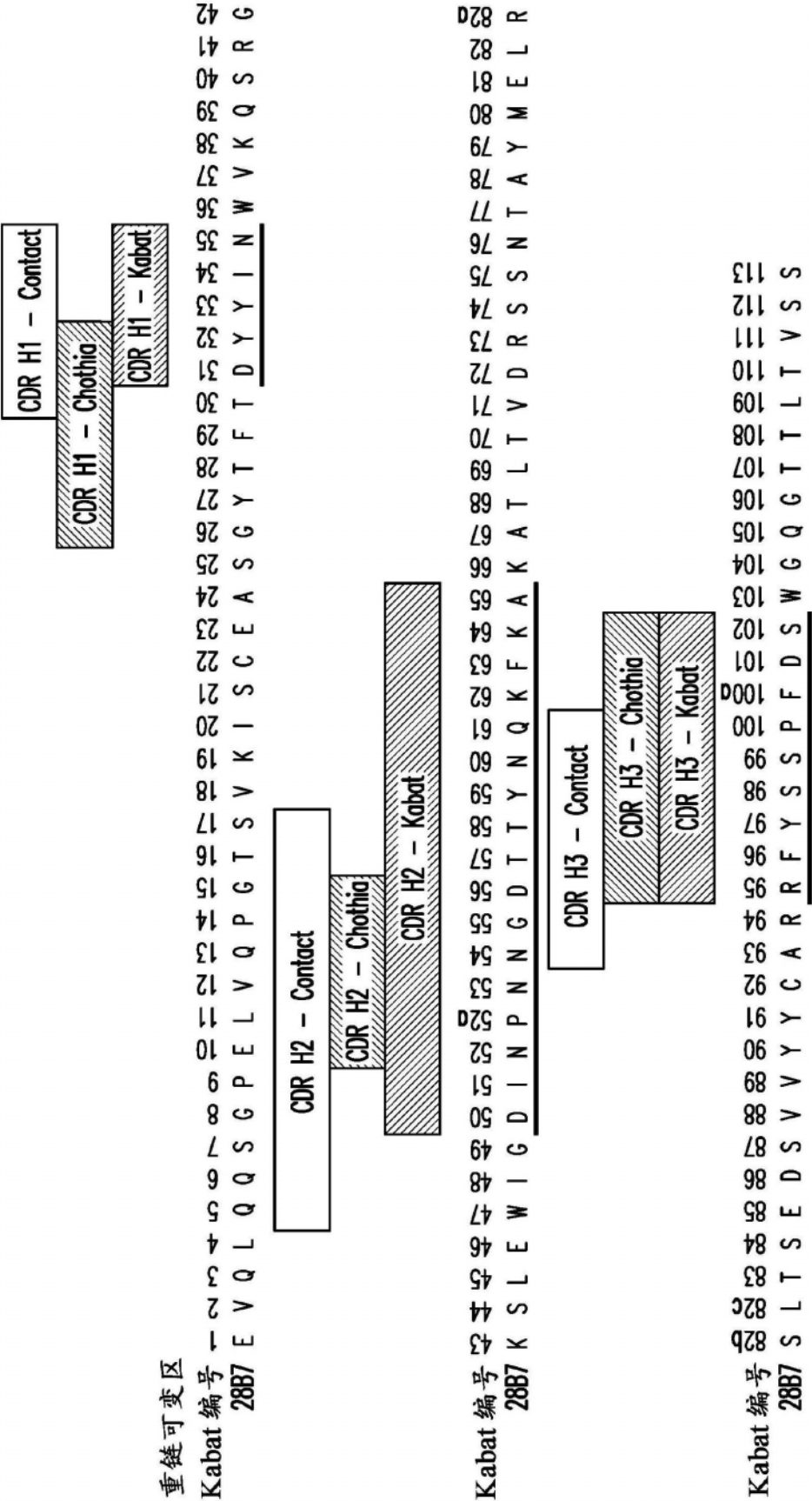


图17(续)

