



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111499754 A

(43)申请公布日 2020.08.07

(21)申请号 202010113291.0	<i>C12N 15/13</i> (2006.01)
(22)申请日 2014.12.23	<i>C12N 15/63</i> (2006.01)
(30)优先权数据	<i>A61K 39/395</i> (2006.01)
61/920,396 2013.12.23 US	<i>A61K 45/06</i> (2006.01)
62/081,435 2014.11.18 US	<i>A61P 3/00</i> (2006.01)
(62)分案原申请数据	<i>A61P 3/10</i> (2006.01)
201480074541.7 2014.12.23	<i>A61P 15/00</i> (2006.01)
(71)申请人 豪夫迈·罗氏有限公司	<i>A61P 3/04</i> (2006.01)
地址 瑞士巴塞尔	<i>A61P 1/16</i> (2006.01)
(72)发明人 陈咏梅 詹姆斯·欧内斯特	<i>A61P 3/06</i> (2006.01)
金酷松 园田纯一郎	<i>A61P 9/12</i> (2006.01)
克里斯托夫·斯皮斯	<i>A61P 37/02</i> (2006.01)
斯科特·斯塔维奇 吴岩	<i>A61P 25/28</i> (2006.01)
(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任	<i>A61P 25/16</i> (2006.01)
公司 11021	<i>A61P 21/00</i> (2006.01)
代理人 张莹 程金山	<i>A61P 25/00</i> (2006.01)
(51) Int. Cl.	<i>A61P 15/08</i> (2006.01)
<i>C07K 16/46</i> (2006.01)	<i>A61P 19/08</i> (2006.01)
	<i>A61P 43/00</i> (2006.01)

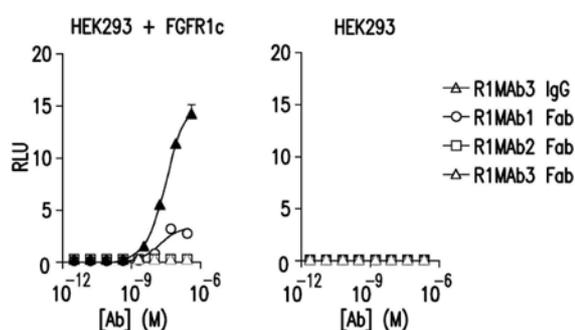
权利要求书4页 说明书72页
序列表1页 附图59页

(54)发明名称

抗体及其使用方法

(57)摘要

本文公开的主题提供了结合KLB和FGFR1的抗体和使用它们的方法。在某些实施方案中,本公开内容的抗体包括双特异性抗体,其结合存在于FGFR1上的表位且结合存在于KLB上的表位。



1. 分离的结合 β -Klotho (KLB) 和成纤维细胞生长因子受体1 (FGFR1) 的双特异性抗体或其抗原结合部分。
2. 根据权利要求1所述的抗体, 其中所述抗体或其抗原结合部分结合KLB的C-端结构域。
3. 根据权利要求1所述的抗体, 其中所述抗体或其抗原结合部分结合包含SEQ ID NO: 142所示的氨基酸序列的KLB片段。
4. 根据权利要求1-3中的任一项所述的抗体, 其中所述抗体或其抗原结合部分结合FGFR1表位, 所述FGFR1表位是在包含SEQ ID NO: 143或SEQ ID NO: 144所示的氨基酸序列的FGFR1c片段内。
5. 根据权利要求1-4中的任一项所述的抗体, 其中所述抗体或其抗原结合部分降低体内血糖水平。
6. 根据权利要求1-5中的任一项所述的抗体, 其中所述抗体或其抗原结合部分不显著地影响骨密度。
7. 根据权利要求1-6中的任一项所述的抗体, 其中所述抗体或其抗原结合部分不显著地影响肝。
8. 根据权利要求1-7中的任一项所述的抗体, 其中所述抗体或其抗原结合部分以比FGF21诱导的水平显著更低的水平在肝中诱导ERK和MEK磷酸化。
9. 根据权利要求1-8中的任一项所述的抗体, 其中所述抗体或其抗原结合部分以 10^{-8} M至 10^{-13} M的 K_d 结合KLB。
10. 根据权利要求1-9中的任一项所述的抗体, 其中所述抗体或其抗原结合部分以10nM至约 10μ M的 K_d 结合FGFR1c。
11. 根据权利要求1-10中的任一项所述的抗体, 其中所述抗体或其抗原结合部分是单克隆抗体。
12. 根据权利要求1-11中的任一项所述的抗体, 其中所述抗体或其抗原结合部分是人抗体、人源化抗体或嵌合抗体。
13. 根据权利要求1-12中的任一项所述的抗体, 其中所述抗体或其抗原结合部分包含重链可变区和轻链可变区, 其中所述重链可变区包含与SEQ ID NO: 128所示的序列具有至少95%同一性的氨基酸序列, 且所述轻链可变区包含与SEQ ID NO: 130所示的序列具有至少95%同一性的氨基酸序列。
14. 根据权利要求1-12中的任一项所述的抗体, 其中所述抗体或其抗原结合部分包含:
 - (a) 重链可变区CDR1, 其包含选自SEQ ID NO: 1-15的氨基酸序列, 及其保守置换;
 - (b) 重链可变区CDR2结构域, 其包含选自SEQ ID NO: 16-31的氨基酸序列, 及其保守置换;
 - (c) 重链可变区CDR3结构域, 其包含选自SEQ ID NO: 32-47的氨基酸序列, 及其保守置换;
 - (d) 轻链可变区CDR1结构域, 其包含选自SEQ ID NO: 48-62的氨基酸序列, 及其保守置换;
 - (e) 轻链可变区CDR2结构域, 其包含选自SEQ ID NO: 63-78的氨基酸序列, 及其保守置换; 和

(f) 轻链可变区CDR3结构域,其包含选自SEQ ID NO:79-93的氨基酸序列,及其保守置换。

15. 根据权利要求1-12中的任一项所述的抗体,其中所述抗体或其抗原结合部分包含:

(a) 重链可变区CDR1结构域,其包含SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列,及其保守置换;

(b) 重链可变区CDR2结构域,其包含SEQ ID NO:31所示的氨基酸序列,及其保守置换;

(c) 重链可变区CDR3结构域,其包含SEQ ID NO:47所示的氨基酸序列,及其保守置换;

(d) 轻链可变区CDR1结构域,其包含SEQ ID NO:62所示的氨基酸序列,及其保守置换;

(e) 轻链可变区CDR2结构域,其包含SEQ ID NO:78所示的氨基酸序列,及其保守置换;

和

(f) 轻链可变区CDR3结构域,其包含SEQ ID NO:93所示的氨基酸序列,及其保守置换。

16. 抗- β -Klortho抗体或其抗原结合部分,包含:(a) HVR-H3,其包含选自SEQ ID NO:1-15的氨基酸序列,(b) HVR-L3,其包含选自SEQ ID NO:79-93的氨基酸序列,和(c) HVR-H2,其包含选自SEQ ID NO:16-31的氨基酸序列。

17. 根据权利要求16所述的抗体,其中所述抗体或其抗原结合部分包含:(a) HVR-H1,其包含选自SEQ ID NO:1-15的氨基酸序列,(b) HVR-H2,其包含选自SEQ ID NO:16-31的氨基酸序列,和(c) HVR-H3,其包含选自SEQ ID NO:32-47的氨基酸序列。

18. 根据权利要求17所述的抗体,还包含:(a) HVR-L1,其包含选自SEQ ID NO:48-62的氨基酸序列,(b) HVR-L2,其包含选自SEQ ID NO:63-78的氨基酸序列,和(c) HVR-L3,其包含选自SEQ ID NO:79-93的氨基酸序列。

19. 根据权利要求18所述的抗体,其中所述抗体或其抗原结合部分包含:(a) HVR-H1,其包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列,(b) HVR-H2,其包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列,(c) HVR-H3,其包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列,(d) HVR-L1,其包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列,(e) HVR-L2,其包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列,和(f) HVR-L3,其包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列。

20. 根据权利要求18所述的抗体,其中所述抗体或其抗原结合部分包含:(a) HVR-H1,其包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列,(b) HVR-H2,其包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列,(c) HVR-H3,其包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列,(d) HVR-L1,其包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列,(e) HVR-L2,其包含SEQ ID NO:78的氨基酸序列,和(f) HVR-L3,其包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列。

21. 根据权利要求20所述的抗体,其中所述抗体或其抗原结合部分包含:(a) 重链可变区,其包含SEQ ID NO:128的氨基酸序列,和(b) 轻链可变区,其包含SEQ ID NO:130的氨基酸序列。

22. 根据权利要求20所述的抗体,其中所述抗体或其抗原结合部分包含:(a) 重链,其包含SEQ ID NO:129的氨基酸序列,和(b) 轻链,其包含SEQ ID NO:131的氨基酸序列。

23. 竞争性地抑制权利要求16-22的任意抗体的结合的抗-KLB抗体或其抗原结合部分。

24. 根据权利要求23所述的抗体,其中所述抗体或其抗原结合部分与12A11或8C5抗体结合相同的表位。

25. 根据权利要求23所述的抗体,其中所述抗体或其抗原结合部分结合在KLB的C-端结构域内的表位。

26. 根据权利要求25所述的抗体,其中所述抗体结合在由氨基酸序列SSPTRLAVIPWGVKLLRWVRRNYGDMDIYITAS (SEQ ID NO:142) 组成的KLB片段内的KLB表位。

27. 抗-KLB抗体或其抗原结合部分,包含:(a) 重链可变区,其与SEQ ID NO:128的氨基酸序列具有至少95%序列同一性;(b) 轻链可变区,其与SEQ ID NO:130的氨基酸序列具有至少95%序列同一性;和(c) 如在(a)中的重链可变区和如在(b)中的轻链可变区。

28. 根据权利要求16-27中的任一项所述的抗体,其中所述抗体是双特异性抗体。

29. 根据权利要求28所述的抗体,其中所述抗体包含结合FGFR1的可变结构域。

30. 根据权利要求28所述的抗体,其中FGFR1是FGFR1c。

31. 根据权利要求30所述的抗体,其中所述抗体结合由氨基酸序列KLHAVPAAKTVKFKCP (SEQ ID NO:143) 或FKPDHRIGGYKVRY (SEQ ID NO:144) 组成的FGFR1c片段。

32. 根据权利要求30所述的抗体,其中所述抗体包含:(a) HVR-H1,其包含SEQ ID NO:136的氨基酸序列,(b) HVR-H2,其包含SEQ ID NO:137的氨基酸序列,(c) HVR-H3,其包含SEQ ID NO:138的氨基酸序列,(d) HVR-L1,其包含SEQ ID NO:139的氨基酸序列,(e) HVR-L2,其包含SEQ ID NO:140的氨基酸序列,和(f) HVR-L3,其包含SEQ ID NO:141的氨基酸序列。

33. 根据权利要求30所述的抗体,其中所述抗体包含:(a) 重链可变区,其包含SEQ ID NO:132的氨基酸序列,和(b) 轻链可变区,其包含SEQ ID NO:134的氨基酸序列。

34. 根据权利要求30所述的抗体,其中所述抗体包含:(a) 重链,其包含SEQ ID NO:133的氨基酸序列,和(b) 轻链,其包含SEQ ID NO:135的氨基酸序列。

35. 一种分离的抗-KLB/抗-FGFR1双特异性抗体,其包含:

(a) 包含重链可变区和轻链可变区的第一抗体或其抗原结合部分,其中所述重链可变区包含与SEQ ID NO:128所示的序列具有至少95%同一性的氨基酸序列,且所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:130所示的序列具有至少95%同一性的氨基酸序列;和

(b) 包含重链可变区和轻链可变区的第二抗体或其抗原结合部分,其中所述重链可变区包含与SEQ ID NO:132所示的序列具有至少95%同一性的氨基酸序列,且所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:134所示的序列具有至少95%同一性的氨基酸序列。

36. 一种分离的抗-KLB/抗-FGFR1双特异性抗体,其包含:

(a) 包含重链区域和轻链区域的第一抗体或其抗原结合部分,其中所述重链区域包含与SEQ ID NO:129所示的序列具有至少95%同一性的氨基酸序列,且所述轻链区域包含与SEQ ID NO:131所示的序列具有至少95%同一性的氨基酸序列;和

(b) 包含重链区域和轻链区域的第二抗体或其抗原结合部分,其中所述重链区域包含与SEQ ID NO:133所示的序列具有至少95%同一性的氨基酸序列,且所述轻链区域包含与SEQ ID NO:135所示的序列具有至少95%同一性的氨基酸序列。

37. 一种分离的核酸,其编码根据权利要求1-36中的任一项所述的抗体。

38. 一种宿主细胞,其包含根据权利要求37所述的核酸。

39. 一种生产抗体的方法,所述方法包括培养根据权利要求38所述的宿主细胞,从而生产所述抗体。

40. 根据权利要求39所述的方法,所述方法还包括从所述宿主细胞回收所述抗体。

41. 一种药物制剂,其包含一种或多种根据权利要求1-36中的任一项所述的抗体和药学上可接受的载体。

42. 根据权利要求41所述的药物制剂,所述药物制剂还包含另外的治疗剂。

43. 用作药物的根据权利要求1-36中的任一项所述的抗体。

44. 用于治疗病症的根据权利要求1-36中的任一项所述的抗体,所述病症选自多囊卵巢综合征(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)、高脂血症、高血压、II型糖尿病、非II型糖尿病、I型糖尿病、潜伏的自身免疫性糖尿病(LAD)和青年成熟型糖尿病(MODY)和老龄化及有关的疾病诸如阿尔茨海默氏病、帕金森病和ALS。

45. 用于活化KLB/FGFR1受体复合物的根据权利要求1-36中的任一项所述的抗体。

46. 根据权利要求1-36中的任一项所述的抗体在制备药物中的用途,所述药物用于治疗代谢病症。

47. 根据权利要求1-36中的任一项所述的抗体在制备药物中的用途,所述药物用于活化KLB/FGFR1受体复合物。

48. 根据权利要求46所述的用途,其中所述代谢病症是糖尿病。

49. 一种治疗患有疾病的个体的方法,所述疾病选自多囊卵巢综合征(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),高脂血症,高血压,II型糖尿病,非II型糖尿病,I型糖尿病,潜伏的自身免疫性糖尿病(LAD),青年成熟型糖尿病(MODY)和老龄化及有关的疾病诸如阿尔茨海默氏病、帕金森病和ALS,巴-比综合征,普拉德-威利综合征,阿尔斯特伦综合征,Cohen综合征,奥尔布赖特遗传性骨营养不良(假性甲状旁腺功能减退),卡彭特综合征,MOMO综合征,鲁宾斯坦-泰比综合征,脆性X综合征和Börjeson-Forssman-Lehman综合征,其中所述方法包括给所述个体施用有效量的一种或多种根据权利要求1-36中的任一项所述的抗体。

50. 根据权利要求49所述的方法,其中所述疾病是糖尿病。

51. 根据权利要求49所述的方法,所述方法还包括给所述个体施用另外的治疗剂。

52. 一种活化个体中的KLB-FGFR1受体复合物的方法,所述方法包括给所述个体施用有效量的根据权利要求1-36中的任一项所述的抗体。

53. 根据权利要求1-36中的任一项所述的抗体,其中所述抗体或其抗原结合部分活化KLB-FGFR1c复合物。

抗体及其使用方法

[0001] 本申请是申请日为2014年12月23日、申请号为201480074541.7、发明名称为“抗体及其使用方法”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 优先权声明

[0003] 本申请要求2013年12月23日提交的美国临时专利申请系列号61/920,396和2014年11月18日提交的美国临时专利申请系列号62/081,435的优先权,它们二者通过引用整体并入本文。

[0004] 序列表

[0005] 本申请含有序列表,其已经以ASCII格式电子地提交,且特此通过引用整体并入。所述ASCII拷贝(创建于2014年12月22日)命名为00B206.0170_SL.txt,且大小是155,738字节。

技术领域

[0006] 本发明涉及结合 β -Klotho (KLB)、成纤维细胞生长因子受体1 (FGFR1) 或二者的抗体以及使用它们的方法。

背景技术

[0007] 成纤维细胞生长因子21 (FGF21) 和它的最接近的同系物FGF19是FGF超家族的成员。FGF21信号传递需要FGF-受体 (FGFR) 同工型和膜结合的共受体Klotho- β (KLB) (Ogawa等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104 (18) : 7432-37 (2007) ; US2010/0184665)。还已经证实FGF19通过与KLB结合的FGFR同工型而发信号 (Wu等人, J. Biol. Chem. 282 (40) : 29069-29072 (2007))。在由哺乳动物物种编码的FGFR的7种主要同工型 (1b、2b、3b、1c、2c、3c和4) 中,仅三种同工型FGFR1c、2c和3c可以通过FGF19和FGF21 (当被共受体KLB结合时) 转导信号传递,所述共受体KLB主要在肝、脂肪组织和胰腺中表达 (Goetz和Mohammadi, Nature reviews. Molecular Cell Biology 14, 166-180 (2013))。在这些受体中,FGFR1c似乎在介导FGF21的代谢作用中起主要作用。不受限于特定理论,据信,FGF21通过在有膜结合的共受体KLB存在下诱导FGFR同工型的同源二聚化而起作用。不同于其它FGF配体,FGF21表现出非常低的对任何单独FGFR的亲合力。但是,通过C-端尾巴区域与KLB的高亲合力结合会将FGF21募集至FGFR/KLB复合物,从而允许FGF21与FGFR相互作用 (尽管与单独FGFR是低亲合力)。

[0008] FGF21被鉴别为一种有效的改变疾病的蛋白剂,其逆转动物疾病模型中的肥胖和II型糖尿病 (Kharitonov等人, J. Clin. Invest. 115 (6) : 1627-35 (2005))。已经证实重组FGF21会在瘦素-信号传递-缺陷型 (ob/ob或db/db) 小鼠或高脂肪饮食 (HFD) 饲喂的小鼠中减少肝脂质、改善胰岛素敏感性和使血糖控制正常化。还已经在每天用重组FGF21治疗的肥胖的和患糖尿病的恒河猴中观察到血糖的降低和各种心血管风险因素的改善。已经证实FGF21和FGF19会活化肥胖的啮齿类动物中解偶联蛋白1 (UCP1)-阳性的脂肪组织 (棕色和米色脂肪组织; BAT) 的产热功能 (Fu等人, Endocrinology 145, 2594-2603 (2004) ; Coskun等

人, *Endocrinology* 149,6018-6027 (2008); Fisher等人, *Genes&Development* 26,271-281 (2012)。

[0009] 尽管目前正在试验重组FGF21或FGF19类似物用于治疗代谢疾病的临床应用,但是它们的用于治疗干预的开发已经被证实是挑战性的。例如,FGF21在非人灵长类动物中的血清半衰期(约2小时)对于实际临床应用而言过短,且在循环中的剩余FGF21蛋白可以通过蛋白水解性裂解而快速地灭活。已经做出努力来通过蛋白质工程改善这些性能,但是这样的修饰可以增加免疫原性和其它修饰特异性的不良作用。另一个重大挑战是来自长期FGF21介导的治疗的长期不良作用的可能性。例如,已经报道FGF21会通过诱导SOCS2(生长激素受体信号传递的一种抑制剂)而诱发肝生长激素抗性(Inagaki等人, *Cell Metab.* 8:77-83 (2008))。在人类中,生长激素抗性或缺乏与儿童和成年人中的低骨量有关,并且FGF21的转基因过表达或用重组FGF21对小鼠的2周治疗会导致骨矿物质密度的急剧损失。尚未证实,FGF21的骨相关的不良作用可以与有益的代谢作用脱离联系。此外,FGF19的转基因过度产生可以通过FGF受体(FGFR) 4的活化而导致肝细胞癌变(Fu等人, *Endocrinology* 145,2594-2603 (2004); Tomlinson等人, *Endocrinology* 143,1741-1747 (2002); French等人, *PLoS One* 7,e36713 (2012))。