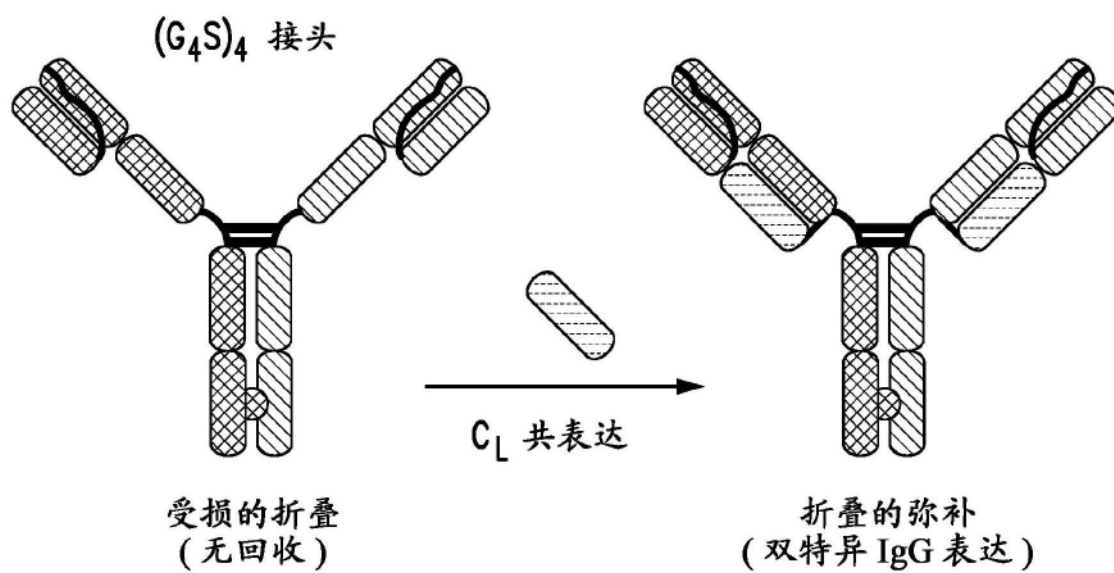


图18A

与标准 IgG 相比 tcIgG 的表达和 CL 需求的重要性, 在各种人 IgG 同种型中以及有和无糖基化 ($N_{297}G$)

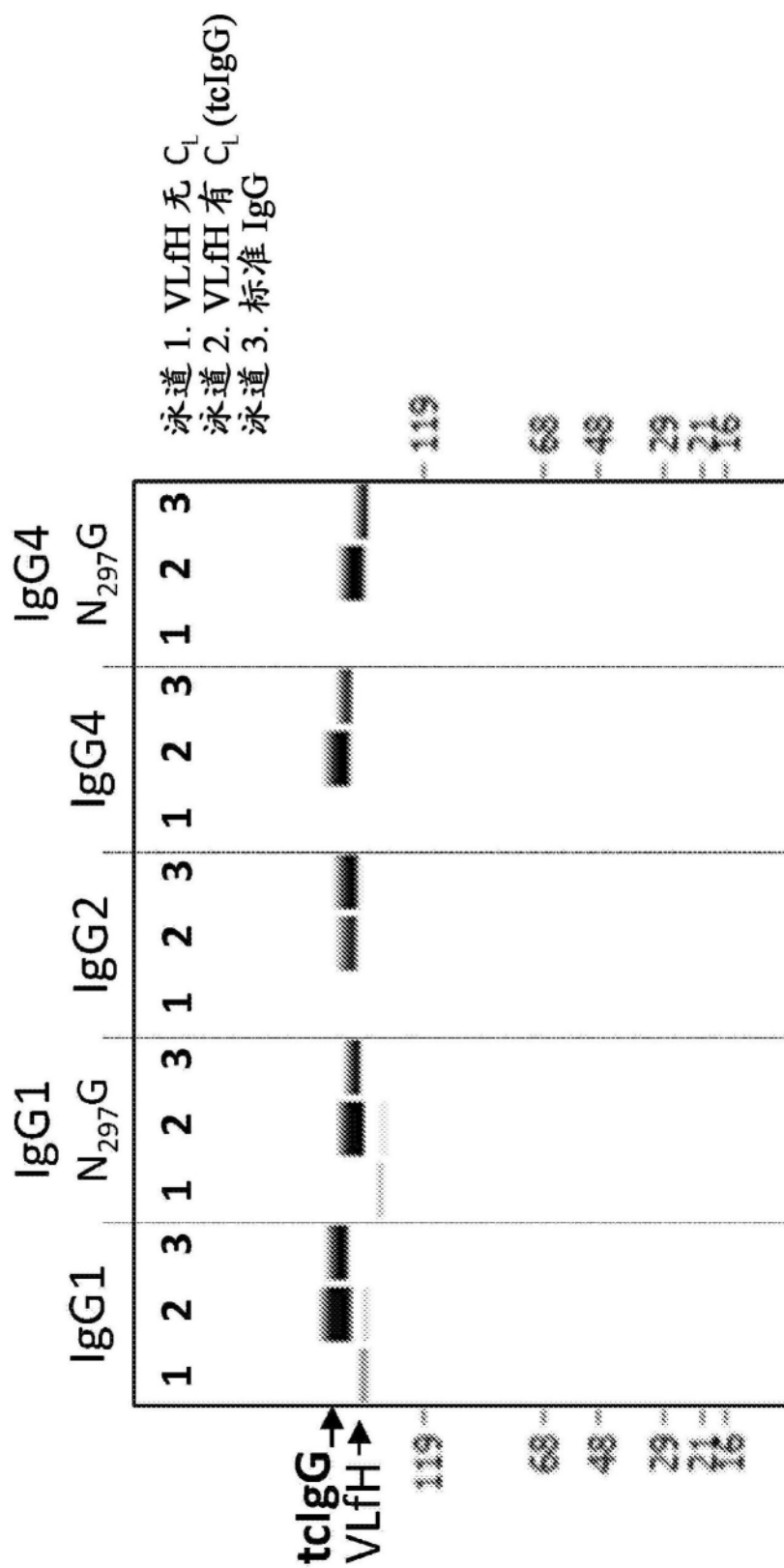


图18B

在各种人同种型中，与标准样和白 IgG 和 tcIgG 相比，
tcIgG. 样和 tcIgG. 白自身以及 tcIgG 在单个细胞中的表达