[0010] 重组单克隆抗体(Ab)可以作为一种强效治疗模态起作用,因为它们可以提供优良的靶标选择性、药代动力学特性和其它对于药学试剂而言重要的性能(Chan和Carter, *Nature reviews.Immunology* 10,301-316 (2010))。例如,据报道,对FGFR1c特异性的抗体拮抗剂会在小鼠和猴中诱导重量减轻(WO2005/037235),并且激动性抗体介导的FGFR1c的选择性活化足以重演糖尿病小鼠中FGF21导致的胰岛素致敏(WO2012/158704; Wu等人, *Science Translational Med.* 3(113):1-10 (2011))。结合KLB/FGFR1c复合物的抗体已经被提议为活化剂/治疗剂(US 7,537,903; WO2011/071783; WO2012/158704)。其他人已经研究了两个替代方案来选择性地活化FGFR1c/KLB复合物,诸如被称作mimAb1的高亲和力抗-KLB抗体(Foltz等人, *Sci. Transl. Med.* 4:162ra153 (2012))和与人血清白蛋白(HSA)连接的双特异性抗-FGFR1/KLB亲和体(avimer)多肽C3201(US 8,372,952)。

[0011] 鉴于FGF19和FGF21在葡萄糖代谢中的重要作用,本领域中仍然需要开发用于调节FGF19或FGF21介导的活性的治疗分子和方法。

发明内容

[0012] 本公开内容提供了结合KLB的抗体、结合FGFR1的抗体、和结合KLB和FGFR1两者的双特异性抗体、以及使用它们的方法。本发明部分地基于结合KLB和FGFR1两者的双特异性抗体的发现,所述双特异性抗体选择性地活化FGFR1c/KLB受体复合物并诱导从FGF21-样活性预见到的有益代谢变化,包括重量减轻以及葡萄糖和脂类代谢的改善,对肝没有显著影响且没有骨量损失。

[0013] 在某些实施方案中,所述抗体是双特异性抗体。例如,且不作为限制,一种分离的本发明的抗体可以结合 β -Klotho (KLB) 和成纤维细胞生长因子受体1 (FGFR1),其中所述抗体结合KLB的C-端结构域。例如且不作为限制,一种分离的本公开内容的抗体结合KLB和FGFR1c两者。在某些实施方案中,所述抗体结合包括氨基酸序列

[0014] SSPTRLAVIPWGVKLLRWVRRNYGDMDIYITAS (SEQ ID NO:142) 的KLB片段。在某些实施

方案中,所述抗体结合包括氨基酸序列KLHAVPAAKTVKFKCP (SEQ ID NO:143) 或FKPDHRIGGYKVRY (SEQ ID NO:144) 的FGFR1片段内的表位。

[0015] 在某些实施方案中,本公开内容的抗体活化KLB/FGFR1c复合物。在某些实施方案中,本公开内容的抗体降低体内血糖水平。在某些实施方案中,所述抗体不显著地影响骨密度。在某些实施方案中,本公开内容的抗体对肝没有显著影响。在某些实施方案中,与FGF21诱导相比,所述抗体以显著更低的水平诱导肝中的ERK和MEK磷酸化。在某些实施方案中,所述抗体以 10^{-8}M 至 10^{-13}M 的 K_d 结合KLB。在某些实施方案中,本公开内容的抗体可以以 10^{-8}M 至 10^{-13}M 的 K_d 结合FGFR1蛋白。在某些实施方案中,本公开内容的抗体可以以 10^{-8}M 至 10^{-13}M 的 K_d 结合FGFR1c。在某些实施方案中,所述抗体以 $<10\text{nM}$ 的 K_d 结合KLB且以 $>300\text{nM}$ 的 K_d 结合FGFR1c。在某些实施方案中,抗-KLB/抗-FGFR1双特异性抗体可以包括具有约 10nM 至约 $10\mu\text{M}$ 的 K_d 的抗-FGFR1臂。

[0016] 在某些实施方案中,本公开内容的抗体结合存在于KLB上的表位。例如,且不作为限制,本公开内容提供了一种抗-KLB抗体,其与图3A和B中所示的抗体结合相同的表位。在某些实施方案中,本公开内容的抗-KLB抗体与12A11或8C5抗体结合相同的表位。在某些实施方案中,所述抗-KLB抗体结合在KLB的C-端结构域内的表位。在某些实施方案中,所述抗-KLB抗体结合由氨基酸序列

[0017] SSPTRLAVIPWGVKLLRWVRRNYGDMDIYITAS (SEQ ID NO:142) 组成的KLB片段。

[0018] 在某些实施方案中,本公开内容的抗-KLB/抗-FGFR1双特异性抗体包括包含重链可变区和轻链可变区的第一抗体或其抗原结合部分,其中所述重链可变区包括与SEQ ID NO:128所示的序列具有至少95%同一性的氨基酸序列,且所述轻链可变区包括与SEQ ID NO:130所示的序列具有至少95%同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,所述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,其中所述重链可变区包括与SEQ ID NO:132所示的序列具有至少95%同一性的氨基酸序列,且所述轻链可变区包括与SEQ ID NO:134所示的序列具有至少95%同一性的氨基酸序列。

[0019] 在某些实施方案中,本公开内容的抗-KLB/抗-FGFR1双特异性抗体包括包含重链区域和轻链区域的第一抗体或其抗原结合部分,其中所述重链区域包括与SEQ ID NO:129所示的序列具有至少95%同一性的氨基酸序列,且所述轻链区域包括与SEQ ID NO:131所示的序列具有至少95%同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,所述第二抗体或其抗原结合部分包括重链区域和轻链区域,其中所述重链区域包括与SEQ ID NO:133所示的序列具有至少95%同一性的氨基酸序列,且所述轻链区域包括与SEQ ID NO:135所示的序列具有至少95%同一性的氨基酸序列。

[0020] 本公开内容还提供了一种抗-KLB抗体,其包括:(a) HVR-H3,其包含选自SEQ ID NO:1-15的氨基酸序列,(b) HVR-L3,其包含选自SEQ ID NO:79-93的氨基酸序列,和(c) HVR-H2,其包含选自SEQ ID NO:16-31的氨基酸序列。

[0021] 在某些实施方案中,所述抗-KLB抗体包含(a) HVR-H1,其包含选自SEQ ID NO:1-15的氨基酸序列,(b) HVR-H2,其包含选自SEQ ID NO:16-31的氨基酸序列,和(c) HVR-H3,其包含选自SEQ ID NO:32-47的氨基酸序列。

[0022] 在某些实施方案中,所述抗-KLB抗体还包含(a) HVR-L1,其包含选自SEQ ID NO:48-62的氨基酸序列,(b) HVR-L2,其包含选自SEQ ID NO:63-78的氨基酸序列,和(c) HVR-

L3,其包含选自SEQ ID NO:79-93的氨基酸序列。

[0023] 在某些实施方案中,所述抗-KLB抗体包含 (a) HVR-H1,其包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列, (b) HVR-H2,其包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列, (c) HVR-H3,其包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列, (d) HVR-L1,其包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列, (e) HVR-L2,其包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列,和 (f) HVR-L3,其包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列。

[0024] 在某些实施方案中,所述抗-KLB抗体包含 (a) HVR-H1,其包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列, (b) HVR-H2,其包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列, (c) HVR-H3,其包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列, (d) HVR-L1,其包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列, (e) HVR-L2,其包含SEQ ID NO:78的氨基酸序列,和 (f) HVR-L3,其包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列。

[0025] 在某些实施方案中,所述抗-KLB抗体包含 (a) 重链可变区,其包含SEQ ID NO:128的氨基酸序列,和 (b) 轻链可变区,其包含SEQ ID NO:130的氨基酸序列。在某些实施方案中,所述抗体包含 (a) 重链,其包含SEQ ID NO:129的氨基酸序列,和 (b) 轻链,其包含SEQ ID NO:131的氨基酸序列。

[0026] 在另一个方面,本公开内容提供了一种抗-KLB抗体,其包含 (a) 与SEQ ID NO:128的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的重链可变区; (b) 与SEQ ID NO:130的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的轻链可变区;和 (c) 如在 (a) 中的重链可变区和如在 (b) 中的轻链可变区。

[0027] 本公开内容还提供了结合FGFR1 (例如,FGFR1c) 的抗体。例如,且不作为限制,本公开内容的抗体包含结合FGFR1的可变结构域。在某些实施方案中,所述抗体结合由氨基酸序列KLHAVPAAKTVKFKCP (SEQ ID NO:143) 或FKPDHRIGGYKVRY (SEQ ID NO:144) 组成的FGFR1片段。在某些实施方案中,所述抗体包含: (a) HVR-H1,其包含SEQ ID NO:136的氨基酸序列, (b) HVR-H2,其包含SEQ ID NO:137的氨基酸序列, (c) HVR-H3,其包含SEQ ID NO:138的氨基酸序列, (d) HVR-L1,其包含SEQ ID NO:139的氨基酸序列, (e) HVR-L2,其包含SEQ ID NO:140的氨基酸序列,和 (f) HVR-L3,其包含SEQ ID NO:141的氨基酸序列。在某些实施方案中,所述抗体包含: (a) 重链可变区,其包含SEQ ID NO:132的氨基酸序列,和 (b) 轻链可变区,其包含SEQ ID NO:134的氨基酸序列。在某些实施方案中,所述抗体包含: (a) 重链,其包含SEQ ID NO:133的氨基酸序列,和 (b) 轻链,其包含SEQ ID NO:135的氨基酸序列。在某些实施方案中,本公开内容的抗体结合由氨基酸序列

[0028] KLHAVPAAKTVKFKCP (SEQ ID NO:143) 或FKPDHRIGGYKVRY (SEQ ID NO:144) 组成的FGFR1c片段。

[0029] 在某些实施方案中,本公开内容的抗体是单克隆抗体。在某些实施方案中,所述抗体是人抗体、人源化抗体或嵌合抗体。在某些实施方案中,所述抗体具有降低的效应子功能。

[0030] 在另一个方面,本公开内容提供了一种分离的核酸,其编码本公开内容的抗体。在某些实施方案中,本公开内容提供了一种宿主细胞,其包含本公开内容的核酸。在某些实施方案中,本公开内容提供了一种生产抗体的方法,所述方法包括培养本公开内容的宿主细胞从而生产所述抗体。在某些实施方案中,该方法还包括从所述宿主细胞回收所述抗体。

[0031] 本公开内容还提供了一种药物制剂,其包括一种或多种本发明的抗体和药学上可接受的载体。在某些实施方案中,所述药物制剂包含另外的治疗剂。

[0032] 在另一个方面,本公开内容提供了用作药物的本发明的抗体。在某些实施方案中,所述抗体用于治疗代谢病症,例如,多囊卵巢综合征(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)、高脂血症、高血压、II型糖尿病、非II型糖尿病、I型糖尿病、潜伏的自身免疫性糖尿病(LAD)和青年成熟型糖尿病(MODY)。在某些实施方案中,所述抗体用于治疗II型糖尿病。在某些实施方案中,所述抗体用于治疗肥胖。在某些实施方案中,本公开内容提供了一种抗体用于治疗巴-比(Bardet-Biedl)综合征、普拉德-威利(Prader-Willi)综合征、阿尔斯特伦(Alstrom)综合征、Cohen综合征、奥尔布赖特(Albright's)遗传性骨营养不良(假性甲状旁腺功能减退)、卡彭特(Carpenter)综合征、MOMO综合征、鲁宾斯坦-泰比(Rubinstein-Taybi)综合征、脆性X综合征和Börjeson-Forssman-Lehman综合征。在某些实施方案中,本公开内容提供了一种用于活化KLB/FGFR1受体复合物(例如,KLB/FGFR1c受体复合物)的抗体。

[0033] 在另一个方面,本公开内容提供了本文中公开的抗体在制备药物中的用途,所述药物用于治疗代谢病症,例如,多囊卵巢综合征(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)、高脂血症、高血压、II型糖尿病、非II型糖尿病、I型糖尿病、潜伏的自身免疫性糖尿病(LAD)和青年成熟型糖尿病(MODY)和老龄化及有关的疾病诸如阿尔茨海默氏病、帕金森病和ALS。在某些实施方案中,所述代谢病症是II型糖尿病。在某些实施方案中,所述代谢病症是肥胖。在某些实施方案中,制备用于活化KLB/FGFR1c受体复合物的药物。

[0034] 在另一个方面,本公开内容提供了一种治疗患有疾病的个体的方法,所述疾病选自多囊卵巢综合征(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)、高脂血症、高血压、II型糖尿病、非II型糖尿病、I型糖尿病、潜伏的自身免疫性糖尿病(LAD)和青年成熟型糖尿病(MODY)和老龄化及有关的疾病诸如阿尔茨海默氏病、帕金森病和ALS,所述方法包括给所述个体施用有效量的一种或多种本公开内容的抗体。在某些实施方案中,所述疾病是糖尿病,例如,II型糖尿病。在某些实施方案中,所述疾病是肥胖。在某些实施方案中,本公开内容提供了一种治疗患有疾病和/或病症的个体的方法,所述疾病和/或病症选自巴-比综合征、普拉德-威利综合征、阿尔斯特伦综合征、Cohen综合征、奥尔布赖特遗传性骨营养不良(假性甲状旁腺功能减退)、卡彭特综合征、MOMO综合征、鲁宾斯坦-泰比综合征、脆性X综合征和Börjeson-Forssman-Lehman综合征。在某些实施方案中,所述方法还包括给所述个体施用另外的治疗剂。在某些实施方案中,使用一种或多种本公开内容的抗体的方法不会影响个体的肝功能。在某些实施方案中,本公开内容提供了一种用于诱导重量减轻的方法,所述方法包括给个体施用有效量的一种或多种本公开内容的抗体。

[0035] 在另一个方面,本公开内容提供了一种活化个体中的KLB-FGFR1c受体复合物的方法,所述方法包括给所述个体施用有效量的本公开内容的抗体。

附图说明

[0036] 图1A描绘了抗-FGFR1抗体和抗体片段的激动活性。

[0037] 图1B描绘了使用抗-FGFR1抗体的结合竞争实验的结果。

[0038] 图1C描绘了对于本文公开的主题的抗-FGFR1抗体的结合而言重要的FGFR1中的氨

氨基酸残基。图1C以出现的顺序分别公开了SEQ ID NO:159、159、143和144。

[0039] 图1D描绘了位点特异性诱变的结果,以确定对于本文公开的主题的抗-FGFR1抗体的结合而言重要的氨基酸残基。

[0040] 图1E描绘了位点特异性诱变的结果,以确定对于本文公开的主题的抗-FGFR1抗体的结合而言重要的氨基酸残基。

[0041] 图1F描绘了对于FGFR1的空间填充模型上的结合而言重要的残基。

[0042] 图2A描绘了两种抗-FGFR1抗体对FGFR1b和FGFR1c的亲合力。

[0043] 图2B描绘了抗-FGFR1抗体对不同FGFR的结合。

[0044] 图2C描绘了一种抗-FGFR1抗体,其在L6细胞中基于GAL-ELK1 (ETS-样转录因子1)的萤光素酶测定中充当FGFR1的特异性激动剂。

[0045] 图2D描绘了一种抗-FGFR1抗体,其在HEK293细胞中基于GAL-ELK1的萤光素酶测定中充当FGFR1的特异性激动剂。

[0046] 图2E描绘了当注射进糖尿病ob/ob小鼠中时抗-FGFR1抗体正常化的血糖水平。

[0047] 图3A描绘了17种抗-KLB抗体的轻链可变区序列。CDR L1序列按顺序是SEQ ID NO:48-62;CDR L2序列按顺序是SEQ ID NO:63-78;且CDH L3序列按顺序是SEQ ID NO:79-93。轻链可变区序列按顺序是SEQ ID NO:111-127。

[0048] 图3B描绘了17种抗-KLB抗体的重链可变区序列。所述抗体的CDR H1序列按顺序是(11F1-8C5),SEQ ID NO:1-15;CDR H2序列按顺序是SEQ ID NO:16-31;CDR H3序列按顺序是SEQ ID NO:32-47。所述抗体的重链可变区序列按顺序是SEQ ID NO:94-110。

[0049] 图4描绘了在0.8 μ g/ml在FACS图中观察到的中间转移,其测量各种抗-KLB抗体与表达hKLB的293细胞的结合。

[0050] 图5描绘了各种抗-KLB抗体与hKLB-ECD-HIS蛋白的相对结合。

[0051] 图6A是代表本文公开的主题的抗体的示意图和关于KLB/FGFR1c双特异性Ab复合物形成用于信号活化的模型。

[0052] 图6B描绘了关于FGFR1c-KLB-FGF21复合物形成用于信号活化的模型。

[0053] 图6C描绘了使用FGFR1-缺陷型HEK293细胞的FGF21和双特异性抗体(BsAb)17活性的GAL-ELK1萤光素酶测定。转染细胞以表达指示的受体。

[0054] 图6D描绘了用指示的蛋白(FGF21(100nM)或IgG(33nM))处理1小时的原代人脂肪细胞的蛋白质印迹分析。每种处理使用一式两份样品。

[0055] 图7A描绘了在基于GAL-ELK1的萤光素酶测定中具有抗-FGFR1和抗-KLB臂的各种双特异性抗体的诱导。应当指出,具有R1MAb1臂的双特异性Ab表现出显著的独立于KLB的活性,据推测是由于R1MAb1 Fab的激动活性。用具有R1MAb2或R1MAb3臂的双特异性Ab没有观察到这样的活性。

[0056] 图7B描绘了具有抗-FGFR1和抗-KLB臂的各种双特异性抗体对信号传递的诱导依赖于FGFR1c和KLB。

[0057] 图7C描绘了具有抗-FGFR1和抗-KLB臂的双特异性抗体,其在表达重组hFGFR1c和hKLB的细胞中以剂量依赖性的方式诱导萤光素酶活性,但是在没有KLB表达的细胞中不诱导。

[0058] 图8A是抗-KLB/抗-FGFR1c双特异性抗体的三种变体的示意图。蓝色:人,和红色:

小鼠。寡糖链在(1)中在N297处的近似位置用 \wedge 指示。更少效应物的版本((2)和(3))由于N297G突变而缺少寡糖链。在(2)中的星号指示D265A突变的近似位置。还显示了凸起相对于孔洞的取向。(1)代表BsAb10;(2)代表BsAb20;和(3)代表BsAb17。

[0059] 图8B描绘了用BsAb10及其衍生物、对照IgG或FGF21处理10min的原代人脂肪细胞中的MSD pERK测定。数据代表平均值 \pm SEM(N=3)。bFKB1(1)代表BsAb10;bFKB1(2)代表BsAb20;和bFKB1(3)代表BsAb17。

[0060] 图9A描绘了大鼠L6成肌细胞中的GAL-ELK1萤光素酶测定。用指定受体的表达载体共转染细胞。在萤光素酶测定之前将转染的细胞与不同浓度的BsAb10或阳性对照、FGF21、FGF19或R1MAb1一起温育6h。

[0061] 图9B描绘了如在图9A中所示的类似GAL-ELK1萤光素酶测定。用指示的FGF21和BsAb17的组合处理转染的L6细胞。N=4。

[0062] 图9C描绘了如在图9A中所示的类似GAL-ELK1萤光素酶测定。用指示的FGF21和BsAb17的组合处理转染的L6细胞。N=4。

[0063] 图9D描绘了抗-FGFR1抗体和抗-KLB/抗-FGFR1双特异性抗体BsAB9和BsAb10对表达KLB、FGFR1c或二者的细胞的结合。

[0064] 图10A描绘了具有抗-FGFR1和抗-KLB臂的双特异性抗体和抗-FGFR1抗体对表达FGFR1c、KLB或二者的细胞的结合。

[0065] 图10B描绘了BsAb10结合表达人和鼠KLB/FGFR1的不同组合的HEK293细胞的 K_d 。

[0066] 图11描绘了200nM、100nM、50nM、25nM、12.5nM、6.25nM的BsAb10或预先形成的BsAb10/KLB复合物对固定化在芯片上的FGFR1-ECD-Fc融合蛋白的结合分析。为了制备预先形成的BsAb10/KLB复合物,将BsAb10和重组KLB-ECD蛋白以1:1比率预温育。注意到对于BsAb10/KLB复合物的解离速率比单独的BsAb10更慢,但是仅在FGFR1c(但是FGFR1b没有)捕获在芯片上时,从而指示三元复合物的形成。