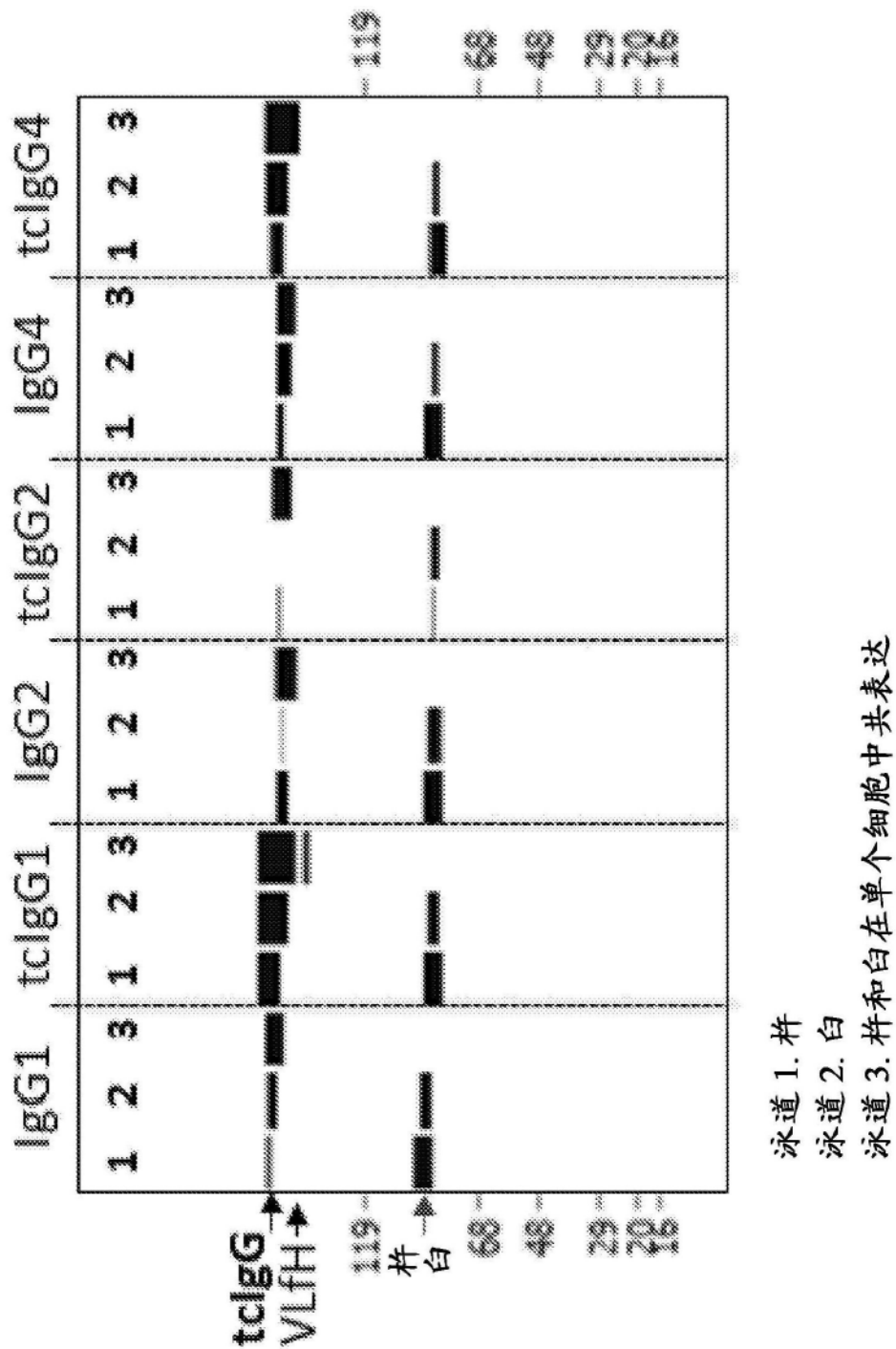


图18C

ProA 和 SEC 后 tcIgG 的完整 LC MS/MS

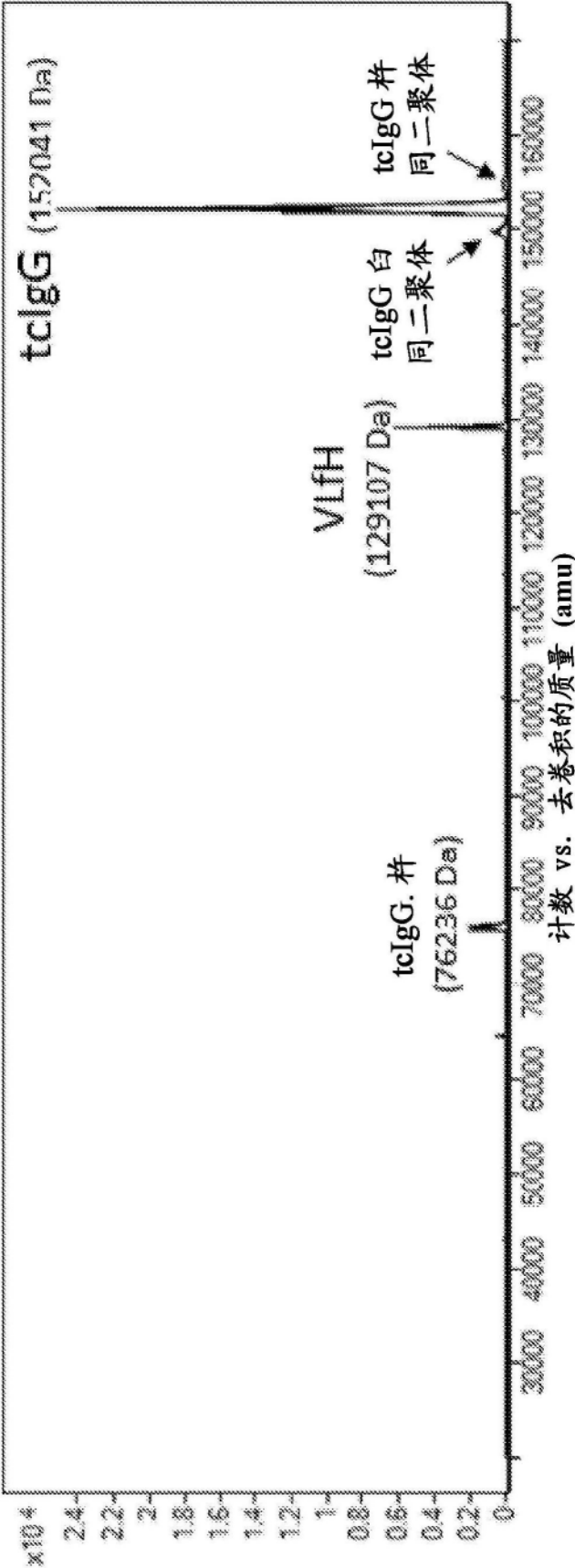