[0067] 图12A是TR-FRET实验设计的示意图。

[0068] 图12B描绘了在添加指示的配体以后15分钟表达标记的SNAP-标记的FGFR1c蛋白(其具有或没有不带标签的KLB)的COS7细胞上的TR-FRET强度。分别以67nM、50nM、62.5nM、12nM使用BsAb17、FGF21、FGF1和FGF2。数据代表在665nm的FRET强度除以在620nm的供体发射(FRET比率)和三个独立实验(N=3)的平均值 \pm SEM。相对于PBS对照, $p < 0.05$ (*), < 0.01 (**), < 0.0001 (***)。

[0069] 图13A描绘了实验的结果以确定KLB的哪个部分对于两种抗-KLB抗体的结合而言是重要的。在顶部显示了KLB蛋白结构的示意图。每个条代表颜色代码化的人KLB、人KLA、兔KLB、大鼠KLB、小鼠KLB或嵌合的构建体。在右侧,显示了基于FACS的KLBmAb1和对照KLBmAb2与瞬时表达每种构建体的HEK293细胞的结合。应当指出,KLBmAb1没有结合兔KLB,但是将34氨基酸的片段(氨基酸805-838)替换为对应的人序列会赋予结合。

[0070] 图13B描绘了具有信号序列的人KLB蛋白的位置857-890区段的氨基酸序列(其对应于在不包括信号序列的KLB蛋白的位置805-838处的氨基酸序列)和在不同的指定物种中的对应序列。图13B以出现的顺序分别公开了SEQ ID NO:160-164。

[0071] 图14A描绘了通过SPR确定的FGF21和FGF19与BsAb10/KLB复合物的结合。将BsAb10捕获在芯片上,并依次注射KLB-ECD蛋白和FGF蛋白(以0.2、0.8或2 μ M)。

[0072] 图14B描绘了在大鼠L6成肌细胞中的GAL-ELK1萤光素酶测定的结果。用FGFR4和KLB的表达载体共转染细胞。在萤光素酶测定之前将转染的细胞与不同浓度的指示的蛋白一起温育6h。

[0073] 图14C描绘了为了监测H4IIE肝细胞瘤细胞中的ERK磷酸化而执行的蛋白质印迹。应当指出,BsAb17没有阻断FGF19的活化FGFR4/KLB复合物(图14B)或诱导H4IIE肝细胞瘤细胞中的ERK磷酸化(图14C)的能力。

[0074] 图15A描绘了以3mg/kg(瘦)或5mg/kg(db/db)单次腹膜内(i.p.)注射BsAb17或对照IgG以后,瘦C57BL/6和db/db小鼠(n=7)的血糖水平(第7天)、%体重变化(第7天)和每天食物摄入(第0-3天)。

[0075] 图15B描绘了饮食诱导的肥胖(DIO)小鼠的体重和血糖水平,所述小鼠在第0和6天(箭头)接受3mg/kg的指定IgG(BsAb20)的腹膜内注射。N=9。

[0076] 图15C描绘了在第14天使用15B中所用的相同小鼠和抗体的葡萄糖耐受性试验的结果。

[0077] 图15D描绘了在第17天在15B-C所示的动物中的肝甘油三酯和血清标志物的量。

[0078] 图15E描绘了单次腹膜内注射10mg/kg的指定IgG(BsAb17)以后5天DIO小鼠(N=12)在高胰岛素-正常血糖钳过程中测得的全身葡萄糖利用。水平轴代表血清胰岛素水平。箭头指示从基线至胰岛素刺激的状态的变化方向。相对于对照, $p < 0.05$ (*), < 0.005 (**), < 0.0001 (***)。

[0079] 图15F描绘了单次腹膜内注射10mg/kg的指定IgG(BsAb17)以后5天DIO小鼠(N=12)在高胰岛素-正常血糖钳过程中测得的内源性葡萄糖生产。水平轴代表血清胰岛素水平。箭头指示从基线至胰岛素刺激的状态的变化方向。相对于对照, $p < 0.05$ (*), < 0.005 (**), < 0.0001 (***)。

[0080] 图15G描绘了单次腹膜内注射10mg/kg的指定IgG(BsAb17)以后5天DIO小鼠(N=12)在高胰岛素-正常血糖钳过程中测得的胰岛素刺激的组织葡萄糖摄取。相对于对照, $p < 0.05$ (*), < 0.005 (**), < 0.0001 (***)。

[0081] 图16A显示了小鼠KLB蛋白的N-端氨基酸序列(SEQ ID NO:165),并显示了KO小鼠中由K1b等位基因编码的对应氨基酸序列(SEQ ID NO:166)。K1b基因中的错义突变导致KO等位基因中的第二个氨基酸以后的移码,如用红色字母显示的。

[0082] 图16B显示了野生型(+/+)和KLB敲除的(-/-)小鼠的附睾白脂肪组织中的KLB蛋白表达。

[0083] 图16C表明,KLB对于影响葡萄糖代谢的BsAb20而言是重要的。在接受3mpk的BsAb20或对照IgG的四次每周注射的DIO小鼠中的葡萄糖耐受性试验(GTT)。在第23天(最后一次注射以后3天)进行GTT。在GTT之前,小鼠接受HFD持续20周。* $p < 0.05$ 。

[0084] 图16D描绘了腹膜内注射50mg/kg的抗-KLB/抗-FGFR1双特异性抗体或R1MAb1或媒介物以后第7天DIO小鼠中的血清参数。N=6。

[0085] 图17描绘了腹膜内注射50mg/kg的BsAb17以后第7天DIO小鼠的血清中的FGF23和无机磷的量。N=6。*** $p < 0.0005$ 。

[0086] 图18A描绘了在钳实验过程中动脉血葡萄糖旅行的量。DIO小鼠在钳实验之前5天接受10mg/kg的BsAb17或对照IgG。

- [0087] 图18B描绘了在钳实验当天的体重。
- [0088] 图18C描绘了在钳实验过程中的葡萄糖输注速率。相对于对照, $p < 0.05$ (*), < 0.001 (**)。
- [0089] 图19A描绘了在21-22°C在指示的时间接受10mg/kg IgG的单次腹膜内注射的DIO小鼠的能量消耗(EE)(左)和呼吸商(RQ)(右)。N=7。
- [0090] 图19B描绘了在指示的时间接受10mg/kg IgG的单次腹膜内注射的瘦小鼠的EE(顶)和RQ(底)。将小鼠维持在21-22°C,然后在IgG注射后6天将笼温度转换至中性温度(29-30°C)。N=6~7。
- [0091] 图19C描绘了在单次腹膜内注射10mg/kg的指定IgG以后40小时DIO小鼠中的组织氟脱氧葡萄糖(FDG)的摄取。N=8。在测量FDG-摄取之前,将小鼠禁食过夜。
- [0092] 图19D描绘了单次腹膜内注射(10mg/kg的BsAb17或对照IgG)和渗透泵(CL316,243(0.75nmol/h)或媒介物)的外科植入以后第7天收获的ingWAT的蛋白质印迹分析。
- [0093] 图19E描绘了用30nM的指示的蛋白处理48小时的原代人皮下脂肪细胞中的Ucp1 mRNA的表达。N=3。
- [0094] 图19F描绘了接受10mg/kg的BsAb17或对照IgG的DIO小鼠的深部体温。N=7~8。
- [0095] 图19G描绘了接受单次10mg/kg IgG和2mg/kg/天的FGF21(每天2次)或对照PBS持续5天的DIO小鼠的iBAT中的基因表达谱。列出了在BsAb17和对照之间、或在FGF21和对照之间显著不同的所有基因。
- [0096] 图19H描绘了在第0天接受10mg/kg的抗-KLB/抗-FGFR1双特异性抗体或对照IgG的单次腹膜内注射和渗透泵(0.5nmol/h的CL-316,243或媒介物)的外科植入的瘦小鼠的EE(左)和RQ(右)。显示了在指定的24h时段中的平均值。
- [0097] 图20A描绘了在图19A中描述的DIO小鼠的 VO_2 (顶)、 VCO_2 (中间)的量和总活性计数。通过在#指示的时间测量的体重值,将 VO_2 和 VCO_2 值标准化。DIO小鼠接受10mg/kg的BsAb17或对照IgG。
- [0098] 图20B描绘了在图19B中描述的DIO小鼠的 VO_2 (顶)、 VCO_2 (中间)的量和总活性计数。通过在#指示的时间测量的体重值,将 VO_2 和 VCO_2 值标准化。DIO小鼠接受10mg/kg的BsAb17或对照IgG。
- [0099] 图21A描绘了间接量热法中的平均EE值。在图下面显示了平均增加的量值。DIO 21°C:在图19A所示的实验中,IgG注射以后第3天至第6天EE的平均值。瘦21°C:在图19B所示的实验中,IgG注射以后第3天至第6天EE的平均值。转换至30°C以后的瘦:在图19B所示的实验中,IgG注射以后第6天至第9天(即,温度转换以后3天)EE的平均值。DIO 30°C:在中性温度适应的DIO小鼠中,IgG注射以后第3天至第6天的EE的平均值。
- [0100] 图21B描绘了DIO小鼠在中性温度(thermoneutrality)时EE的变化。在10mg/kg的BsAb17或对照IgG的单次腹膜内注射(箭头)之前,DIO小鼠适应中性温度2周。N=3~4。
- [0101] 图21C描绘了渗透泵的外科植入和药物注射以后,在第3天至第5天,在正常实验室温度(21°C)的DIO小鼠中的平均EE和RQ。在第0天,小鼠接受10mg/kg的BsAb17或对照IgG的腹膜内注射。FGF21组也在第0天接受2mg/kg FGF21腹膜内推注注射。每只小鼠还在第0天皮下植入渗透泵以注入60 μ g/天的FGF21或PBS对照。N=8~9。*** $p < 0.005$ 。
- [0102] 图22描绘了图19F中所示的数据,其重新绘制以显示研究期间接受10mg/kg的

BsAb17或对照IgG的DIO小鼠之间深部 (core) 体温的拟合差异。黑色线是估计的差异,蓝色线是所述差异的95%逐点置信区间。在第13天 (箭头) 施用IgG。N=7~8。

[0103] 图23描绘了在附睾脂肪、腹股沟脂肪和肩胛间棕色脂肪和胰腺中FGF21和BsAb20诱导的达到类似程度的ERK和MEK磷酸化。在给瘦C57BL/6小鼠腹膜内注射10mg/kg (BsAb20) 或1mg/kg (FGF21) 以后1h (肝、胰腺和附睾白色脂肪组织 (eWAT)) 或2h (iBAT或ingWAT), 收获组织。总ERK和MEK充当负载对照。

[0104] 图24A描绘了接受指示剂量 (mg/kg) 的BsAb17的单次腹膜内注射的DIO小鼠 (N=6) 中的体重变化和血清HMW脂连蛋白水平。

[0105] 图24B描绘了接受指示剂量 (mg/kg) 的BsAb17的单次静脉内注射的食蟹猴 (N=3) 中的体重变化和血清HMW脂连蛋白水平。

[0106] 图24C描绘了接受10mg/kg (箭头) 的指定IgG (BsAb17) 的单次腹膜内注射的DIO小鼠 (左:野生型,和右:adipoq KO) 的EE。N=5~6。

[0107] 图24D描绘了接受10mg/kg的指定IgG (BsAb17) 的单次腹膜内注射的野生型 (+/+) 和adipoq KO (-/-) DIO小鼠中的各种代谢参数。N=6。AUC: 在GTT或ITT (T=0~2h) 中的曲线下面积。相对于对照, $p < 0.1$ (#), < 0.05 (*), < 0.005 (**)。

[0108] 图25描绘了使用qPCR从图19G所述的小鼠制备的总RNA。

[0109] 图26描绘了小鼠组织中通过BsAb17实现的ERK磷酸化水平。在给瘦C57BL/6小鼠腹膜内注射10mg/kg的BsAb17或对照IgG以后1h收获组织,并使用对磷酸化的ERK特异性的抗体进行免疫组织化学。为每组显示了来自2只动物的代表性图像。(1) 胰腺, (2) 含有上交叉核 (箭头) 的冠向脑切片, (3) 含有最后区 (染色的细胞的三角形集合) 和中央管 (箭头) 的冠向脑切片, 和 (4) 含有正中隆起 (箭头) 的冠向脑切片。应当指出, BsAb17诱导的信号在胰腺腺泡细胞中是显而易见的,但是在检查的任何脑切片中不是这样。

[0110] 图27描绘了BsAb20对HFD诱导的肝细胞增殖的标准化。用BsAb20 (1或3mg/kg/周) 或对照IgG (3mg/kg/周) 治疗8周的DIO小鼠或对照瘦C57BL/6小鼠中的肝BrdU掺入。*相对于IgG-治疗的DIO小鼠 (N=5~8), $p < 0.05$ 。

[0111] 图28A是图28B中所示的实验的示意图。如指示的, DIO小鼠接受BsAb20 (1或3mg/kg/周) 或对照IgG (1mg/kg/周) 6周。对照瘦C57BL/6小鼠没有接受治疗。

[0112] 图28B描绘了BsAb20治疗以后的骨表型。将股骨和胫骨解剖并进行 μ CT分析 (N=7~8)。应当指出, 在小梁骨和骨皮质的不同骨参数 (可能除了骨皮质厚度以外) 中没有观察到负面效应, 这表明使用3mg/kg/周BsAb20治疗的下降趋势, 尽管没有达到统计显著性。由于已经报道在限制卡路里的小鼠中骨皮质厚度的减小 (对小梁骨密度没有影响) (11), 观察到的作用可能与重量减轻有关。相对于用对照IgG治疗的DIO小鼠, $p < 0.001$ (***) , < 0.01 (**), < 0.05 (*), < 0.1 (#), < 0.2 (\$)。N=7~8。

[0113] 图29描绘了BsAb17治疗以后小鼠中的皮质酮水平。在通过断头术安乐死以后, 在授时因子 (Zeitgeber) 时间 (ZT) = 3测量血清皮质酮水平。对照 (CTRL) 瘦小鼠不接受治疗。在安乐死 (ZT=0) 之前3小时将1mg/kg的脂多糖 (LPS) 腹膜内地注射进瘦小鼠中作为阳性对照 (12)。如指示的, 在安乐死之前5天, 将5或25mg/kg的IgG腹膜内地注射进DIO小鼠中。在没有LPS组的情况下进行指定的统计分析。N=12。

[0114] 图30显示了具有抗-FGFR1和抗-KLB臂的各种不同双特异性抗体对表达FGFR1c或

FGFR1c和KLB的细胞的结合。

[0115] 图31描绘了通过ELISA确定的YW182.5和YW182.5衍生物对FGFR1蛋白的结合。

具体实施方式

[0116] 为了清楚起见且不作为限制,本文公开的主题的详细描述分成以下子部分:

[0117] I. 定义;

[0118] II. 抗体;

[0119] III. 使用方法;

[0120] IV. 药物制剂;和

[0121] V. 制品。

[0122] I. 定义

[0123] 为了本文的目的的“受体人框架”是包含如下文定义的源自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含其相同氨基酸序列,或它可以含有氨基酸序列变化。在某些实施方案中,氨基酸变化的数量为10或更少、9或更少、8或更少、7或更少、6或更少、5或更少、4或更少、3或更少或2或更少。在某些实施方案中,VL受体人框架与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。

[0124] “亲和力”表示分子(例如,抗体)的单个结合位点和它的结合配偶体(例如,抗原)之间的非共价相互作用的总和的强度。除非另外指出,否则本文中使用的“结合亲和力”表示反映结合对(例如,抗体和抗原)的成员之间的1:1相互作用的固有结合亲和力。分子X对它的配偶体Y的亲和力通常可以由解离常数(K_d)表示。通过本领域已知的常见方法(包括本文描述的那些),可以测量亲和力。在下面描述了用于测量结合亲和力的具体举例性和示例性实施方案。

[0125] “亲和力成熟的”抗体表示,与不具有这种改变的亲本抗体相比,在一个或多个高变区(HVR)中具有一个或多个改变的抗体,这种改变导致抗体对抗原的亲和力的改善。

[0126] 除非另外指出,否则本文中使用的“Klotho- β ”、“KLB”和“ β -Klotho”表示来自任何脊椎动物来源的任何天然 β -Klotho,所述脊椎动物来源包括哺乳动物诸如灵长类动物(例如,人类)和啮齿类动物(例如,小鼠和大鼠)。该术语包括“全长的”、未加工的KLB以及从细胞中的加工产生的KLB的任何形式。该术语也包括天然存在的KLB变体,例如,剪接变体或等位基因变体。本公开内容的抗体靶向的人KLB氨基酸序列(不包括信号序列)的一个非限制性例子如下:

FSGDGRAIWSKNPNFTPVNESQLFLYDTFPKNFFWIGGTGALQVEGSWKKDG
KGPSIWDHFIHHLKKNVSSTNGSSDSYIFLEKDLSALDFIGVSFYQFSISWPRLLFP
DGIVTVANAKGLQYYSTLLDALVLRNIEPIVTLYHWDLPLALQEKYGGWKND
TIIDIFNDYATYCFQMFGDRVKYWITIHNPYLVAWHGYGTGMHAPGEKGNLA
AVYTVGHNLKAHASKVWHNYNTHFRPHQKGWLSITLGSWIEPNRSENTMDI
FKCQQSMVSVLGWFANPIHGDGDYPEGMRKKLFSVLPFSEAEKHEMRGTAD
FFAFSFGPNNFKPLNTMAKMGQNVSLNLRALNWIKLEYNNPRILIAENGWFT
DSRVKTEDTTAIYMMKNFLSQVLQAIRLDEIRVFGYTAWSLLDGFEWQDAYT
IRRGLFYVDFNSKQKERKPKSSAHYYKQIIRENGFSLKESTPDVQGGQFPCDFS
WGVTESVLKPESVASSPQFSDPHLYVWNATGNRLLHRVEGVRLKTRPAQCTD
[0127] FVNIKKQLEMLARMKVTHYRFALDWASVLPSTGNLSAVNRQALRYRQCVVSE
GLKLGISAMVTLYYPHTAHLGLPEPLLHADGWLNPSTAEAFQAYAGLCFQEL
GDLVKLWITINEPNRLSDIYNRSGNDTYGAAHLLVAHALAWRLYDRQFRPS
QRGAVSLSLHADWAEPANPYADSHWRAAERFLQFEIAWFAEPLFKTGDPYA
AMREYIASKHRRGLSSSALPRLTEAERRLLKGTVDFCALNHFTTRFVMHEQLA
GSRYDSDRDIQFLQDITRLSSPTRLAVIPWGVVRKLLRWVRRNYGDMDIYITAS
GIDDQALEDDRLRKYYLGKYLQEVKAYLIDKVRIKGYAFKLAEEKSKPRF
GFFTSDFKAKSSIQFYNKVISSRGFPFENSSSRCSQTQENTECTVCLFLVQKKPL
IFLGCCFFSTLVLLLSIAIFQRQKRRKFWKAKNLQHIPLKKGKRVVS (SEQ ID
NO: 145)。

[0128] 在某些实施方案中, KLB蛋白可以包括具有氨基酸序列

MKPGCAAGSPGNEWIFFSTDEITTRYRNTMSNGGLQRSVILSALILLRAVTG
[0129] (SEQ ID NO: 157)

的N-端信号序列。

[0130] 术语“KLB的C-端结构域”表示KLB的羧基端糖苷酶-样结构域。例如,在SEQ ID NO: 145中所示的示例性KLB蛋白的C-端结构域包含以下氨基酸序列:

FPCDFSWGVTESVLKPESVASSPQFSDPHLYVWNATGNRLLHRVEGVRLKTR
PAQCTDFVNIKKQLEMLARMKVTHYRFALDWASVLPTGNLSAVNRQALRY
RCVVSEGLKLGISAMVTLYYPHTAHLGLPEPLHADGWLNPNSTAEAFQAYAG
LCFQELGDLVKLWITINEPNRLSDIYNRSGNDTYGAAHLLVAHALAWRLYD
[0131] RQFRPSQRGAVSLSLHADWAEPANPYADSHWRAAERFLQFEIAWFAEPLFKT
GDYPAAMREYIASKHRRGLSSSALPRLTEAERRLLKGTVDFCALNHFTTRFV
MHEQLAGSRYDSDRDIQFLQDITRLSSPTRLAVIPWGVRKLLRWVRRNYGDM
DIYTASGIDDQALEDDRLRKYYLGKYLQEVKAYLIDKVKRIKGYAFKLAEE
KSKPRFGFFTSDFKAKSSIQFYNKVISSRGFPFENSSSR (SEQ ID NO: 155)。

[0132] 术语“抗-KLB抗体”和“结合KLB的抗体”表示这样的抗体：其能够以足够的亲和力结合KLB，使得所述抗体可用作靶向KLB的诊断剂和/或治疗剂。在一个实施方案中，如例如通过放射免疫测定(RIA)所测得的，抗-KLB抗体与无关的、非-KLB蛋白的结合的程度小于所述抗体与KLB的结合的约10%。在某些实施方案中，结合KLB的抗体具有 $\leq 1\mu\text{M}$ 、 $\leq 100\text{nM}$ 、 $\leq 10\text{nM}$ 、 $\leq 1\text{nM}$ 、 $\leq 0.1\text{nM}$ 、 $\leq 0.01\text{nM}$ 或 $\leq 0.001\text{nM}$ (例如， 10^{-8}M 或更低，例如， 10^{-8}M 至 10^{-13}M ，例如， 10^{-9}M 至 10^{-13}M)的解离常数(K_d)。在某些实施方案中，抗-KLB抗体结合在来自不同物种的KLB之间保守的KLB的表位。在某些实施方案中，抗-KLB抗体结合在KLB上的表位，所述表位是在蛋白的C-端部分中。

[0133] 除非另外指出，否则本文中使用的术语“成纤维细胞生长因子受体1”或“FGFR1”表示来自任何脊椎动物来源的任何天然FGFR1，所述脊椎动物来源包括哺乳动物诸如灵长类动物(例如，人类)和啮齿类动物(例如，小鼠和大鼠)。该术语包括“全长的”、未加工的FGFR1以及从细胞中的加工产生的FGFR1的任何形式。该术语也包括天然存在的FGFR1变体，例如，剪接变体或等位基因变体，包括FGFR1c。人FGFR1c氨基酸的一个非限制性例子显示在下面：

MWSWKCLLFWAVLVTATLCTARPSPTLPEQAQPWGAPVEVESFLVHP
 GDLLQLRCRLRDDVQSINWLRDGVQLAESNRTRITGEEVEVQDSVPADSGLY
 ACVTSSPSGSDTTYFSVNVSDALPSEDDDDDDSSSEEKETDNTKPNPVAPY
 WTSPEKMEKKLHAVPAAKTVKFKCPSSGTPNPTLRWLKNGKEFKPDHRIGGY
 KVRyatWSIIMDSVVP SDKGNyTCIVENEYGSINHTYQLDVVERSPHRPILQA
 GLPANKTVALGSNVEFMCKVYSDPQPHIQWLKHIEVNGSKIGPDNLpyVQILK
 TAGVNTTDKEMEVLHLRNVSFEDAGEYTCLAGNSIGLSHHSawLTVLEALEE
 RPAVMTSPLYLEIIIYCTGAFLISCMVGSVIVYKMKSGTKKSDFHsQMAVHKL
 [0134] AKSIPLRRQVTVSADSSASMNSGVLLVRPSRLSSSGTPMLAGVSEYELPEDPR
 WELPRDRLVLGKPLGEGCFGQVVLAEaIGLDKDKPNRVTkVAVKMLKSDAT
 EKDLSDLISEMEMMKMIGKHKNINLLGACTQDGPLYVIVEYASKGNLREYLQ
 ARRPPGLEyCYNPSHNPEEQlSSKDLVSCAYQVARGMEYLASKKCIHRDLAA
 RNVLVTEDNVMKIADfGLARDIHHIDYyKkTTNGRLPVKwMAPEALFDRIYT
 HQSDVWSFGVLLWEIFTLGGSPYGPVVEELFKLLKEGHRMDKPSNCTNELY
 MMRDCWHA VPSQRPTFKQLVEDLDRIVALTSNQEYLDLSMPLDQYSPSFPD
 TRSSTCSSGEDSVFSHEPLPEEPCLPRHPAQLANGG LKRR (SEQ ID NO: 146).

[0135] 术语“抗-FGFR1c抗体”表示这样的抗体：其能够以足够的亲和力结合FGFR1c，使得所述抗体可用作靶向FGFR1c的诊断剂和/或治疗剂。在一个实施方案中，如例如通过放射免疫测定(RIA)所测得的，抗-FGFR1c抗体与无关的、非-FGFR1c蛋白的结合的程度小于所述抗体与FGFR1c的结合的约10%。在某些实施方案中，结合FGFR1c的抗体具有 $\leq 1\text{M}$ 、 $\leq 100\text{mM}$ 、 $\leq 10\text{mM}$ 、 $\leq 1\text{mM}$ 、 $\leq 100\mu\text{M}$ 、 $\leq 10\mu\text{M}$ 、 $\leq 1\mu\text{M}$ 、 $\leq 100\text{nM}$ 、 $\leq 10\text{nM}$ 、 $\leq 1\text{nM}$ 、 $\leq 0.1\text{nM}$ 、 $\leq 0.01\text{nM}$ 或 $\leq 0.001\text{nM}$ 的解离常数(K_d)。在某些实施方案中，本文中公开的抗体结合FGFR1c的 K_d 可以是 10^{-3}M 或更低，或 10^{-8}M 或更低，例如， 10^{-8}M 至 10^{-13}M ，例如， 10^{-9}M 至 10^{-13}M 。在某些实施方案中，抗-FGFR1c抗体结合在来自不同物种的FGFR1c之间保守的FGFR1c的表位。

[0136] 本文中的术语“抗体”以最宽的含义使用，并且包括各种抗体结构，包括、但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如，双特异性抗体)和抗体片段，只要它们表现出期望的抗原结合活性。

[0137] “抗体片段”表示除了完整抗体以外的分子，所述分子包含完整抗体的一部分，所述部分结合所述完整抗体所结合的抗原。抗体片段的例子包括但不限于：Fv、Fab、Fab’、Fab’-SH、F(ab’)₂；双体(diabodies)；直链抗体；单链抗体分子(例如，scFv)；和由多个抗体片段形成的多特异性抗体。

[0138] 与参比抗体“竞争结合的抗体”表示在竞争测定中使参比抗体与它的抗原的结合阻断50%或更多的抗体，且相反，所述参比抗体在竞争测定中使所述抗体与它的抗原的结合阻断50%或更多。一个示例性的竞争测定描述在“Antibodies,” Harlow和Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY)。

[0139] 术语“嵌合的”抗体表示这样的抗体，其中重链和/或轻链的一部分源自特定来源

或物种,同时重链和/或轻链的剩余部分源自不同的来源或物种。

[0140] 抗体的“类型”表示其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型: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。对应于不同类型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 。

[0141] 本文中使用的术语“细胞毒性剂”表示,抑制或阻止细胞功能和/或造成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);化学治疗剂或药物(例如,甲氨蝶呤、阿霉素、长春花生物碱(长春新碱、长春碱、依托泊苷)、多柔比星、美法仑、丝裂霉素C、苯丁酸氮芥、柔红霉素或其它嵌入剂);生长抑制剂;酶及其片段诸如溶核酶;抗生素;毒素诸如小分子毒素或细菌、真菌、植物或动物起源的酶活性毒素,包括其片段和/或变体;和下面公开的各种抗肿瘤剂或抗癌剂。

[0142] “效应子功能”表示可归因于抗体的Fc区的那些生物活性,其随抗体同种型改变。抗体效应子功能的例子包括:C1q结合和补体依赖性的细胞毒性(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-细胞活化。

[0143] 试剂(例如,药物制剂)的“有效量”表示在必要的剂量和持续必要的时间段,有效地实现期望的治疗或预防结果的量。例如,且不作为限制,“有效量”可以表示本文中公开的抗体的量,其能够减轻、最小化和/或阻止疾病和/或病症的症状,延长存活和/或延长疾病和/或病症的复发之前的阶段。

[0144] 术语“Fc区”在本文中用于定义免疫球蛋白重链的C-端区域,该区域含有恒定区的至少一部分。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。但是,Fc区的C-端赖氨酸(Lys447)可以存在或不存在。除非在本文中另外指出,在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,如在Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD,1991中所述。

[0145] “框架”或“FR”表示除了高变区(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序列通常以下顺序出现在VH(或VL)中:

[0146] FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4。

[0147] 术语“全长抗体”、“完整抗体”和“完整的抗体”在本文中互换地用于表示这样的抗体:其具有与天然抗体结构基本上类似的结构或具有含有如本文中定义的Fc区的重链。

[0148] 术语“宿主细胞”、“宿主细胞系”、和“宿主细胞培养”在本文中互换使用,表示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。针对最初转化的细胞筛选或选择的具有相同功能或生物活性的突变体后代被包括在本文中。

[0149] “人抗体”是这样的抗体:其氨基酸序列对应于由人或人细胞产生的抗体或源自利

用人抗体组库或其它人抗体编码序列的非人来源的抗体的氨基酸序列。该人抗体的定义特别排除了包含非人抗原结合残基的人源化抗体。

[0150] “人共有框架”是代表在人免疫球蛋白VL或VH框架序列的选择中最常出现的氨基酸残基的框架。通常,从可变结构域序列的亚组选择人免疫球蛋白VL或VH序列。通常,序列的亚组是如Kabat等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第五版, 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等人(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等人(出处同上)中的亚组III。

[0151] “人源化的”抗体表示包含来自非人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,人源化抗体将包含基本上全部的至少一个和通常两个可变结构域,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源自人抗体的抗体恒定区的至少一部分。抗体(例如,非人抗体)的“人源化形式”表示已经经历人源化的抗体。

[0152] 本文中使用的术语“高变区”或“HVR”表示抗体可变结构域的在序列上高变(“互补性决定区”或“CDR”)和/或形成在结构上确定的环(“高变环”)和/或含有与抗原接触残基(“抗原接触点”)的每个区域。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等人(出处同上)编号。通常,抗体包含六个HVR;三个在VH中(H1、H2、H3),并且三个在VL(L1、L2、L3)中。本文中示例性的HVR包括:

[0153] (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));

[0154] (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等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991));

[0155] (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等人, *J. Mol. Biol.* 262:732-745 (1996));和

[0156] (d) (a)、(b)和/或(c)的组合,其包括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)。

[0157] 在某些实施方案中,HVR残基包含在图3A或图3B中或在说明书别处鉴别出的那些。

[0158] “免疫缀合物”表示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。

[0159] 在本文中互换使用的“个体”或“受试者”是哺乳动物。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诸如猴),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。

[0160] “分离的”抗体是已经与它的天然环境的组分分离的抗体。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)来确定。关于评价抗体纯度的方法的综述,参见,例如,Flatman等人, *J. Chromatogr. B* 848:79-87 (2007)。

[0161] “分离的”核酸表示已经与它的天然环境的组分分离的核酸分子。分离的核酸包括

通常含有核酸分子的细胞中包含的核酸分子,但是所述核酸分子存在于染色体外或在不同于其天然染色体位置的染色体位置。

[0162] “分离的编码抗体(包括特异性抗体,例如,抗-KLB抗体)的核酸”表示编码抗体重链和轻链(或其片段)的一个或多个核酸分子,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。

[0163] 本文中使用的术语“单克隆抗体”表示得自基本上同源的抗体的群体的抗体,即,构成所述群体的各个抗体是相同的和/或结合相同表位,除了可能的变体抗体(例如,含有天然存在的突变或在单克隆抗体制品的生产过程中产生)以外,这样的变体通常以微量存在。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,单克隆抗体制品的每种单克隆抗体针对抗原上的单个决定簇。因而,修饰语“单克隆”指示所述抗体得自基本上同源的抗体群体的特征,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,要根据本文公开的主题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、和使用包含人免疫球蛋白基因座的全部或部分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。

[0164] “裸抗体”表示没有与异源部分(例如,细胞毒性的部分)或放射性标记缀合的抗体。裸抗体可以存在于药物制剂中。

[0165] “天然抗体”表示具有不同结构的天然存在的免疫球蛋白分子。例如,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),也称为可变轻结构域或轻链可变结构域,接着是恒定轻(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。

[0166] 本文中使用的术语“包装说明书”表示治疗性产品的商业包装中通常包括的指令,其含有关于这样的治疗性产品的使用的适应症、用法、剂量、施用、联合治疗、禁忌和/或告诫的信息。

[0167] 相对于参考多肽序列而言的“氨基酸序列同一性百分比(%)”被定义为,比对所述序列,如果必要的话引入间隙以实现最大序列同一性百分比,且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的目的的比对可以以本领域技术中的多种方式实现,例如,使用公众可得到的计算机软件诸如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,包括实现在要对比的序列的全长上的最大对齐所需的任何算法。但是,为了本文的目的,使用序列对比计算机程序ALIGN-2产生%氨基酸序列同一性值。ALIGN-2序列对比计算机程序由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。应该编译ALIGN-2程序以在UNIX操作系统(包括数字UNIX V4.0D)上使用。所有序列对比参数由ALIGN-2程序设定并且不改变。

[0168] 在采用ALIGN-2进行氨基酸序列对比的情况下,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)：

[0169] $100 \times \text{分数} X/Y$

[0170] 其中X是通过序列比对程序ALIGN-2(在该程序的A和B的比对中)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。

[0171] 术语“药物制剂”表示这样的制品:其呈使得包含在其中的活性成分的生物活性有效的形式,并且所述制剂不含有对所述制剂要施用的受试者有不可接受的毒性的额外组分。

[0172] 本文中使用的“药学上可接受的载体”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。

[0173] 本文中使用的“治疗(treatment)”(和其语法变体诸如“治疗(treat)”或“治疗(treating)”)表示试图改变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,以及减轻或改善的预后。在某些实施方案中,本公开内容的抗体可以用于延迟疾病的发展或减缓疾病的进展。

[0174] 术语“可变区”或“可变结构域”指抗体重链或轻链的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(分别为VH和VL)通常具有类似的结构,其中每个结构域包含四个保守的框架区(FR)和三个高变区(HVR)(参见,例如,Kindt等人,Kuby Immunology,第6版,W.H.Freeman&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结构域分离,以分别筛选互补VL或VH结构域的文库。参见,例如,Portolano等人,J.Immunol.150:880-887(1993);Clarkson等人,Nature 352:624-628(1991)。

[0175] 本文中使用的术语“载体”表示能够扩增与其连接的另一核酸的核酸分子。该术语包括作为自我复制的核酸结构的载体以及整合进它已经引入其中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。这样的载体在本文被称为“表达载体”。

[0176] II. 抗体

[0177] 在一个方面,本发明部分地基于双特异性抗体的发现,所述双特异性抗体结合KLB和FGFR1c两者并选择性地活化FGFR1c/KLB受体复合物和诱导从FGF21-样活性预见到的有益代谢变化,包括重量减轻以及葡萄糖和脂类代谢的改善,对肝没有显著影响且没有骨量损失。

[0178] 在某些实施方案中,提供了结合KLB的抗体。本公开内容还提供了抗-FGFR1抗体,例如,抗-FGFR1c抗体。本公开内容还提供了结合KLB和FGFR1两者的双特异性抗体(在本文中被称为抗-KLB/抗-FGFR1双特异性抗体)。在某些实施方案中,本公开内容的抗-KLB/抗-FGFR1双特异性抗体结合KLB和FGFR1c两者。在某些实施方案中,本公开内容的抗体包括不

会阻断FGF配体(例如,FGF19和FGF21)与KLB/FGFR1c复合物的结合和/或相互作用的抗体。

[0179] 在某些实施方案中,本公开内容的抗体对肝(例如,肝功能)没有显著影响。不受限于特定理论,本公开内容的抗体不会导致肝中FGFR1c/KLB受体复合物的活化。在某些实施方案中,与FGF21蛋白对肝中FGFR/KLB受体复合物的调节相比,本公开内容的抗体不会调节肝中FGFR/KLB受体复合物的活性。在某些实施方案中,本公开内容的抗体不会导致FGFR4/KLB复合物的抑制和/或不会导致肝酶(例如,但不限于,ALT、AST、ALP和GLDH)的升高。在某些实施方案中,本公开内容的抗体不会作为肝中FGFR2c/KLB复合物和/或FGFR3c/KLB复合物的激动剂起作用,所述复合物可以导致肝中活化的MAPK信号传递和/或改变的Spry4和Dusp6的表达。在某些实施方案中,与FGF21蛋白对MAPK信号传递的活化相比,本公开内容的抗体不会导致肝中MAPK信号传递的活化。在某些实施方案中,本公开内容的抗体不会作为肝中FGFR4/KLB复合物的激动剂起作用。

[0180] 在某些实施方案中,本公开内容的抗体可以是人源化的。在某些实施方案中,本公开内容的抗体包含受体人框架,例如,人免疫球蛋白框架或人共有框架。

[0181] 在某些实施方案中,本公开内容的抗体可以是单克隆抗体,包括嵌合的、人源化的或人的抗体。在某些实施方案中,本公开内容的抗体可以是抗体片段,例如,Fv、Fab、Fab'、scFv、双体或F(ab')₂片段。在某些实施方案中,所述抗体是全长抗体,例如,完整的IgG1抗体或如本文中定义的其他抗体种类或同种型。在某些实施方案中,本公开内容的抗体可以包含下面详述的任意特征(单独地或组合地,如在部分1-7中所述)。

[0182] 本公开内容的抗体可用于,例如,代谢病症的诊断或治疗。代谢病症的非限制性例子包括多囊卵巢综合征(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)、高脂血症、高血压、II型糖尿病、非II型糖尿病、I型糖尿病、潜伏的自身免疫性糖尿病(LAD)、青年成熟型糖尿病(MODY)和老龄化及有关的疾病诸如阿尔茨海默氏病、帕金森病和ALS。

[0183] A. 示例性的抗-KLB抗体

[0184] 在一个方面,本公开内容提供了分离的结合KLB蛋白的抗体。在某些实施方案中,本公开内容的抗-KLB抗体结合KLB的C-端结构域。在某些实施方案中,本公开内容的抗-KLB抗体结合包含氨基酸序列SSPTRLAVIPWGVKLLRWVRRNYGDMDIYITAS (SEQ ID NO:142)的KLB片段。在某些实施方案中,所述抗体与本文描述的抗-KLB抗体(例如,8C5)结合相同的表位。

[0185] 在某些实施方案中,本公开内容的抗-KLB抗体包含至少1、2、3、4、5或6个选自以下的HVR:(a)HVR-H1,其包含SEQ ID NO:1-15(例如,12或15)中的任一个的氨基酸序列;(b)HVR-H2,其包含SEQ ID NO:16-31(例如,28或31)中的任一个的氨基酸序列;(c)HVR-H3,其包含SEQ ID NO:32-47(例如,44或47)中的任一个的氨基酸序列;(d)HVR-L1,其包含SEQ ID NO:48-62(例如,49或62)中的任一个的氨基酸序列;(e)HVR-L2,其包含SEQ ID NO:63-78(例如,75或78)中的任一个的氨基酸序列;和(f)HVR-L3,其包含SEQ ID NO:79-93(例如,90或93)中的任一个的氨基酸序列。

[0186] 在某些实施方案中,本公开内容提供了一种抗-KLB抗体,其包含至少1、2、3、4、5或6个选自以下的HVR:(a)包含SEQ ID NO:12的HVR-H1;(b)包含SEQ ID NO:28的HVR-H2;(c)包含SEQ ID NO:44的HVR-H3;(d)包含SEQ ID NO:49的HVR-L1;(e)包含SEQ ID NO:75的HVR-L2;和(f)包含SEQ ID NO:90的HVR-L3。在某些实施方案中,本公开内容提供了一种抗-

KLB抗体,其包含至少1、2、3、4、5或6个选自以下的HVR:(a)包含SEQ ID NO:15的HVR-H1;(b)包含SEQ ID NO 31的HVR-H2;(c)包含SEQ ID NO:47的HVR-H3;(d)包含SEQ ID NO 62的HVR-L1;(e)包含SEQ ID NO:78的HVR-L2;和(f)包含SEQ ID NO:93的HVR-L3。