图18D

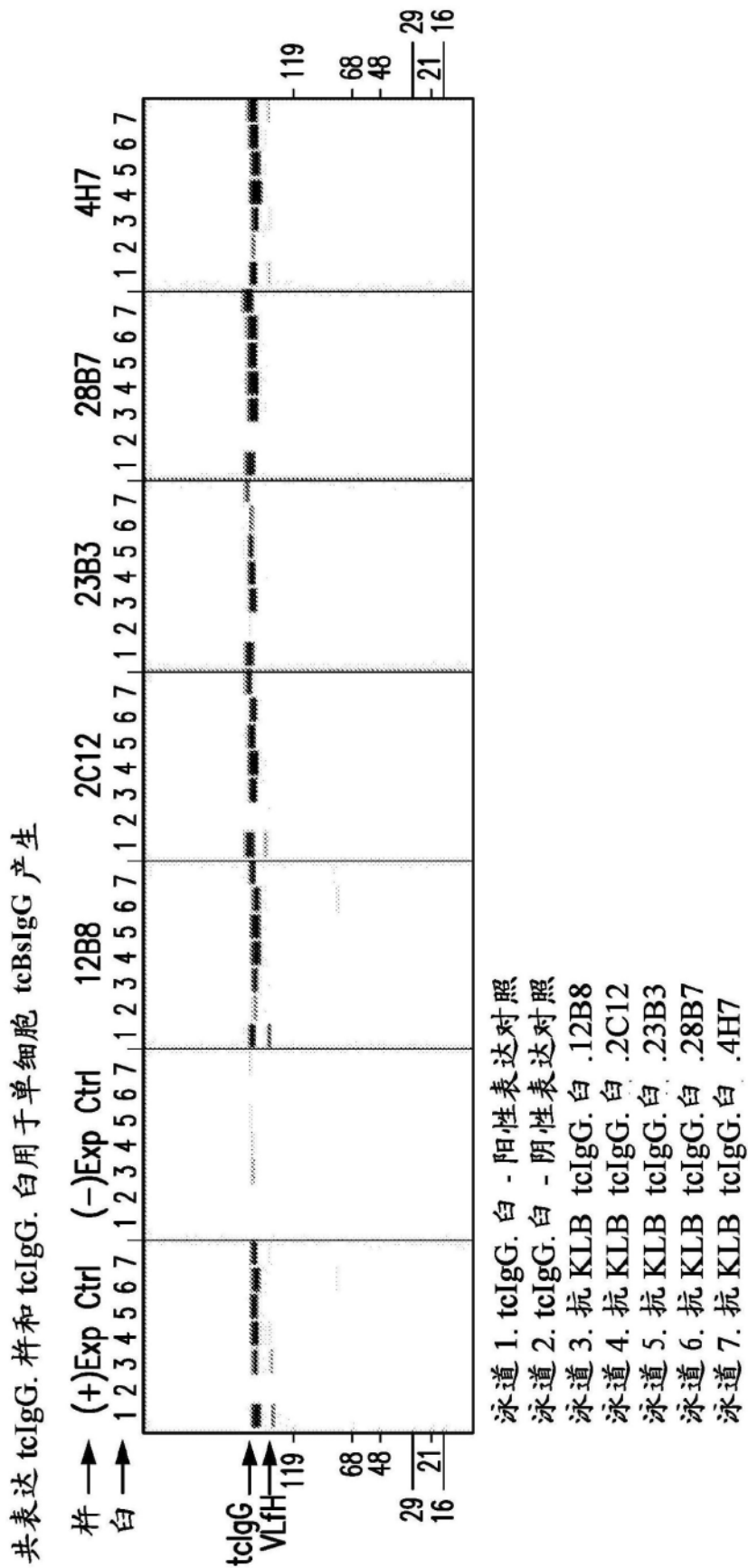


图19A

单细胞中表达的 tcBsIgG 的相应亲本 tcIgG 表达