[0187] 本公开内容还提供了一种抗-KLB抗体,其包含与SEQ ID NO:128的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的重链可变结构域(VH)序列。在某些实施方案中,具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的VH序列含有相对于参照序列的置换(例如,如下面公开的保守置换)、插入或缺失,但是包含该序列的抗-KLB抗体保留结合KLB的能力。在某些实施方案中,已经在SEQ ID NO:128中置换、插入和/或缺失了共计1-10个氨基酸。在某些实施方案中,置换、插入或缺失发生在HVR以外的区域(即,在FR中)。可替换地或额外地,抗-KLB抗体包含SEQ ID NO:128中的VH序列,包括如下面公开的该序列的翻译后修饰。在某些实施方案中,所述VH包含1、2或3个选自以下的HVR:(a)HVR-H1,其包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列,(b)HVR-H2,其包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列,和(c)HVR-H3,其包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列。

[0188] 在另一个方面,本公开内容提供了一种抗-KLB抗体,其中所述抗体包含与SEQ ID NO:130的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的轻链可变结构域(VL)。在某些实施方案中,具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的VL序列含有相对于参照序列的置换(例如,保守置换)、插入或缺失,但是包含该序列的抗-KLB抗体保留结合KLB的能力。在某些实施方案中,已经在SEQ ID NO:130中置换、插入和/或缺失了共计1-10个氨基酸。在某些实施方案中,置换、插入或缺失发生在HVR以外的区域(即,在FR中)。可替换地或额外地,抗-KLB抗体包含SEQ ID NO:130中的VL序列,包括该序列的翻译后修饰。在某些实施方案中,所述VL包含1、2或3个选自以下的HVR:(a)HVR-L1,其包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列;(b)HVR-L2,其包含SEQ ID NO:78的氨基酸序列;和(c)HVR-L3,其包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列。

[0189] 本公开内容还提供了一种抗-KLB抗体,其中所述抗体包含上面提供的任意实施方案中的VH和上面提供的任意实施方案中的VL。在某些实施方案中,所述抗体包含分别在SEQ ID NO:128和SEQ ID NO:130中的VH和VL序列,包括那些序列的翻译后修饰。

[0190] 在某些实施方案中,抗-KLB抗体结合由氨基酸序列

[0191] SSPTRLAVIPWGVKLLRWVRRNYGDMDIYITAS (SEQ ID NO:142) 组成的KLB片段。

[0192] B. 示例性的抗-FGFR1抗体

[0193] 在一个方面,本公开内容提供了分离的结合FGFR1蛋白的抗体。在某些实施方案中,本公开内容的抗-FGFR1抗体结合FGFR1c。在某些实施方案中,本公开内容提供了一种抗-FGFR1抗体,其包含至少1、2、3、4、5或6个选自以下的HVR:(a)包含SEQ ID NO:136的HVR-H1;(b)包含SEQ ID NO:137的HVR-H2;(c)包含SEQ ID NO:138的HVR-H3;(d)包含SEQ ID NO:139的HVR-L1;(e)包含SEQ ID NO:140的HVR-L2;和(f)包含SEQ ID NO:141的HVR-L3。

[0194] 在某些实施方案中,本公开内容的抗-FGFR1抗体包含与SEQ ID NO:132的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的重链可变结构域(VH)序列。在某些实施方案中,具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的VH序列含有相对于参照序列的置换(例如,保守置

换)、插入或缺失,但是包含该序列的抗-FGFR1抗体保留结合FGFR1的能力。在某些实施方案中,已经在SEQ ID NO:132中置换、插入和/或缺失了共计1-10个氨基酸。在某些实施方案中,置换、插入或缺失发生在HVR以外的区域(即,在FR中)。可替换地或额外地,抗-FGFR1抗体包含SEQ ID NO:132中的VH序列,包括该序列的翻译后修饰。在某些实施方案中,所述VH包含1、2或3个选自以下的HVR:(a)HVR-H1,其包含SEQ ID NO:136的氨基酸序列,(b)HVR-H2,其包含SEQ ID NO:137的氨基酸序列,和(c)HVR-H3,其包含SEQ ID NO:138的氨基酸序列。

[0195] 本公开内容还提供了一种抗-FGFR1抗体,其中所述抗体包含与SEQ ID NO:134的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的轻链可变结构域(VL)。在某些实施方案中,具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的VL序列含有相对于参照序列的置换(例如,保守置换)、插入或缺失,但是包含该序列的抗-FGFR1抗体保留结合FGFR1的能力。在某些实施方案中,已经在SEQ ID NO:134中置换、插入和/或缺失了共计1-10个氨基酸。在某些实施方案中,置换、插入或缺失发生在HVR以外的区域(即,在FR中)。可替换地或额外地,抗-FGFR1抗体包含SEQ ID NO:134中的VL序列,包括该序列的翻译后修饰。在一个特定实施方案中,所述VL包含1、2或3个选自以下的HVR:(a)HVR-L1,其包含SEQ ID NO:139的氨基酸序列;(b)HVR-L2,其包含SEQ ID NO:140的氨基酸序列;和(c)HVR-L3,其包含SEQ ID NO:141的氨基酸序列。

[0196] 在另一个方面,提供了一种抗-FGFR1抗体,其中所述抗体包含上面提供的任意实施方案中的VH和上面提供的任意实施方案中的VL。在某些实施方案中,所述抗-FGFR1抗体包含分别在SEQ ID NO:132和SEQ ID NO:134中的VH和VL序列,包括那些序列的翻译后修饰。

[0197] 在某些实施方案中,本公开内容的FGFR1抗体结合由氨基酸序列KLHAVPAAKTVKFKCP(SEQ ID NO:143)或FKPDHRIGGYKVRY(SEQ ID NO:144)组成的FGFR1c片段。

[0198] C. 示例性的抗-KLB/抗-FGFR1双特异性抗体

[0199] 本公开内容还提供了结合KLB和FGFR1两者的双特异性抗体(即,抗-KLB/抗-FGFR1双特异性抗体)。双特异性抗体具有两种不同的结合特异性,参见,例如,美国专利号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。例如,且不作为限制,本文公开的主题提供了双特异性抗体,其具有一个针对存在于KLB上的第一表位的结合位点(例如,抗原结合位点)和针对存在于FGFR1上的第二表位的第二结合位点。例如,且不作为限制,本公开内容提供了一种抗体,其中一个臂结合KLB且包含本文描述的任何抗-KLB抗体序列且第二臂结合FGFR1且包含本文描述的任何抗-FGFR1抗体序列。在某些实施方案中,本公开内容的抗-KLB/抗-FGFR1双特异性抗体具有一个针对存在于KLB上的第一表位的结合位点和针对存在于FGFR1c上的第二表位的第二结合位点。

[0200] 在某些实施方案中,本文中公开的抗-KLB/抗-FGFR1双特异性抗体表示调节KLB/FGFR1c复合物活性的抗体。例如,双特异性的抗-KLB/抗-FGFR1双特异性抗体可以作为激动剂起作用并活化KLB/FGFR1c复合物。在某些实施方案中,抗-KLB/抗-FGFR1双特异性抗体是

使KLB/FGFR1c复合物的活性增加至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、99%或99.9%的抗体。在某些实施方案中,所述抗-KLB/抗-FGFR1双特异性的可以是导致KLB/FGFR1c复合物的下游靶标(例如,MAPK和/或ERK)的磷酸化的抗体。

[0201] 在某些实施方案中,本文中公开的抗-KLB/抗-FGFR1双特异性抗体表示这样的抗体:其调节KLB/FGFR1c复合物活性且不会阻断天然FGF配体(例如,FGF19和FGF21)与KLB/FGFR1c复合物的相互作用和/或结合。在某些实施方案中,本文中公开的抗-KLB/抗-FGFR1双特异性抗体表示这样的抗体:其在没有KLB存在下不会阻断天然FGF配体的活性和/或天然FGF配体与FGF受体的结合。例如,且不作为限制,本公开内容的抗-KLB/抗-FGFR1双特异性抗体不会阻断天然FGF配体与FGFR1/KLA复合物和/或单独的FGFR1的相互作用。在某些实施方案中,本文中公开的抗-KLB/抗-FGFR1双特异性抗体表示这样的抗体:其在没有FGFR1存在下不会阻断天然FGF配体的活性和/或天然FGF配体与KLB的结合。例如,且不作为限制,本公开内容的抗-KLB/抗-FGFR1双特异性抗体不会阻断天然FGF配体与FGFR4/KLB复合物、FGFR2c/KLB复合物和/或FGFR3c/KLB复合物的相互作用。

[0202] 在某些实施方案中,抗-KLB/抗-FGFR1双特异性抗体(例如,抗-KLB/抗-FGFR1c双特异性抗体)或其抗原结合部分包括重链和轻链区域。在某些实施方案中,所述全长重链包括与SEQ ID NO:129所示的序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,所述全长轻链包括与SEQ ID NO:131所示的序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,所述全长重链包括具有在SEQ ID NO:129中所示的序列的氨基酸。在某些实施方案中,所述全长轻链包括具有在SEQ ID NO:131中所示的序列的氨基酸。

[0203] 在某些实施方案中,抗-KLB/抗-FGFR1双特异性抗体(例如,抗-KLB/抗-FGFR1c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。在某些实施方案中,所述重链可变区包括与SEQ ID NO:128所示的序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,所述轻链可变区包括与SEQ ID NO:130所示的序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,所述重链可变区包括具有SEQ ID NO:128所示的序列的氨基酸。在某些实施方案中,所述轻链可变区包括具有SEQ ID NO:130所示的序列的氨基酸。

[0204] 在某些实施方案中,抗-KLB/抗-FGFR1双特异性抗体包含至少1、2、3、4、5或6个选自以下的HVR:(a) HVR-H1,其包含SEQ ID NO:1-15(例如,12或15)中的任一个的氨基酸序列;(b) HVR-H2,其包含SEQ ID NO:16-31(例如,28或31)中的任一个的氨基酸序列;(c) HVR-H3,其包含SEQ ID NO:32-47(例如,44或47)中的任一个的氨基酸序列;(d) HVR-L1,其包含SEQ ID NO:48-62,例如(49或62)中的任一个的氨基酸序列;(e) HVR-L2,其包含SEQ ID NO:63-78(例如,75或78)中的任一个的氨基酸序列;和(f) HVR-L3,其包含SEQ ID NO:79-93(例如,90或93)中的任一个的氨基酸序列。

[0205] 在某些实施方案中,抗-KLB/抗-FGFR1双特异性抗体(例如,抗-KLB/抗-FGFR1c双特异性抗体)包含至少1、2、3、4、5或6个选自以下的HVR:(a) 包含SEQ ID NO:12的HVR-H1;(b) 包含SEQ ID NO:28的HVR-H2;(c) 包含SEQ ID NO:44的HVR-H3;(d) 包含SEQ ID NO:49的

HVR-L1; (e) 包含SEQ ID NO:75的HVR-L2;和(f) 包含SEQ ID NO:90的HVR-L3。在某些实施方案中,本公开内容提供了一种抗-KLB抗体,其包含至少1、2、3、4、5或6个选自以下的HVR:(a) 包含SEQ ID NO:15的HVR-H1;(b) 包含SEQ ID NO:31的HVR-H2;(c) 包含SEQ ID NO:47的HVR-H3;(d) 包含SEQ ID NO:62的HVR-L1;(e) 包含SEQ ID NO:78的HVR-L2;和(f) 包含SEQ ID NO:93的HVR-L3。

[0206] 在某些实施方案中,抗-KLB/抗-FGFR1双特异性抗体(例如,抗-KLB/抗-FGFR1c双特异性抗体)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。在某些实施方案中,所述重链可变区CDR1结构域包括具有SEQ ID NO:1-15所示序列的氨基酸序列。在某些实施方案中,所述重链可变区CDR2结构域包括具有SEQ ID NO:16-31所示序列的氨基酸序列。在某些实施方案中,所述重链可变区CDR3结构域包括与SEQ ID NO:32-47具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,所述轻链可变区CDR1结构域包括与SEQ ID NO:48-62具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,所述轻链可变区CDR2结构域包括与SEQ ID NO:63-78具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,所述轻链可变区CDR3结构域包括与SEQ ID NO:79-93具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0207] 在某些实施方案中,抗-KLB/抗-FGFR1双特异性抗体(例如,抗-KLB/抗-FGFR1c双特异性抗体)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。在某些实施方案中,所述重链可变区CDR1结构域包括具有SEQ ID NO:1-15所示序列的氨基酸序列。在某些实施方案中,所述重链可变区CDR2结构域包括具有SEQ ID NO:16-31所示序列的氨基酸序列。在某些实施方案中,所述重链可变区CDR3结构域包括具有SEQ ID NO:32-47所示序列的氨基酸序列。在某些实施方案中,所述轻链可变区CDR1结构域包括具有SEQ ID NO:48-62所示序列的氨基酸序列。在某些实施方案中,所述轻链可变区CDR2结构域包括具有SEQ ID NO:63-78所示序列的氨基酸序列。在某些实施方案中,所述轻链可变区CDR3结构域包括具有SEQ ID NO:79-93所示序列的氨基酸序列。

[0208] 在某些实施方案中,抗-KLB/抗-FGFR1双特异性抗体(例如,抗-KLB/抗-FGFR1c双特异性抗体)包括具有SEQ ID NO:15所示序列的重链可变区CDR1;具有SEQ ID NO:31所示序列的重链可变区CDR2;具有SEQ ID NO:47所示序列的重链可变区CDR3;具有SEQ ID NO:62所示序列的轻链可变区CDR1;具有SEQ ID NO:78所示序列的轻链可变区CDR2;和具有SEQ ID NO:93所示序列的轻链可变区CDR3。

[0209] 在某些实施方案中,抗-KLB/抗-FGFR1双特异性抗体包括第一抗体或其抗原结合部分,且包括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结合存在于KLB上的表位,且第二抗体或其抗原结合部分结合存在于FGFR1(例如,FGFR1c)上的表位。例如,且不作为限制,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;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。在某些实施方案中,所述第一抗体或其抗原结合部分的重链可变区包括与SEQ ID NO:128所示的序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,所述第一抗体或其抗原结合部分的轻链可变区包括与SEQ ID NO:130所示的

序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,所述第二抗体或其抗原结合部分的重链可变区包括与SEQ ID NO:132所示的序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,所述第二抗体或其抗原结合部分的轻链可变区包括与SEQ ID NO:134所示的序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0210] 在某些实施方案中,本文中提供了与抗-KLB抗体结合相同表位的抗-KLB/抗-FGFR1双特异性抗体。例如,在某些实施方案中,提供了抗-KLB/抗-FGFR1双特异性抗体,其与包含SEQ ID NO:128的VH序列和SEQ ID NO:130的VL序列的抗-KLB抗体结合相同的表位。在某些实施方案中,提供了抗-KLB/抗-FGFR1双特异性抗体,其结合由氨基酸序列SSPTRLA VIPWGVKLLRWVRRNYGDMDIYITAS (SEQ ID NO:142) 组成的KLB片段。

[0211] 在某些实施方案中,提供了抗-KLB/抗-FGFR1双特异性抗体,其结合KLB片段,所述KLB片段具有与SEQ ID NO:142所示的序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0212] 在某些实施方案中,本文中提供了与抗-KLB抗体结合相同表位的抗-KLB/抗-FGFR1双特异性抗体。例如,在某些实施方案中,提供了抗-KLB/抗-FGFR1双特异性抗体,其与包含SEQ ID NO:129的全长重链序列和SEQ ID NO:131的全长轻链序列的抗-KLB抗体结合相同的表位。

[0213] 在某些实施方案中,本公开内容提供了一种抗-KLB/抗-FGFR1双特异性抗体,其与本文中提供的抗-FGFR1抗体结合相同的表位。例如,在某些实施方案中,提供了抗-KLB/抗-FGFR1双特异性抗体,其与包含SEQ ID NO:132的VH序列和SEQ ID NO:134的VL序列的抗-FGFR1抗体结合相同的表位。在某些实施方案中,提供了抗-KLB/抗-FGFR1双特异性抗体,其结合包含氨基酸序列KLHAVPAAKTVKFKCP (SEQ ID NO:143) 或FKPDHRIGGYKVRY (SEQ ID NO:144) 的FGFR1c片段。

[0214] 在某些实施方案中,本公开内容提供了一种抗-KLB/抗-FGFR1双特异性抗体,其与本文中提供的抗-FGFR1抗体结合相同的表位。例如,在某些实施方案中,提供了抗-KLB/抗-FGFR1双特异性抗体,其与包含SEQ ID NO:133的重链序列和SEQ ID NO:135的轻链序列的抗-FGFR1抗体结合相同的表位。

[0215] 在某些实施方案中,本公开内容的抗-KLB/抗-FGFR1双特异性抗体结合FGFR1c片段,所述片段的氨基酸序列与SEQ ID NO:143所示的序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性。

[0216] 在某些实施方案中,本公开内容的抗-KLB/抗-FGFR1双特异性抗体结合FGFR1c片段,所述片段的氨基酸序列与SEQ ID NO:144所示的序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性。

[0217] 在某些实施方案中,提供了抗-KLB/抗-FGFR1双特异性抗体,其结合KLB片段且结合FGFR1c片段,所述KLB片段的氨基酸序列与SEQ ID NO:142所示的序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性,所述FGFR1c片段的氨基酸序列与SEQ ID NO:143或144所示的序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性。

[0218] 在某些实施方案中,提供了抗-KLB/抗-FGFR1双特异性抗体,其结合KLB片段且结合FGFR1c片段,所述KLB片段具有SEQ ID NO:142所示的氨基酸序列,所述FGFR1c片段具有SEQ ID NO:143或144所示的氨基酸序列。

[0219] 1. 抗体亲和力

[0220] 在某些实施方案中,本公开内容的抗体可以具有 $\leq 1\text{M}$ 、 $\leq 100\text{mM}$ 、 $\leq 10\text{mM}$ 、 $\leq 1\text{mM}$ 、 $\leq 100\mu\text{M}$ 、 $\leq 10\mu\text{M}$ 、 $\leq 1\mu\text{M}$ 、 $\leq 100\text{nM}$ 、 $\leq 10\text{nM}$ 、 $\leq 1\text{nM}$ 、 $\leq 0.1\text{nM}$ 、 $\leq 0.01\text{nM}$ 或 $\leq 0.001\text{nM}$ 的解离常数(K_d)。在某些实施方案中,本公开内容的抗体可以具有约 10^{-3} 或更低、或 10^{-8}M 或更低(例如,从 10^{-8}M 至 10^{-13}M ,例如,从 10^{-9}M 至 10^{-13}M)的 K_d 。

[0221] 在某些实施方案中,抗-KLB/抗-FGFR1双特异性抗体可以包括具有约 10nM 至约 $10\mu\text{M}$ 的 K_d 的抗-FGFR1臂。在某些实施方案中,含有具有低亲和力的FGFR1臂的抗-KLB/抗-FGFR1双特异性抗体可以减小抗-KLB/抗-FGFR1双特异性抗体在没有KLB存在下紧密地结合FGFR1和阻止其它FGF配体(例如,但不限于,FGF1、FGF2、FGF8和FGF23)对FGFR1的结合和/或活化的风险。在某些实施方案中,具有低亲和力的FGFR1臂可以允许较高水平的抗-FGFR1杂质(例如,但不限于,抗-FGFR1半结抗体、非共价抗-FGFR1二聚体、共价抗-FGFR1二聚体和高分子量物质)的存在,而不导致临床上显著的副作用。例如,在某些实施方案中,大约2%高分子量物质和1.5%抗-FGFR1半抗体可以存在于本公开内容的抗-KLB/抗-FGFR1双特异性抗体的制品中,而不导致不利的生物学效应。

[0222] 在某些实施方案中,通过放射性地标记的抗原结合测定(RIA)可以测量 K_d 。在某些实施方案中,可以用目标抗体的Fab形式和它的抗原执行RIA。例如,且不作为限制,如下测量Fab对抗原的溶液结合亲和力:在有未标记的抗原的滴定系列存在下使Fab与最低浓度的(^{125}I)-标记的抗原平衡,然后用抗-Fab抗体包被的平板捕获结合的抗原(参见,例如,Chen等人,J.Mol.Biol.293:865-881(1999))。为了建立测定的条件,将MICROTITER®多孔平板(Thermo Scientific)用在50mM碳酸钠(pH 9.6)中的 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 捕获抗-Fab抗体(Cappel Labs)包被过夜,并随后用在PBS中的2% (w/v) 牛血清白蛋白在室温(大约 23°C)封闭2-5小时。在非吸附平板(Nunc#269620)中,将 100pM 或 26pM [^{125}I]-抗原与目标Fab的系列稀释物混合(例如,与抗-VEGF抗体Fab-12的评估一致,见Presta等人,Cancer Res.57:4593-4599(1997))。然后将目标Fab温育过夜;但是,所述温育可以持续较长时段(例如,约65小时)以确保达到平衡。此后,将混合物转移至捕获平板用于在室温温育(例如,1小时)。然后将溶液除去,并将平板用0.1%聚山梨酯20(TWEEN-20®)在PBS中的溶液洗涤8次。当平板已经干燥时,加入 $150\mu\text{l}/\text{孔}$ 的闪烁剂(MICROSCINT-20™;Packard),并将平板在TOPCOUNT™ γ 计数器(Packard)上计数10分钟。选择给出小于或等于最大结合的20%的每种Fab的浓度用在竞争性结合测定中。

[0223] 在某些实施方案中,使用BIACORE®表面等离子体共振测定可以测量 K_d 。例如,且不作为限制,使用BIACORE®-2000或BIACORE®-3000(Biacore, Inc., Piscataway, NJ)的测定在 25°C 用固定化的抗原CM5芯片以约10个应答单位(RU)进行。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(NHS)活化羧甲基化的葡聚糖生物传感器芯片(CM5, Biacore, Inc.)。将抗原用 10mM 醋酸钠(pH 4.8)稀释至 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ (约 $0.2\mu\text{M}$),随后以 $5\mu\text{l}/\text{分钟}$ 的流速注射以实现偶

联的蛋白的大约10个应答单位(RU)。注射抗原以后,注射1M乙醇胺以封闭未反应的基团。对于动力学测量,将在具有0.05%聚山梨酯20(TWEEN-20™)表面活性剂(PBST)的PBS(PBST)中的Fab的两倍系列稀释物(0.78nM至500nM)在25℃以大约25μL/min的流速注射。使用简单的一对一Langmuir结合模型(BIACORE®评价软件3.2版),通过同时拟合结合和解离传感图(sensorgram),计算缔合速率(k_{on})和解离速率(k_{off})。可以将平衡解离常数(Kd)计算为比率 k_{off}/k_{on} 。参见,例如,Chen等人,J.Mol.Biol.293:865-881(1999)。如果通过以上表面等离子体共振测定确定缔合速率超过 $10^6 M^{-1} s^{-1}$,那么可以使用荧光淬灭技术确定缔合速率,所述荧光淬灭技术在有递增抗原浓度存在下在25℃测量在PBS(pH7.2)中的20nM抗-抗原抗体(Fab形式)的荧光发射强度(激发=295nm;发射=340nm,16nm带通)的增加或减少,所述抗原浓度在光谱仪(诸如配备止流阀(stop-flow)的分光光度计(AvivInstruments)或具有搅拌型比色皿的8000-系列SLM-AMINCO™分光光度计(ThermoSpectronic)中测量。

[0224] 2. 抗体片段

[0225] 在某些实施方案中,本公开内容的抗体是抗体片段。抗体片段包括、但不限于:Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、Fv和scFv片段以及下面描述的其它片段。关于某些抗体片段的综述,参见Hudson等人,Nat.Med.9:129-134(2003)。关于scFv片段的综述,参见,例如,Pluckthün,The Pharmacology of Monoclonal Antibodies,第113卷,Rosenburg和Moore编,(Springer-Verlag,New York),第269-315页(1994);也参见WO 93/16185;和美国专利号5,571,894和5,587,458。关于包含结合补救受体的表位残基且具有增加的体内半衰期的Fab和F(ab')₂片段的讨论,参见美国专利号5,869,046。

[0226] 在某些实施方案中,本公开内容的抗体可以是双体。双体是具有两个抗原结合位点(其可以是二价或双特异性的)的抗体片段。参见,例如,EP 404,097;WO 1993/01161;Hudson等人,Nat.Med.9:129-134(2003);和Hollinger等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448(1993)。三体和四体也描述在Hudson等人,Nat.Med.9:129-134(2003)中。

[0227] 在某些实施方案中,本公开内容的抗体可以是单结构域抗体。单结构域抗体是这样的抗体片段:其包含抗体的重链可变结构域的全部或部分或者轻链可变结构域的全部或部分。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,美国专利号6,248,516B1)。

[0228] 可以通过多种技术制备抗体片段,所述技术包括、但不限于,如本文中所述的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)的生产。

[0229] 3. 嵌合抗体和人源化抗体

[0230] 在某些实施方案中,本公开内容的抗体是嵌合抗体。某些嵌合抗体描述在,例如,美国专利号4,816,567;和Morrison等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,81:6851-6855(1984)中。在某些实施方案中,本公开内容的嵌合抗体包含非人可变区(例如,从小鼠、大鼠、仓鼠、兔或非人灵长类动物诸如猴衍生出的可变区)和人恒定区。在另一个实施例中,嵌合抗体可以是“类别转换的”抗体,其中所述类或亚类已经从亲本抗体的类或亚类改变。嵌合抗体包括其抗原结合片段。

[0231] 在某些实施方案中,本公开内容的嵌合抗体可以是人源化抗体。典型地,将非人抗体人源化以减少对于人类的免疫原性,同时保留亲本非人抗体的特异性和亲和力。通常,人源化抗体包含这样的—个或多个可变结构域:其中HVR例如CDR(或其部分)源自非人抗体并

且FR(或其部分)源自人抗体序列。人源化抗体任选地也包含人恒定区的至少一部分。在某些实施方案中,将人源化抗体中的一些FR残基置换为来自非人抗体(例如,从其衍生出HVR残基的抗体)的相应残基,例如,以恢复或改善抗体特异性或亲和力。

[0232] 人源化抗体和制造它们的方法综述在,例如,Almagro和Fransson, *Front.Biosci.*13:1619-1633 (2008),且进一步描述在,例如,Riechmann等人,*Nature* 332:323-329 (1988);Queen等人,*Proc.Nat'l Acad.Sci.USA* 86:10029-10033 (1989);美国专利号5,821,337,7,527,791,6,982,321和7,087,409;Kashmiri等人,*Methods* 36:25-34 (2005) (描述了特异性决定区(SDR)移植);Padlan,*Mol.Immunol.*28:489-498 (1991) (描述了“表面重建”);Dall'Acqua等人,*Methods* 36:43-60 (2005) (描述了“FR改组”);和Osborn等人,*Methods* 36:61-68 (2005) 和Klimka等人,*Br.J.Cancer*,83:252-260 (2000) (描述了用于FR改组的“指导选择”方案)。

[0233] 可以用于人源化的人框架区包括、但不限于:使用“最佳拟合”方法选择的框架区(参见,例如,Sims等人,*J.Immunol.*151:2296 (1993));从轻链或重链可变区的特定亚组的人抗体的共有序列衍生出的框架区(参见,例如,Carter等人,*Proc.Natl.Acad.Sci.USA*,89:4285 (1992);和Presta等人,*J.Immunol.*,151:2623 (1993));人成熟的(体细胞突变的)框架区或人种系框架区(参见,例如,Almagro和Fransson,*Front.Biosci.*13:1619-1633 (2008));和从筛选FR文库衍生的框架区(参见,例如,Baca等人,*J.Biol.Chem.*272:10678-10684 (1997) 和Rosok等人,*J.Biol.Chem.*271:22611-22618 (1996))。

[0234] 4. 人抗体

[0235] 在某些实施方案中,本公开内容的抗体可以是人抗体。可以使用本领域已知的多种技术生产人抗体。人抗体通常描述在van Dijk和van de Winkel, *Curr.Opin.Pharmacol.*5:368-74 (2001) 和Lonberg,*Curr.Opin.Immunol.*20:450-459 (2008)。

[0236] 可以通过将免疫原施用给转基因动物来制备人抗体,所述转基因动物已经经过修饰以响应于抗原攻击而产生完整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人免疫球蛋白基因座,其替换内源免疫球蛋白基因座或其染色体外存在或随机整合进动物的染色体中。在这样的转基因小鼠中,内源免疫球蛋白基因座通常已经被灭活。关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)。也参见,例如,描述XENOMOUSE™技术的美国专利号6,075,181和6,150,584;描述HUMAB®技术的美国专利号5,770,429;描述K-MOUSE®技术的美国专利号7,041,870;和描述VELOCIMOUSE®技术的美国专利申请公开号US 2007/0061900)。可以进一步修饰来自从这类动物产生的完整抗体的人可变区,例如,通过与不同的人恒定区组合。

[0237] 还可以通过基于杂交瘤的方法制备人抗体。已经描述了用于生产人单克隆抗体的人骨髓瘤和小鼠-人异源骨髓瘤细胞系(参见,例如,Kozbor *J.Immunol.*,133:3001 (1984); Brodeur等人,*Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*,第51-63页 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); 和Boerner等人,*J.Immunol.*,147:86 (1991))。在Li等人,*Proc.Natl.Acad.Sci.USA*,103:3557-3562 (2006) 中也描述了通过人B-细胞杂交瘤技术产生的人抗体。另外的方法包括例如在以下文献中描述的那些方法:美国专利号7,189,826 (描述了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) (描述了人-人杂交瘤)。在Vollmers和Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20 (3) : 927-937 (2005) 以及Vollmers和Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27 (3) : 185-91 (2005) 中也描述了人杂交瘤技术 (Trioma技术)。

[0238] 通过分离选自人-衍生的噬菌体展示文库的Fv克隆可变结构域序列, 也可以产生人抗体。这样的可变结构域序列随后可以与期望的人恒定结构域组合。下文描述了用于从抗体文库选择人抗体的技术。

[0239] 5. 文库衍生的抗体

[0240] 通过对组合文库筛选具有期望的一种或多种活性的抗体, 可以分离本公开内容的抗体。例如, 本领域已知用于产生噬菌体展示文库并对这类文库筛选拥有期望的结合特征的抗体的多种方法。这类方法综述在, 例如, Hoogenboom等人, *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien等人, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001), 且进一步描述在, 例如, McCafferty等人, *Nature* 348:552-554; Clackson等人, *Nature* 352:624-628 (1991); Marks等人, *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1992); Marks和Bradbury, *Methods in Molecular Biology* 248:161-175 (Lo, 编, Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu等人, *J. Mol. Biol.* 338 (2) : 299-310 (2004); Lee等人, *J. Mol. Biol.* 340 (5) : 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (34) : 12467-12472 (2004); 和Lee等人, *J. Immunol. Methods* 284 (1-2) : 119-132 (2004)。

[0241] 在某些噬菌体展示法中, VH和VL基因的组库分别通过聚合酶链式反应 (PCR) 克隆并且在噬菌体文库中随机地重组, 其随后可以针对抗原结合噬菌体进行筛选, 如在Winter等人, *Ann. Rev. Immunol.*, 12:433-455 (1994) 中所述。噬菌体通常展示抗体片段, 作为单链Fv (scFv) 片段或作为Fab片段。来自免疫过的来源的文库会提供针对免疫原的高亲和力抗体, 无需构建杂交瘤。可替换地, 可以 (例如, 从人) 克隆原初库以在没有任何免疫接种的情况下提供针对广泛类型的非自身抗原以及自身抗原的抗体的单一来源, 如Griffiths等人, *EMBO J*, 12:725-734 (1993) 所述。在某些实施方案中, 通过从干细胞克隆未重排的V-基因区段并使用含有随机序列以编码高度可变的CDR3区并实现体外重排的PCR引物, 也可以合成地产生原初文库, 如Hoogenboom和Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381-388 (1992) 所述。描述人抗体噬菌体文库的专利公开包括例如美国专利号5,750,373和美国专利公开号2005/0079574、2005/0119455、2005/0266000、2007/0117126、2007/0160598、2007/0237764、2007/0292936和2009/0002360。

[0242] 从人抗体文库分离的抗体或抗体片段被认为是本文中的人抗体或人抗体片段。

[0243] 6. 多特异性抗体

[0244] 在某些实施方案中, 本公开内容的抗体可以是多特异性抗体, 例如, 双特异性抗体。多特异性抗体是对至少两种不同表位具有结合特异性的单克隆抗体。在某些实施方案中, 所述结合特异性之一是针对存在于KLB上的表位, 且另一种是针对任意其它抗原。在某些实施方案中, 所述结合特异性之一是针对存在于FGFR1上的表位, 且另一种是针对任意其它抗原。在某些实施方案中, 本公开内容的双特异性抗体可以结合KLB上的表位且可以结合FGFR1上的表位。在某些实施方案中, 本公开内容的双特异性抗体可以结合KLB上的表位且可以结合FGFR1c上的表位。双特异性抗体可以被制备为全长抗体或抗体片段。

[0245] 用于制备多特异性抗体的技术包括、但不限于重组共表达具有不同特异性的两个免疫球蛋白重链-轻链对(参见Milstein和Cuello,Nature 305:537(1983)),WO 93/08829,和Traunecker等人,EMBO J.10:3655(1991)),和“凸起-进入-孔洞”工程改造(参见,例如,美国专利号5,731,168)。也可以通过以下方式制备多特异性抗体:工程改造静电操纵效应用于制备抗体Fc-异源二聚体分子(WO 2009/089004A1);交联两个或更多个抗体或片段(参见,例如,美国专利号4,676,980,和Brennan等人,Science,229:81(1985));使用亮氨酸拉链生产双特异性抗体(参见,例如,Kostelny等人,J.Immunol.,148(5):1547-1553(1992));使用“双体”技术以制备双特异性抗体片段(参见,例如,Hollinger等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90:6444-6448(1993));和使用单链Fv(sFv)二聚体(参见,例如,Gruber等人,J.Immunol.,152:5368(1994));以及制备三特异性抗体,如在例如Tutt等人,J.Immunol.147:60(1991)中所述。

[0246] 本文中还包括具有三个或更多个功能性抗原结合位点的经工程改造的抗体,包括“章鱼抗体(Octopus antibodies)”(参见,例如,US 2006/0025576A1)。

[0247] 7. 抗体变体

[0248] 本文公开的主题还提供了公开的抗体的氨基酸序列变体。例如,可能合乎需要的是,改善抗体的结合亲和力和/或其它生物学特性。通过向编码抗体的核苷酸序列中引入适当的修饰或通过肽合成,可以制备抗体的氨基酸序列变体。此类修饰包括,但不限于,从抗体的氨基酸序列缺失残基和/或将残基插入所述氨基酸序列中和/或置换所述氨基酸序列内的残基。可以制备缺失、插入和置换的任意组合以获得最终构建体,前提条件是,最终的抗体(即,经过修饰)具有期望的特征,例如,抗原结合。

[0249] a) 置换变体、插入变体和缺失变体

[0250] 在某些实施方案中,抗体变体可以具有一个或多个氨基酸置换。用于置换诱变的目标位点包括HVR和FR。在表1中在“优选置换”的标题下显示了保守置换的非限制性例子。在表1中在“示例性置换”的标题下提供了更实质性变化的非限制性例子,并且参考氨基酸侧链类别在下面进一步描述。可以将氨基酸置换引入目标抗体中并且针对期望的活性(例如,保留的/改善的抗原结合、降低的免疫原性、或改善的补体依赖性的细胞毒性(CDC)或抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC))来筛选产物。

[0251] 表1

[0252]

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

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

[0253] 氨基酸可以根据共同的侧链特性分组：

[0254] (1) 疏水的：正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile；

[0255] (2) 中性亲水的：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；

[0256] (3) 酸性的：Asp、Glu；

[0257] (4) 碱性的：His、Lys、Arg；

[0258] (5) 影响链取向的残基：Gly、Pro；

[0259] (6) 芳族的：Trp、Tyr、Phe。

[0260] 在某些实施方案中，非保守置换需要将这些分类之一的成员交换为另一个分类的成员。

[0261] 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）的一个或多个高变区残基。通常，选择用于进一步研究的所得变体相对于亲本抗体在某些生物学特性上具有修饰（例如，改善）（例如，但不限于，增加的亲和力、降低的免疫原性），和/或具有亲本抗体的基本上保留的某些生物学特性。置换变体的一个非限制性例子是亲和力成熟的抗体，所述抗体可以例如使用基于噬菌体展示的亲合力成熟技术（诸如本文描述的那些）方便地产生。简而言之，将一个或多个HVR残基突变并且将变体抗体在噬菌体上展示和针对特定生物活性（例如，结合亲和力）进行筛选。

[0262] 在某些实施方案中，可以在HVR中做出改变（例如，置换），例如，以改善抗体亲和力。这类改变可以在HVR“热点”（即，在体细胞成熟过程中以高频率经历突变的密码子所编码的残基（参见，例如，Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)）和/或接触抗原的残基中做出，并对得到的变体VH或VL试验结合亲和力。通过构建次级文库并从中重新选择而实现的亲和力成熟已经描述在，例如，Hoogenboom等人，*Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien等人，编，Human Press, Totowa, NJ, (2001))。在亲和力成熟的某些实施方案中，通过多种方法（例如，易出错的PCR、链改组或寡核苷酸-指导的诱变）的任一种，可以将多样性引入所选择用于成熟的可变基因中。随后建立次级文库。随后筛选该文库以鉴定具有期望亲和力的任何抗体变体。另一种引入多样性的方法涉及HVR-定向的方案，其中将几个HVR残基（例如，一次4-6个残基）随机化。可以特别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。特别地经常靶向CDR-H3和CDR-L3。

[0263] 在某些实施方案中，置换、插入或缺失可以出现在一个或多个HVR内部，只要这类改变不实质上降低抗体的结合抗原的能力。例如，可以在HVR中做出不实质上降低结合亲和

力的保守改变(例如,如本文中提供的保守置换)。这类改变可以例如在HVR的抗原接触残基的外部。在上文提供的变体VH和VL序列的某些实施方案中,每个HVR未改变或含有不超过一个、两个或三个氨基酸置换。

[0264] 一种用于鉴定可以被靶向以便诱变的抗体残基或区域的有用方法称作“丙氨酸扫描诱变”,如Cunningham和Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085所述。在这种方法中,鉴定一个残基或靶残基组(例如,带电荷残基诸如arg、asp、his、lys和glu),并且用中性的或带负电荷的氨基酸(例如,丙氨酸或聚丙氨酸)替换以确定该抗体与抗原的相互作用是否受影响。可以在对初始置换显示出功能敏感性的氨基酸位置处引入其它置换。可替换地或额外地,可以使用抗原-抗体复合物的晶体结构来鉴定抗体和抗原之间的接触点。可以靶向或消除这类接触残基和邻近残基作为置换候选物。可以筛选变体以确定它们是否含有期望的特性。

[0265] 氨基酸序列插入包括长度在从1个残基至含有一百个或更多个残基的多肽的范围内的氨基端和/或羧基端融合体,以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的例子包括具有N-端甲硫氨酰基残基的抗体。抗体分子的其它插入变体包括抗体的N-或C-端与酶(例如,用于抗体指导的酶前药疗法(ADEPT))或增加所述抗体的血清半衰期的多肽的融合体。

[0266] b) 糖基化变体

[0267] 在某些实施方案中,可以改变本公开内容的抗体以增加或减少抗体被糖基化的程度。通过改变氨基酸序列从而建立或除去一个或多个糖基化位点,可以方便地实现对抗体添加或缺失糖基化位点。

[0268] 在某些实施方案中,在抗体包含Fc区的情况下,可以改变与之连接的碳水化合物。哺乳动物细胞产生的天然抗体通常包含分枝的双天线寡糖,所述寡糖通常借助N-键连接至Fc区的CH2结构域的Asn297。参见,例如,Wright等人,TIBTECH 15:26-32 (1997)。寡糖可以包括各种碳水化合物,例如,甘露糖、N-乙酰基葡萄糖胺(GlcNAc)、半乳糖和唾液酸,以及与双天线寡糖结构的“茎部”中的GlcNAc连接的岩藻糖。在某些实施方案中,可以修饰本公开内容的抗体中的寡糖以便建立具有某些改善的特性的抗体变体。