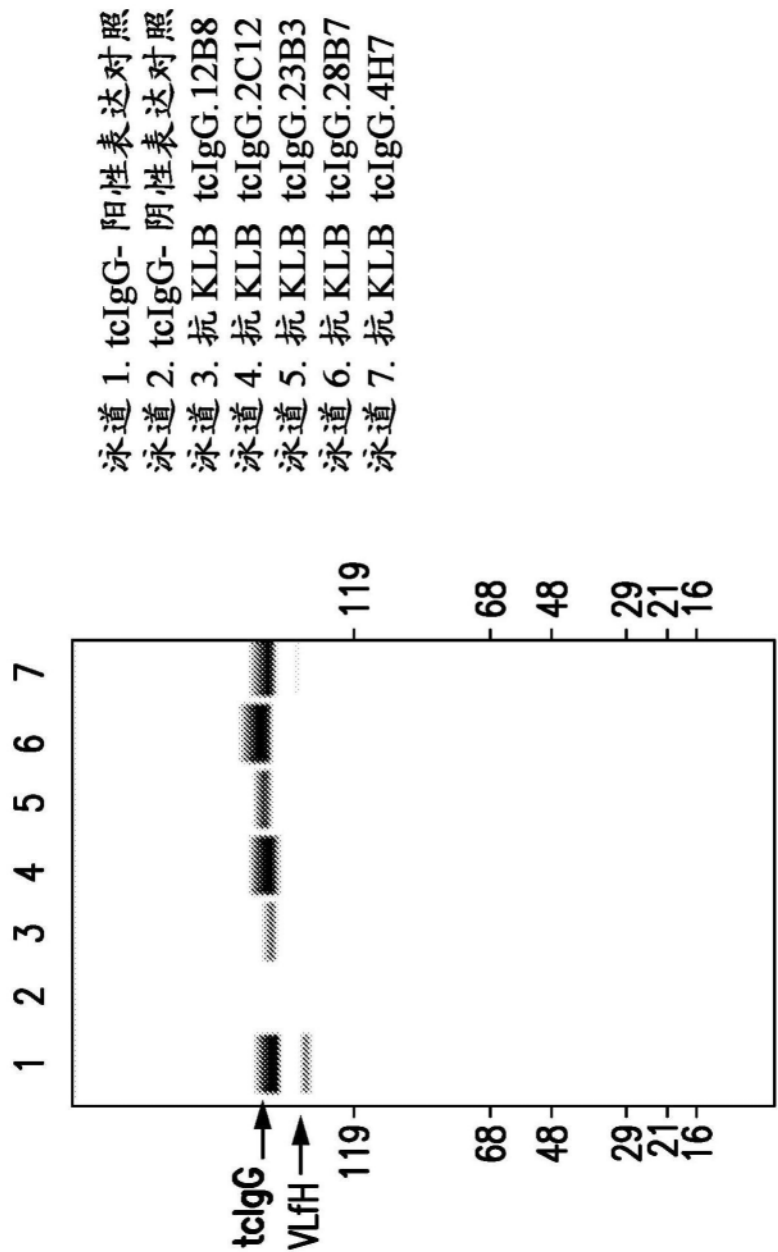


图19B

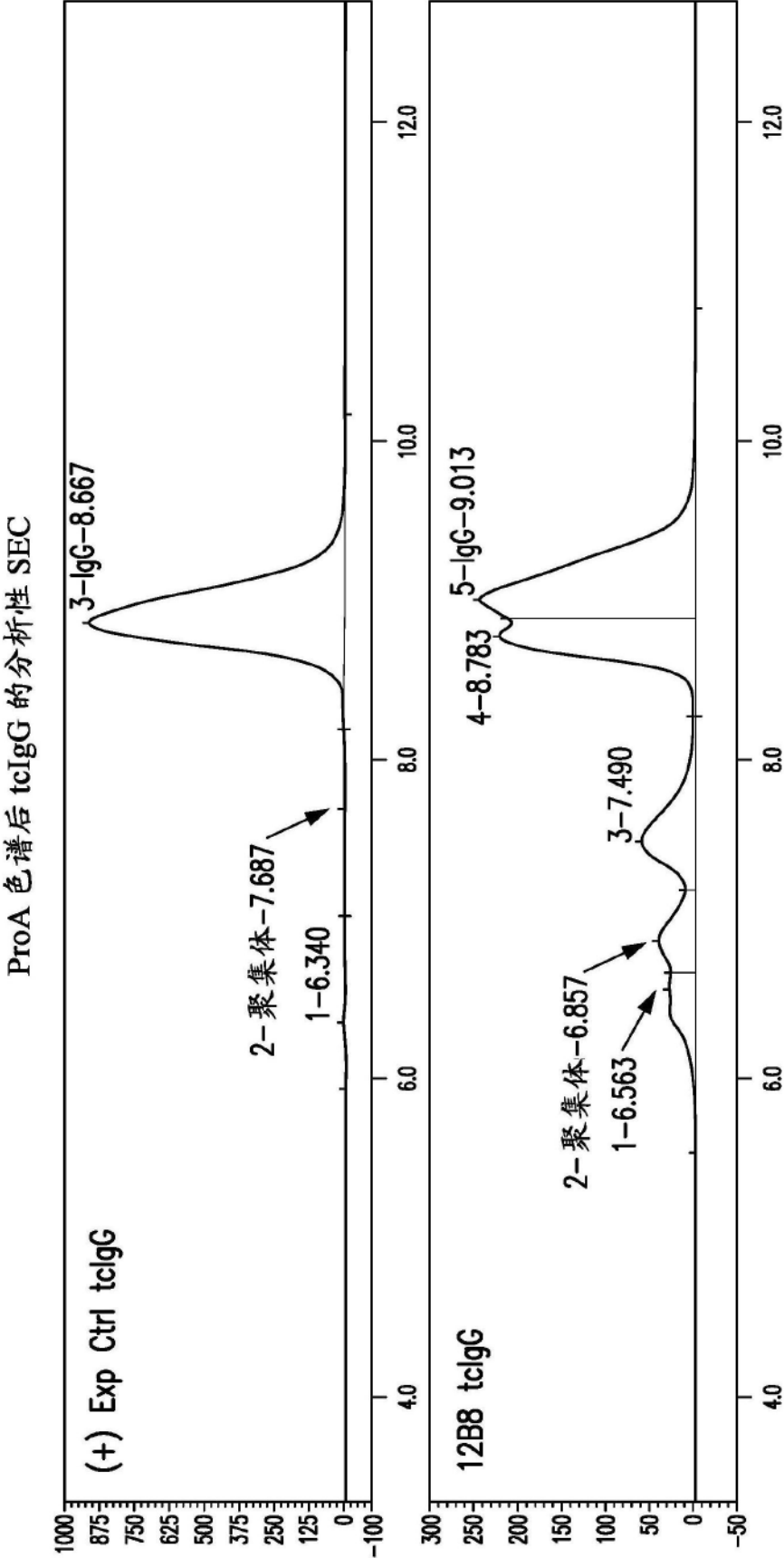


图19C

ProA 色谱后 tcIgG 的分析性 SEC