[0269] 在某些实施方案中,提供具有碳水化合物结构的抗体变体,所述碳水化合物结构缺少与Fc区(直接地或间接地)连接的岩藻糖。例如,这类抗体中岩藻糖的量可以是约1%至约80%、约1%至约65%、约5%至约65%或约20%至约40%和之间的值。

[0270] 在某些实施方案中,可以通过以下方式确定岩藻糖的量:相对于如通过MALDI-TOF质谱法(例如,如WO 2008/077546中所述)所测量的与Asn297连接的全部糖结构(例如复杂结构、杂合结构和高甘露糖结构)的总和,计算糖链内在Asn297处的岩藻糖的平均量。Asn297表示位于Fc区中约位置297处的天冬酰胺残基(Fc区残基的Eu编号);但是,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个氨基酸附近,即在位置294和300之间。这样的岩藻糖基化变体可以具有改善的ADCC功能。参见,例如,美国专利公开号US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd)。与“去岩藻糖基化的”或“岩藻糖-缺陷型”抗体变体相关的出版物的例子包括:US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO

2003/085119;WO 2003/084570;WO 2005/035586;WO 2005/035778;WO2005/053742;WO2002/031140;Okazaki等人,J.Mol.Biol.336:1239-1249(2004);Yamane-Ohnuki等人,Biotech.Bioeng.87:614(2004)。

[0271] 可以在任何蛋白岩藻糖基化缺陷型细胞系中生产去岩藻糖基化抗体。细胞系的非限制性例子包括蛋白岩藻糖基化缺陷型的Lec13 CHO细胞(Ripka等人,Arch.Biochem.Biophys.249:533-545(1986);美国专利申请号US 2003/0157108 A1, Presta,L;和WO 2004/056312 A1,Adams等人,特别在实施例11),和敲除的细胞系,诸如 α -1,6-岩藻糖基转移酶基因FUT8敲除的CHO细胞(参见,例如,Yamane-Ohnuki等人,Biotech.Bioeng.87:614(2004);Kanda,Y.等人,Biotechnol.Bioeng.,94(4):680-688(2006);和WO2003/085107)。

[0272] 还可以为抗体变体提供双分的寡糖,例如,其中与抗体的Fc区连接的双天线寡糖由GlcNAc对分。这样的抗体变体可以具有减少的岩藻糖化和/或改善的ADCC功能。这样的抗体变体的非限制性例子例如描述在WO2003/011878(Jean-Mairet等人);美国专利号6,602,684(Umana等人);和US 2005/0123546(Umana等人)。还提供了具有与Fc区连接的、在寡糖中的至少一个半乳糖残基的抗体变体。这样的抗体变体可以具有改善的CDC功能。这样的抗体变体例如描述在WO 1997/30087(Patel等人);WO 1998/58964(Raju,S.);和WO 1999/22764(Raju,S.)。

[0273] c) Fc区变体

[0274] 在某些实施方案中,可以将一个或多个氨基酸修饰引入本文中提供的抗体的Fc区中,由此产生Fc区变体。该Fc区变体可以包含人Fc区序列(例如,人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 Fc区),所述人Fc区序列包含在一个或多个氨基酸位置处的氨基酸修饰(例如,置换)。

[0275] 在某些实施方案中,本公开内容提供了具有一些但并非全部效应子功能的抗体变体,这使所述抗体变体成为下述应用的合乎需要的候选物:其中抗体的体内半衰期是重要的,而某些效应子功能(诸如补体和ADCC)是不必要的或有害的。可以实施体外和/或体内细胞毒性测定以证实CDC和/或ADCC活性的降低/耗尽。例如,可以实施Fc受体(FcR)结合测定以确保抗体缺少Fc γ R结合(因此可能缺少ADCC活性),但是保留FcRn结合能力。用于介导ADCC的原代细胞(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。Ravetch和Kinet,Annu.Rev.Immunol.9:457-492(1991)的第464页上的表3中总结了造血细胞上的FcR表达。评估目标分子的ADCC活性的体外测定的非限制性例子描述在美国专利号5,500,362(参见,例如,Hellstrom,I.等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 83:7059-7063(1986))和Hellstrom,I等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 82:1499-1502(1985);5,821,337(参见Bruggemann,M.等人,J.Exp.Med.166:1351-1361(1987))。可替换地,可以采用非放射性测定方法(参见,例如,用于流式细胞计量术的ACTI™非放射性的细胞毒性测定(Cell Technology,Inc.Mountain View,CA;和CYTOTOX96®非放射性的细胞毒性测定(Promega, Madison,WI))。用于这样的测定的有用效应细胞包括外周血单核细胞(PBMC)和天然杀伤(NK)细胞。可替换地或额外地,可以在体内评估目标分子的ADCC活性,例如,在动物模型中,诸如在Clynes等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 95:652-656(1998)公开的动物模型中。也可以实施C1q结合测定以证实抗体不能结合C1q且因此缺少CDC活性。参见,例如,WO 2006/029879和WO 2005/100402中的C1q和C3c结合ELISA。为了评估补体激活,可以进行CDC测定

(参见,例如,Gazzano-Santoro等人,J.Immunol.Methods 202:163(1996);Cragg,M.S.等人,Blood 101:1045-1052(2003);和Cragg,M.S.和M.J.Glennie,Blood 103:2738-2743(2004))。也可以使用本领域已知的方法执行FcRn结合和体内清除率/半衰期确定(参见,例如,Petkova,S.B.等人,Int'l.Immunol.18(12):1759-1769(2006))。在某些实施方案中,可以在Fc区中做出改变,其导致改变的(即,改善的或减少的)C1q结合和/或补体依赖性的细胞毒性(CDC),例如,如在美国专利号6,194,551、WO 99/51642和Idusogie等人,J.Immunol.164:4178-4184(2000)中所述。

[0276] 具有减少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(美国专利号6,737,056)。这样的Fc突变体包括具有在氨基酸位置265、269、270、297和327中的两个或更多个位置处的置换的Fc突变体,包括将残基265和297置换成丙氨酸的所谓的“DANA”Fc突变体(美国专利号7,332,581)。

[0277] 描述了具有改善的或减少的与FcR的结合的某些抗体变体。参见,例如,美国专利号6,737,056;WO 2004/056312,和Shields等人,J.Biol.Chem.9(2):6591-6604(2001)。

[0278] 在某些实施方案中,本公开内容的抗体变体包含具有改善ADCC的一个或多个氨基酸置换(例如,在Fc区的位置298、333和/或334(残基的EU编号)处的置换)的Fc区。

[0279] 在某些实施方案中,在本文中公开的抗体(例如,双特异性抗体)的Fc区中做出的改变可以产生具有增加的半衰期和改善的与新生儿Fc受体(FcRn)的结合的变体抗体,所述新生儿Fc受体负责母亲IgG向胎儿的转移(Guyer等人,J.Immunol.117:587(1976)和Kim等人,J.Immunol.24:249(1994)),描述在US2005/0014934A1(Hinton等人)中。那些抗体包含其中具有一个或多个置换的Fc区,所述置换改善Fc区与FcRn的结合。这样的Fc变体包括在一个或多个Fc区残基:238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424或434处具有置换的那些,例如,Fc区残基434的置换(美国专利号7,371,826)。

[0280] 关于Fc区变体的其它例子,也参见Duncan&Winter,Nature 322:738-40(1988);美国专利号5,648,260;美国专利号5,624,821;和WO 94/29351。

[0281] d) 半胱氨酸工程改造的抗体变体

[0282] 在某些实施方案中,可能合乎需要的是,建立半胱氨酸工程改造的抗体,例如,“硫代Mab”,其中抗体的一个或多个残基用半胱氨酸残基置换。在特定实施方案中,置换的残基出现在抗体的可到达位点处。通过用半胱氨酸置换那些残基,由此使反应性巯基位于抗体的可到达位点处并且可以用于将抗体缀合至其它部分(诸如药物部分或接头-药物部分)以产生免疫缀合物,如本文中进一步所述。在某些实施方案中,可以用半胱氨酸置换以下残基中的任何一个或多个:轻链的V205(Kabat编号);重链的A118(EU编号);和重链Fc区的S400(EU编号)。可以如例如美国专利号7,521,541中所述产生半胱氨酸工程改造的抗体。

[0283] e) 抗体衍生物

[0284] 在某些实施方案中,可以进一步修饰本公开内容的抗体以含有本领域已知的且容易得到的额外非蛋白性部分。适合用于衍生化抗体的部分包括、但不限于水溶性聚合物。水溶性聚合物的非限制性例子包括、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-1,3-二氧杂环戊烷、聚-1,3,6-三氧杂环己烷、亚乙基/马来酸酐共聚物、聚氨基酸(同聚物或无规共聚物)和葡聚糖或聚(n-乙烯基吡

咯烷酮) 聚乙二醇、丙二醇同聚物、聚环氧丙烷/环氧乙烷共聚物、聚氧乙基化多元醇(例如, 丙三醇)、聚乙烯醇和它们的混合物。由于它在水中的稳定性, 聚乙二醇丙醛可以具有制造方面的优点。所述聚合物可以具有任何分子量, 并可以是分枝或不分枝的。与抗体连接的聚合物的数目可以变动, 并且如果连接超过一个聚合物, 它们可以是相同或不同的分子。一般而言, 用于衍生化的聚合物的数目和/或类型可以基于以下考虑事项确定: 包括、但不限于待改善的抗体的特定特性或功能, 抗体衍生物是否将用在确定条件下的疗法中等。

[0285] 在某些实施方案中, 提供了抗体和非蛋白性部分的缀合物, 所述非蛋白性部分可以通过暴露于辐射而选择性地加热。在一个实施方案中, 非蛋白性部分是碳纳米管(Kam等人, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 102:11600-11605 (2005))。在某些实施方案中, 辐射可以具有任何波长, 并包括、但不限于这样的波长: 其不伤害普通细胞, 但是其将非蛋白性部分加热至杀伤在抗体-非蛋白性部分附近的细胞的温度。

[0286] D. 抗体生产方法

[0287] 使用本领域中任何可得到的或已知的技术, 可以生产本文公开的抗体。例如, 但不作为限制, 可以使用例如在美国专利号4,816,567中描述的重组方法和组合物生产抗体。在下面的实施例中描述了制备抗体的详细操作。

[0288] 本文公开的主题还提供了分离的编码本文中公开的抗体的核酸。例如, 所述分离的核酸可以编码包含所述抗体的VL的氨基酸序列和/或包含所述抗体的VH的氨基酸序列, 例如, 所述抗体的轻链和/或重链。在某些实施方案中, 所述分离的核酸可以包括编码具有SEQ ID NO:128所示的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:130所示的序列的轻链可变区氨基酸序列的核苷酸序列。

[0289] 在某些实施方案中, 所述核酸可以存在于一种或多种载体(例如, 表达载体)中。本文中使用的术语“载体”表示能够运输它已经连接的另一种核酸的核酸分子。一类载体是“质粒”, 其表示在其中可以连接另外的DNA区段的圆形双链DNA环。另一类载体是病毒载体, 其中可以将另外的DNA区段连接进病毒基因组中。某些载体能够在它们所引入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型哺乳动物载体)。其它载体(例如, 非-附加型哺乳动物载体)在引入宿主细胞中以后整合进宿主细胞的基因组中, 且由此与宿主基因组一起复制。此外, 某些载体、表达载体能够指导与它们可操作地连接的基因的表达。一般而言, 在重组DNA技术中利用的表达载体经常呈质粒(载体)的形式。但是, 公开的主题意图包括表达载体的这样的其它形式, 诸如起等同作用的病毒载体(例如, 复制缺陷型逆转录病毒、腺病毒和腺伴随病毒)。

[0290] 在某些实施方案中, 可以将编码本公开内容的抗体的核酸和/或一种或多种包括所述核酸的载体引入宿主细胞中。在某些实施方案中, 通过本领域已知的任意方法可以实现核酸向细胞中的引入, 所述方法包括、但不限于, 转染、电穿孔、显微注射、含有所述核酸序列的病毒或细菌噬菌体载体的感染、细胞融合、染色体介导的基因转移、微细胞介导的基因转移、原生质球融合等。在某些实施方案中, 宿主细胞可以包括以下载体, 例如, 已经用以下载体转化: (1) 包含特定核酸的载体, 所述核酸编码包含所述抗体的VL的氨基酸序列和包含所述抗体的VH的氨基酸序列, 或(2) 第一载体和第二载体, 所述第一载体包含特定核酸, 所述核酸编码包含所述抗体的VL的氨基酸序列, 所述第二载体包含特定核酸, 所述核酸编码包含所述抗体的VH的氨基酸序列。在某些实施方案中, 所述宿主细胞是真核细胞, 例如,

中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞或淋巴样细胞 (例如, Y0、NS0、Sp20 细胞)。

[0291] 在某些实施方案中, 制备抗-KLB 抗体或抗-FGFR1c 的方法可以包括: 在适合于表达所述抗体的条件下培养其中已经引入了编码所述抗体的核酸的宿主细胞, 和任选地从宿主细胞和/或宿主细胞培养基回收所述抗体。在某些实施方案中, 通过色谱法技术从宿主细胞回收所述抗体。

[0292] 为了重组生产本公开内容的抗体, 可以分离编码抗体的核酸, 例如如上所述的, 并将其插入到一种或多种载体中用以在宿主细胞中进一步克隆和/或表达。可以使用常规方法容易地对这样的核酸进行分离和测序 (例如, 通过使用能够特异性结合编码抗体的重链和轻链的基因的寡核苷酸探针)。

[0293] 适用于克隆或表达编码抗体的载体的宿主细胞包括本文中所述的原核和真核细胞。例如, 抗体可以在细菌中制备, 尤其是在不需要糖基化和 Fc 效应子功能时。关于在细菌中表达抗体片段和多肽, 参见, 例如, 美国专利号 5,648,237, 5,789,199, 和 5,840,523。(也参见 Charlton, *Methods in Molecular Biology*, 第 248 卷 (B.K.C.Lo, 编, Humana Press, Totowa, NJ, 2003), 第 245-254 页, 其描述了抗体片段在大肠杆菌中的表达)。在表达后, 抗体可以分离自可溶级分中的细菌细胞糊, 并且可以被进一步纯化。

[0294] 除了原核生物以外, 真核微生物诸如丝状真菌或酵母是编码抗体的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”的真菌和酵母菌株, 从而导致具有部分地或完全地人糖基化模式的抗体的生产。参见 Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004), 和 Li 等人, *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006)。适合用于表达糖基化抗体的宿主细胞也可以衍生自多细胞的生物体 (无脊椎动物和脊椎动物)。无脊椎动物细胞的例子包括植物和昆虫细胞。已经鉴别出众多可以与昆虫细胞结合使用的杆状病毒菌株, 特别是用于转染草地贪夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) 细胞。

[0295] 适合用于表达糖基化抗体的宿主细胞也衍生自多细胞的生物体 (无脊椎动物和脊椎动物)。无脊椎动物细胞的例子包括植物和昆虫细胞。已经鉴别出众多可以与昆虫细胞结合使用的杆状病毒菌株, 特别是用于转染草地贪夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) 细胞。

[0296] 在某些实施方案中, 植物细胞培养物可以用作宿主细胞。参见, 例如, 美国专利号 5,959,177、6,040,498、6,420,548、7,125,978 和 6,417,429 (描述了用于在转基因植物中生产抗体的 PLANTIBODIESTM 技术)。

[0297] 在某些实施方案中, 脊椎动物细胞也可以用作宿主。例如, 且不作为限制, 适合悬浮培养的哺乳动物细胞系可能是有用的。有用的哺乳动物宿主细胞系的非限制性例子是用 SV40 转化的猴肾 CV1 系 (COS-7); 人胚肾系 (293 或 293 细胞, 其描述在例如 Graham 等人, *J. Gen Virol.* 36:59 (1977) 中); 幼仓鼠肾细胞 (BHK); 小鼠塞尔托利细胞 (TM4 细胞, 其描述在例如 Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980) 中); 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); 水牛鼠肝细胞 (BRL 3A); 人肺细胞 (W138); 人肝细胞 (Hep G2); 小鼠乳腺肿瘤 (MMT 060562); TRI 细胞, 其描述在例如 Mather 等人, *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982) 中; MRC 5 细胞; 和 FS4 细胞。其它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 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); 和骨髓瘤细胞系诸如 Y0、NS0 和 Sp2/0。关于适合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, 第248卷(B.K.C.Lo, 编, Humana Press, Totowa, NJ), 第255-268页(2003)。

[0298] 在某些实施方案中,用于制备双特异性抗体和/或多特异性抗体的技术包括、但不限于重组共表达具有不同特异性的两个免疫球蛋白重链-轻链对(参见Milstein和Cuello, Nature 305:537(1983)), PCT专利申请号W0 93/08829, 和Traunecker等人, EMBO J. 10:3655(1991)), 和“凸起-进入-孔洞”工程改造(参见, 例如, 美国专利号5,731,168)。也可以通过以下方式制备双特异性抗体:工程改造静电操纵效应用于制备抗体Fc-异源二聚体分子(W0 2009/089004A1);交联两个或更多个抗体或片段(参见, 例如, 美国专利号4,676,980, 和Brennan等人, Science, 229:81(1985));使用亮氨酸拉链生产双特异性抗体(参见, 例如, Kostelny等人, J. Immunol., 148(5):1547-1553(1992));使用“双体”技术以制备双特异性抗体片段(参见, 例如, Hollinger等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448(1993));和使用单链Fv(sFv)二聚体(参见, 例如, Gruber等人, J. Immunol., 152:5368(1994));以及制备三特异性抗体, 如在例如Tutt等人, J. Immunol. 147:60(1991)中所述。

[0299] 还可以使用化学技术(参见, 例如, Kranz(1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:5807), “polydome”技术(参见, 例如, 美国专利4,474,893)或重组DNA技术制备本公开内容的双特异性分子和多特异性分子。还可以如下制备本文公开的主题的双特异性分子和多特异性分子:使用本领域已知的和如本文中所述的方法, 缀合组分结合特异性, 例如, 第一表位和第二表位结合特异性。例如, 且不作为限制, 可以单独地产生双特异性分子和多特异性分子的每种结合特异性, 并然后彼此缀合。当结合特异性是蛋白或肽时, 多种偶联剂或交联剂可以用于共价缀合。交联剂的非限制性例子包括蛋白A、碳二亚胺、N-琥珀酰亚胺基-S-乙酰基-硫乙酸酯(SATA)、N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫基)丙酸酯(SPDP)和磺基琥珀酰亚胺基4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷(haxane)-1-甲酸酯(磺基-SMCC)(参见, 例如, Karpovsky(1984) J. Exp. Med. 160:1686;Liu(1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8648)。其它方法包括Paulus(Behring Ins. Mitt. (1985) No. 78, 118-132;Brennan(1985) Science 229:81-83), Glennie(1987) J. Immunol. 139:2367-2375)描述的那些。当结合特异性是抗体(例如, 两种人源化抗体)时, 它们可以通过两个重链的C-端铰链区的巯基键合而缀合。在某些实施方案中, 可以在缀合之前将铰链区修饰成含有奇数个巯基残基, 例如, 一个。

[0300] 在某些实施方案中, 双特异性抗体的两种结合特异性可以在相同载体中编码并在相同宿主细胞中表达和装配。在双特异性分子和多特异性分子是MAb x MAb、MAb x Fab、Fab x F(ab')₂或配体x Fab融合蛋白的情况下, 该方法是特别有用的。在某些实施方案中, 本公开内容的双特异性抗体可以是单链分子, 诸如单链双特异性抗体、包含一个单链抗体和一个结合决定簇的单链双特异性分子、或包含两个结合决定簇的单链双特异性分子。双特异性分子和多特异性分子还可以是单链分子, 或可以包含至少两个单链分子。用于制备双特异性分子和多特异性分子的方法描述在, 例如, 美国专利号5,260,203;美国专利号5,455,030;美国专利号4,881,175;美国专利号5,132,405;美国专利号5,091,513;美国专利号5,476,786;美国专利号5,013,653;美国专利号5,258,498;和美国专利号5,482,858。在本文中还包括经工程改造的抗体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), 包括“章鱼抗体”(参见, 例如, US 2006/0025576A1)。