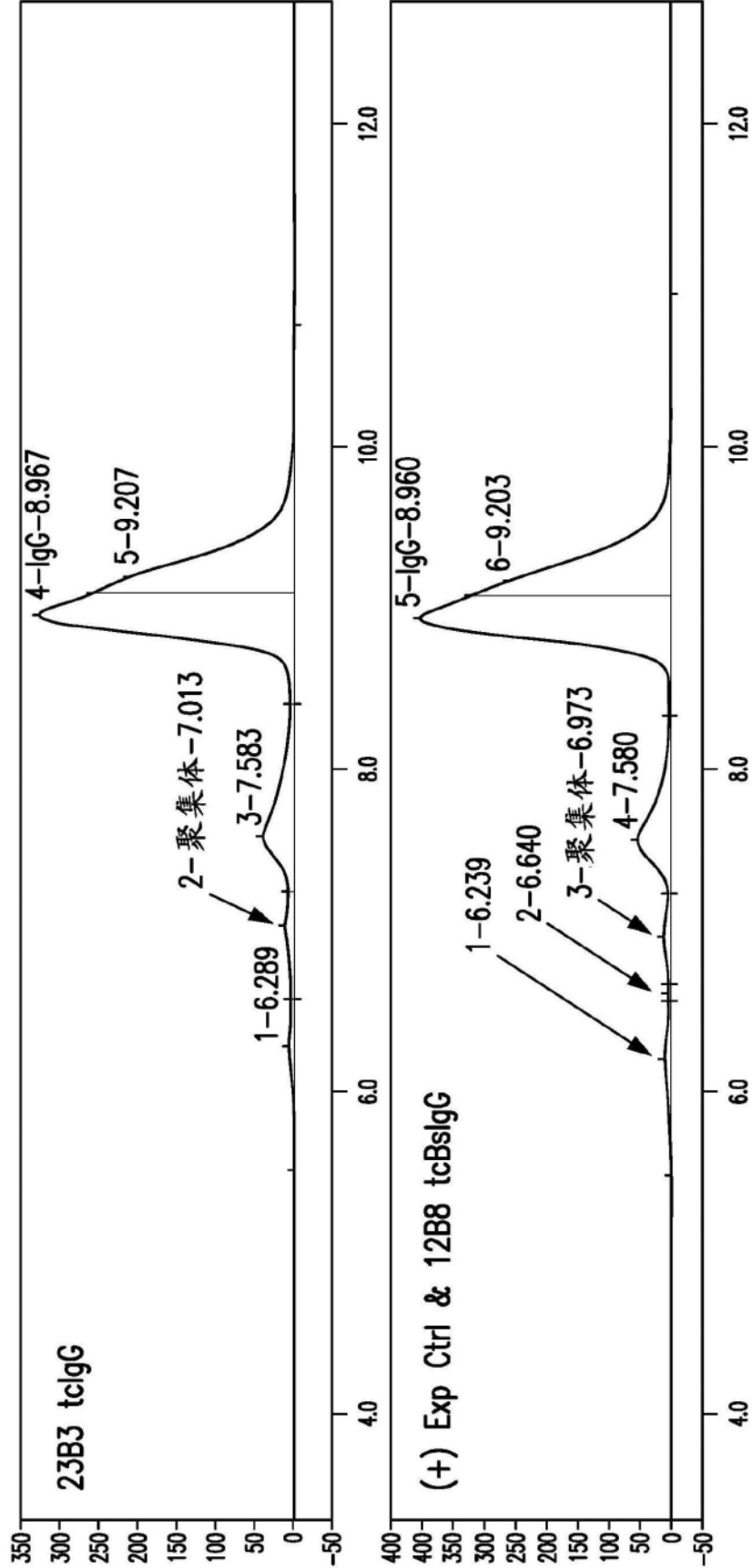


图19C (续)

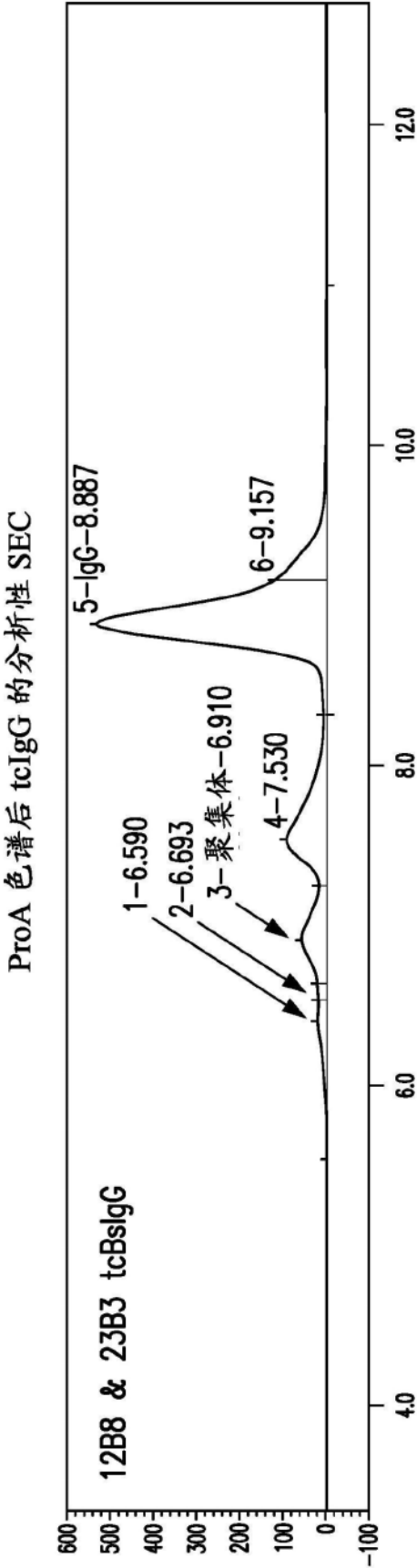


图19C (续)

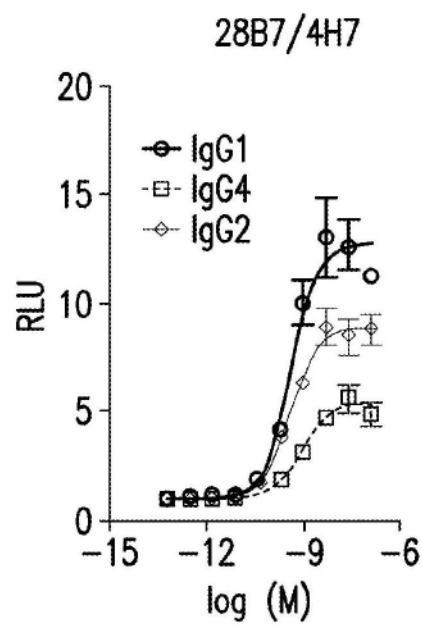


图20A

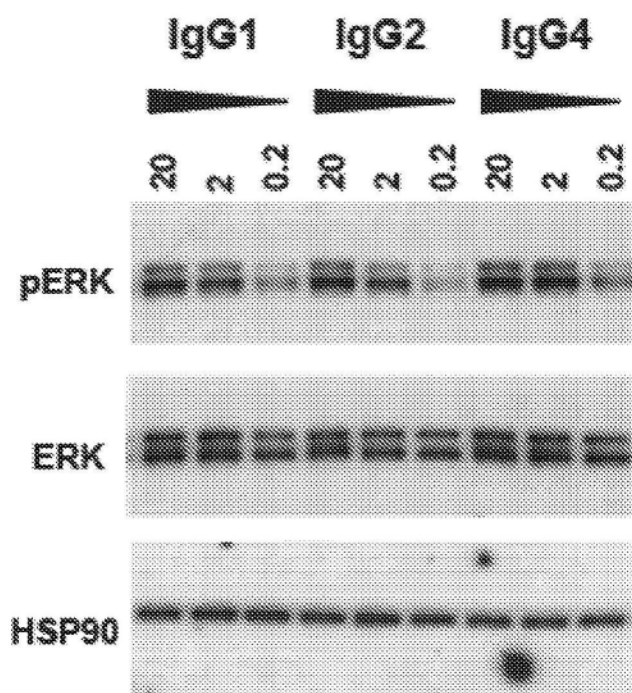


图20B

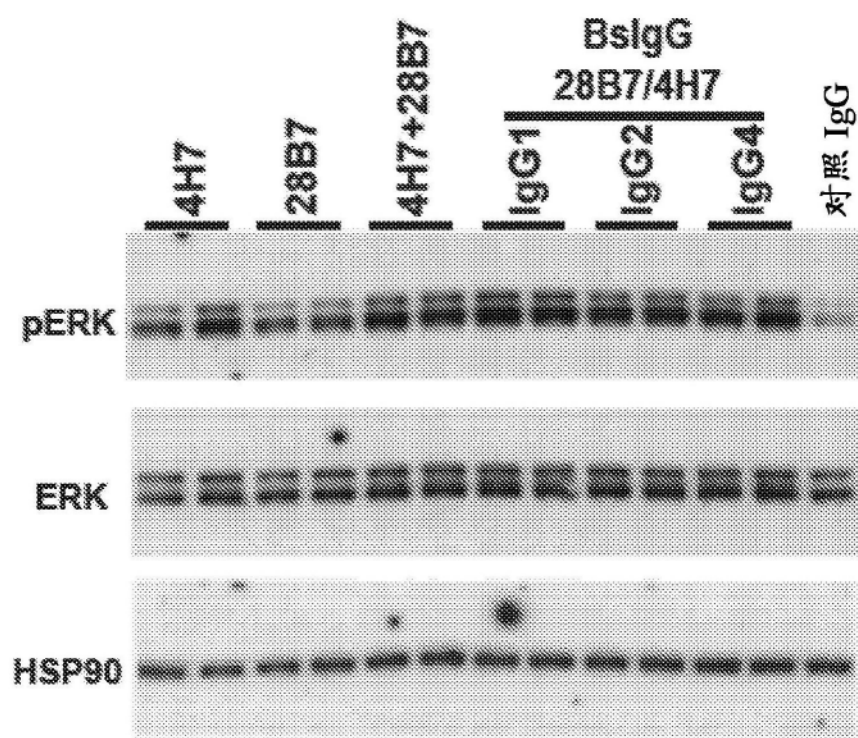
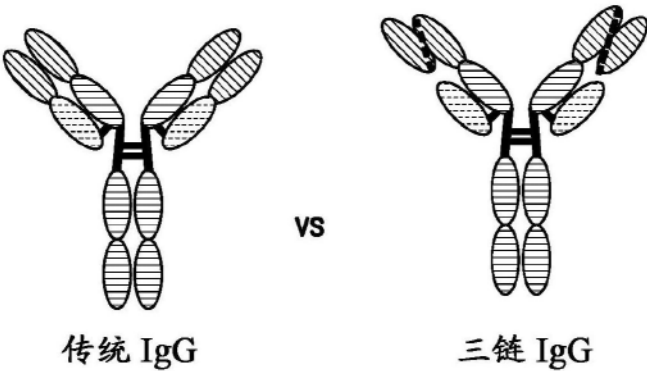


图20C

结合亲和力 (KD) 差异



抗体 ID	IgG			tclgG		
	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (nM)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (nM)
28B7	104400	27615	2.65	119050	24440	2.05
4H7	571050	44430	0.78	332200	42735	1.29

传统 IgG 和 tclgG 形式之间 KD 的极小差异

图21