[0301] 本公开内容还提供了三特异性的(例如, 三功能性的)抗体。例如, 且不作为限制,

本公开内容的三特异性抗体可以结合以下对象和/或与以下对象相互作用:存在于KLB上的表位,存在FGFR1上的表位,和存在于第三蛋白上的表位或抗原,例如,但不限于,PCSK9、GCGR、AdipoR、ZnT8、ApoL1、MSTN、InsR或FABP4。

[0302] 在某些实施方案中,可以使用动物系统来生产本公开内容的抗体。一种用于制备杂交瘤的动物系统是鼠系统。小鼠中的杂交瘤生产是一种非常充分确定的操作。免疫接种方案和分离免疫的脾细胞进行融合的技术是本领域已知的。融合配偶体(例如,鼠骨髓瘤细胞)和融合操作也是已知的(参见,例如,Harlow和Lane (1988), *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor New York)。

[0303] E. 测定

[0304] 通过本领域已知的和本文中提供的各种测定,可以针对它们的物理/化学性能和/或生物活性鉴别、筛选或表征本文中提供的本公开内容的抗体。

[0305] 1. 结合测定和其它测定

[0306] 在某些实施方案中,通过已知方法,诸如酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)、或蛋白质印迹测定,可以针对它的抗原结合活性试验本公开内容的抗体。这些测定中的每一种通常通过采用经标记的对目标复合物特异性的试剂(例如,抗体)来检测特别重要的蛋白-抗体复合物的存在。例如,使用例如酶连接的识别并特异性地结合抗体-KLB复合物的抗体或抗体片段,可以检测KLB-抗体复合物。可替换地,使用多种其它免疫测定中的任一种,可以检测所述复合物。例如,可以将抗体放射性地标记并用在放射免疫测定(RIA)中(参见,例如,Weintraub, B., *Principles of Radioimmunoassays*, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March, 1986, 其通过引用并入本文)。通过诸如Geiger计数器或闪烁计数器的应用等方式或通过放射自显影术,可以检测放射性同位素。

[0307] 在某些实施方案中,可以使用竞争测定来鉴别与本公开内容的抗-KLB抗体(例如,12A11或8C5)竞争对KLB的结合的抗体。在某些实施方案中,这样的竞争性抗体结合被12A11或8C5结合的相同表位(例如,直链或构象表位)。用于将表位映射至抗体结合对象的详细示例性方法提供在Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols," *Methods in Molecular Biology* 第66卷 (Humana Press, Totowa, NJ)。

[0308] 在竞争测定的一个非限制性例子中,可以将固定化的KLB在溶液中温育,所述溶液包含结合至KLB(例如,12A11或8C5)的第一种标记的抗体和第二种未标记的抗体,所述第二种未标记的抗体针对它的与第一抗体竞争结合KLB的能力进行了试验。所述第二抗体可以存在于杂交瘤上清液中。作为对照,将固定化的KLB在包含第一种标记的抗体、但是不包含第二种未标记的抗体的溶液中温育。在允许第一抗体与KLB结合的条件下温育以后,将多余的未结合的抗体除去,并测量与固定化的KLB结合的标记的量。如果试验样品中与固定化的KLB结合的标记的量相对于对照样品大幅下降,那么指示,第二抗体与第一抗体竞争对KLB的结合。参见Harlow和Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* 第14章 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)。

[0309] 2. 活性测定

[0310] 本公开内容提供了用于鉴别具有生物活性的抗-KLB抗体的测定。生物活性可以包括,例如,活化KLB/FGFR1c受体复合物。还提供了在体内和/或在体外具有这样的生物活性

的抗体。在某些实施方案中,所述测定可以包括:使本公开内容的抗体与细胞(例如,表达KLB的293T细胞)结合,和分析KLB-FGFR1c受体复合物的一种或多种下游靶标(例如,ERK)的活性和/或磷酸化状态。在某些实施方案中,所述测定可以包括:将本公开内容的抗体施用给受试者(例如,非人动物),和分析所述抗体对所述受试者中的葡萄糖水平的影响。

[0311] F. 免疫缀合物

[0312] 本文公开的主题还提供了免疫缀合物,其包含与一个或多个细胞毒性剂诸如化学治疗剂或药物、生长抑制剂、毒素(例如,蛋白毒素、细菌、真菌、植物或动物起源的酶活性毒素或其片段)或放射性同位素缀合的本文中公开的抗体。例如,公开的主题的抗体或抗原结合部分可以在功能上连接(例如,通过化学偶联、基因融合、非共价结合或其它方式)至一个或多个其它结合分子,诸如另一种抗体、抗体片段、肽或结合模拟物。

[0313] 在某些实施方案中,免疫缀合物是抗体-药物缀合物(ADC),其中将抗体与一个或多个药物缀合,所述药物包括、但不限于美坦辛类(参见美国专利号5,208,020、5,416,064和欧洲专利EP 0 425 235);耳他汀诸如单甲基耳他汀药物部分DE和DF(MMAE和MMAF)(参见美国专利号5,635,483和5,780,588,和7,498,298);多拉司他汀;卡奇霉素或其衍生物(参见美国专利号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等人,Cancer Res.53:3336-3342(1993);和Lode等人,Cancer Res.58:2925-2928(1998));蒽环类抗生素诸如道诺霉素或多柔比星(参见Kratz等人,Current Med.Chem.13:477-523(2006);Jeffrey等人,Bioorganic&Med.Chem.Letters 16:358-362(2006);Torgov等人,Bioconj.Chem.16:717-721(2005);Nagy等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 97:829-834(2000);Dubowchik等人,Bioorg.&Med.Chem.Letters12:1529-1532(2002);King等人,J.Med.Chem.45:4336-4343(2002);和美国专利号6,630,579);甲氨蝶呤;长春地辛;紫杉烷诸如多西他赛、紫杉醇、拉罗他赛、替司他赛和奥他赛;单端孢霉烯;和CC1065。

[0314] 在某些实施方案中,免疫缀合物包含与酶活性毒素或其片段缀合的如本文中所述的抗体,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(得自铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*))、蓖麻蛋白A链、相思豆毒蛋白A链、蒴莲根毒蛋白A链、 α -帚曲毒蛋白、油桐(*Aleurites fordii*)蛋白、石竹素蛋白、美洲商陆(*Phytolaca americana*)蛋白(PAPI、PAPII和PAP-S)、苦瓜(*Momordica charantia*)抑制剂、麻疯树毒蛋白、巴豆毒蛋白、肥皂草(*Saponaire officinalis*)抑制剂、白树毒素、丝林霉素、局限曲菌素、酚霉素、依诺霉素和单端孢菌毒素。

[0315] 在某些实施方案中,免疫缀合物包含与放射性原子缀合以形成放射性缀合物的如本文中所述的抗体。多种放射性同位素可用于生产放射性缀合物。非限制性例子包括 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。当将放射性缀合物用于检测时,它可以包括用于闪烁法研究的放射性原子,例如 ^{99m}Tc 或 I^{123} ,或用于核磁共振(NMR)成像(也被称作磁共振成像,mri)的自旋标记,诸如碘-123(再次出现)、碘-131、钆-111、氟-19、碳-13、氮-15、氧-17、钆、锰或铁。

[0316] 可以用多种双官能蛋白质偶联剂来制备抗体和细胞毒性剂的缀合物,如3-(2-吡啶二硫基)丙酸N-琥珀酰亚胺酯(SPDP)、4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸N-琥珀酰亚胺酯(SMCC)、亚氨基硫烷(IT)、亚胺酯的双官能衍生物(诸如二亚胺代己二酸二甲酯

HCl)、活性酯(诸如如辛二酸二琥珀酰亚胺酯)、醛(诸如戊二醛)、二-叠氮基化合物(诸如二(对-叠氮基苯甲酰基)己二胺)、二-重氮基衍生物(诸如二-(对-重氮基苯甲酰基)-乙二胺)、二异氰酸酯(诸如2,6-二异氰酸甲苯酯)和双活性氟化合物(诸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。例如,可以按照Vitetta等人,Science238:1098(1987)中所述制备蓖麻蛋白免疫毒素。碳-14-标记的3-甲基二亚乙基三胺五乙酸1-异硫氰酰基苄酯(MX-DTPA)是用于将放射性核苷酸与抗体缀合的示例性螯合剂。参见W094/11026。接头可以是促进在细胞中释放细胞毒性药物的“可切割接头”。例如,可以使用酸敏感接头、肽酶敏感接头、光敏感接头、二甲基接头或含有二硫化物的接头(Chari等人,Cancer Res.52:127-131(1992);美国专利号5,208,020)。

[0317] 本文的免疫缀合物或ADC明确考虑但不限于用包括、但不限于如下的市售交联剂(例如来自Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A)制备的这类缀合物: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和SVSB(琥珀酰亚胺基-(4-乙烯基砜)苯甲酸酯)。

[0318] III. 使用方法

[0319] 本文公开的主题还提供了使用公开的抗体(例如,抗-KLB/抗-FGFR1c双特异性抗体)的方法。在某些实施方案中,所述方法涉及本文公开的抗体的治疗用途。在某些实施方案中,所述方法涉及公开的抗体在诊断方法中的用途。

[0320] A. 诊断和检测方法

[0321] 在某些实施方案中,本文中公开的对KLB具有特异性的任何抗体(例如,上面的公开抗-KLB抗体和/或抗-KLB/抗-FGFR1双特异性抗体)可以用于检测KLB在生物样品中的存在。在另一个方面,本文公开的主题提供了使用本文中公开的抗-KLB抗体或抗-KLB/抗-FGFR1双特异性抗体诊断和/或检测疾病的方法。本文中使用的术语“检测”包括定量和/或定性检测。

[0322] 在某些非限制性的实施方案中,生物样品包括、但不限于临床样品、一个或多个细胞、培养的细胞、细胞上清液、细胞裂解物和组织样品。样品的来源可以是固体组织(例如,来自新鲜的、冷冻的和/或保存的器官、组织样品、活组织检查物或抽吸物)或来自个体的细胞。在某些实施方案中,生物样品可以包括一个或多个来自肝(例如,来自受试者的肝)的细胞和/或组织。

[0323] 在某些实施方案中,提供了用在诊断或检测方法中的抗-KLB抗体。在另一个方面,提供了检测KLB在生物样品中的存在的方法。在某些实施方案中,所述诊断或检测方法包括:在允许抗体与KLB结合的条件下,使生物样品与如本文中所述的结合存在于KLB上的表位的抗体接触,和检测在所述抗体和KLB之间是否形成复合物。这样的方法可以是体外或体内方法,例如,免疫荧光或蛋白质印迹。在某些实施方案中,使用抗-KLB抗体来选择适合用抗-KLB抗体治疗的受试者,例如,在KLB是用于选择患者的生物标志物的情况下。

[0324] 在某些实施方案中,用在公开的方法中的本公开内容的抗体(例如,抗-KLB/抗-FGFR1双特异性抗体)对肝(例如,肝功能)没有显著影响。在某些实施方案中,与FGF21蛋白对肝中FGFR/KLB受体复合物的调节相比,本公开内容的抗体不会调节肝中FGFR/KLB受体复合物的活性。在某些实施方案中,本公开内容的抗体不会导致FGFR4/KLB复合物的抑制和/

或不会导致肝酶(例如,但不限于,ALT、AST、ALP和GLDH)的升高。在某些实施方案中,本公开内容的抗体不会作为肝中FGFR2c/KLB复合物和/或FGFR3c/KLB复合物的激动剂起作用,所述复合物可以导致肝中活化的MAPK信号传递和/或改变的Spry4和Dusp6的表达。在某些实施方案中,与FGF21蛋白对MAPK信号传递的活化相比,本公开内容的抗体不会导致肝中MAPK信号传递的活化。在某些实施方案中,本公开内容的抗体不会作为肝中FGFR4/KLB复合物的激动剂起作用。

[0325] 在某些实施方案中,用在公开的方法中的本公开内容的抗体(例如,抗-KLB/抗-FGFR1双特异性抗体)包括不会阻断FGF配体(例如,FGF19和FGF21)与KLB/FGFR1c复合物的结合和/或相互作用的抗体。在某些实施方案中,本文中公开的抗-KLB/抗-FGFR1双特异性抗体表示这样的抗体:其调节KLB/FGFR1c复合物活性且不会阻断天然FGF配体(例如,FGF19和FGF21)与KLB/FGFR1c复合物的相互作用和/或结合。在某些实施方案中,本文中公开的抗-KLB/抗-FGFR1双特异性抗体表示这样的抗体:其在没有KLB存在下不会阻断天然FGF配体与FGF受体的结合和/或活性。例如,且不作为限制,本公开内容的抗-KLB/抗-FGFR1双特异性抗体不会阻断天然FGF配体与FGFR1/KLA复合物或单独FGFR1的相互作用。在某些实施方案中,本文中公开的抗-KLB/抗-FGFR1双特异性抗体表示这样的抗体:其在没有FGFR1存在下不会阻断天然FGF配体与KLB的结合和/或活性。例如,且不作为限制,本公开内容的抗-KLB/抗-FGFR1双特异性抗体不会阻断天然FGF配体与FGFR4/KLB复合物、FGFR2c/KLB复合物和/或FGFR3c/KLB复合物的相互作用。

[0326] 在某些实施方案中,可以标记用在公开的方法中的抗-KLB抗体、抗-FGFR1c和/或抗-KLB/抗-FGFR1,例如,抗-KLB/抗-FGFR1c双特异性抗体。标记包括、但不限于直接检测的标记或部分(诸如荧光标记、生色标记、电子密度标记、化学发光标记和放射性标记),以及例如通过酶促反应或分子相互作用间接检测的部分(诸如酶或配体)。标记的非限制性例子包括放射性同位素³²P、¹⁴C、¹²⁵I、³H和¹³¹I,荧光团,如稀土螯合物或荧光素及其衍生物、罗丹明及其衍生物、丹磺酰、伞形酮、萤光素酶(例如萤火虫萤光素酶和细菌萤光素酶(参见美国专利号4,737,456)),萤光素,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,葡糖淀粉酶,溶菌酶,糖氧化酶(例如葡糖氧化酶、半乳糖氧化酶和葡糖-6-磷酸脱氢酶),杂环氧化酶(诸如尿酸氧化酶和黄嘌呤氧化酶)、与利用过氧化氢来氧化染料前体的酶(诸如HRP,乳过氧化物酶,或微氧化酶)偶联,生物素/抗生物素蛋白,自旋标记,噬菌体标记,稳定自由基等。

[0327] B. 治疗方法

[0328] 在某些实施方案中,本文公开的主题的一种或多种抗体可以用于治疗受试者中的疾病和/或病症。例如,但不作为限制,所述疾病可以是代谢病症。代谢病症的非限制性例子包括多囊卵巢综合征(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)、高脂血症、高血压、II型糖尿病、非II型糖尿病、I型糖尿病、潜伏的自身免疫性糖尿病(LAD)和青年成熟型糖尿病(MODY)。在某些实施方案中,所述代谢病症是II型糖尿病。在某些实施方案中,所述代谢病症是肥胖。

[0329] 在某些实施方案中,本文公开的主题的一种或多种抗体可以用于治疗巴-比综合征、普拉德-威利综合征、阿尔斯特伦综合征、Cohen综合征、奥尔布赖特遗传性骨营养不良(假性甲状旁腺功能减退)、卡彭特综合征、MOMO综合征、鲁宾斯坦-泰比综合征、脆性X综合

征和Börjeson-Forssman-Lehman综合征。在某些实施方案中,本文公开的主题的一种或多种抗体可以用于治疗老龄化及有关的疾病诸如阿尔茨海默氏病、帕金森病和ALS。

[0330] 在某些实施方案中,本文公开的主题的一种或多种抗体可以用于治疗心脏病、中风、心脏病发作、高胰岛素血症、高血压、冠状动脉疾病、偏头痛或与肥胖或颅高血压直接有关的头痛、充血性心力衰竭、瘤形成、血脂异常、贫血、胆囊疾病、骨关节炎、退行性关节炎、退行性椎间盘(degenerative disc)、退行性关节疾病、关节置换、加速的退行性关节疾病、哮喘、复发性肺炎、复发性胸膜炎、复发性支气管炎、肺限制、胃食管返流(gerd)、面毛和体毛过多(多毛症)、疹、慢性皮肤感染、过度出汗、频繁的酵母感染、压迫性尿失禁、月经失调、激素异常、多囊卵巢、不育、癌(例如,乳房、结肠和子宫癌)、睡眠呼吸暂停、假脑瘤、抑郁症、心理学/性功能病症、社会歧视和早产儿死亡。

[0331] 在某些实施方案中,本公开内容提供了一种用在治疗方法中的抗体。例如,且不作为限制,本公开内容提供了用在治疗具有代谢病症(例如,PCOS、MetS、肥胖、NASH、NAFLD、高脂血症、高血压、II型糖尿病、非II型糖尿病、I型糖尿病、LAD、MODY和老龄化及有关的疾病诸如阿尔茨海默氏病、帕金森病和ALS)的受试者的方法中的抗体,例如,抗-KLB/抗-FGFR1双特异性抗体,所述方法包括给所述个体施用有效量的本文中公开的抗体。在某些实施方案中,本公开内容提供了用在治疗具有上述疾病或病症的受试者的方法中的抗体,例如,抗-KLB/FGFR1双特异性抗体,所述方法包括给所述个体施用有效量的所述抗体。

[0332] 在某些实施方案中,所述方法还可以包括给所述受试者施用有效量的至少一种另外的治疗剂。下面描述了另外的治疗剂的非限制性例子,例如,第二治疗剂。

[0333] 在某些实施方案中,本公开内容还提供了一种用于诱导重量减轻的方法,所述方法包括给个体施用有效量的一种或多种本公开内容的抗体,例如,抗-KLB/FGFR1双特异性抗体。

[0334] 在本文中互换使用的“个体”、“患者”或“受试者”表示哺乳动物。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诸如猴),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。

[0335] 本文公开的主题还提供了用于活化KLB/FGFR1c共受体复合物(例如,在受试者中)的抗体,例如,抗-KLB/抗-FGFR1双特异性抗体。例如,且不作为限制,所述抗-KLB/抗-FGFR1双特异性抗体可以是抗-KLB/抗-FGFR1c双特异性抗体。在某些实施方案中,本公开内容提供了用在活化受试者中的KLB/FGFR1c共受体复合物的方法中的抗体,例如,抗-KLB/抗-FGFR1双特异性抗体。在某些实施方案中,所述方法包括给所述受试者施用有效量的抗体以活化KLB/FGFR1c受体复合物。

[0336] 本公开内容的抗体可以单独地或与其它药剂联合地用在治疗中。例如,且不作为限制,本公开内容的抗体可以与至少一种另外的治疗剂一起共同施用。在某些实施方案中,所述第二种/另外的治疗剂可以包括抗糖尿病剂、抗-肥胖剂或用于代谢病症的药物,例如,但不限于,抗高血压药和他汀类药物。第二种/另外的治疗剂的非限制性例子包括二甲双胍、吡格列酮、DPP4i、GLP1-类似物、磺酰脲、胰岛素、瘦素-类似物和氯卡色林(例如, BELVIQ[®])。

[0337] 本公开内容还提供了抗体(例如,抗-KLB/抗-FGFR1双特异性抗体)在药物生产或

制备中的用途。在某些实施方案中,所述药物用于治疗上面公开的代谢病症。在某些实施方案中,本公开内容提供了抗体在制备药物中的用途,所述药物用于治疗肥胖。在某些实施方案中,本公开内容提供了抗体在制备药物中的用途,所述药物用于治疗II型糖尿病。在某些实施方案中,所述方法还包括给所述个体施用有效量的至少一种另外的治疗剂,例如,如本文中所述的。在某些实施方案中,所述药物用于活化KLB/FGFR1c共受体复合物。在某些实施方案中,所述药物可以用在活化个体的KLB/FGFR1c共受体复合物的方法中,所述方法包括给所述个体施用有效地活化KLB/FGFR1c受体复合物的量的药物。

[0338] 在某些实施方案中,用在公开的治疗方法中的抗体可以存在于药物组合物中。在某些实施方案中,所述药物组合物可以包括药学上可接受的载体。在某些实施方案中,所述药物组合物可以包括一种或多种本公开内容的抗体。

[0339] 额外地或可替换地,所述药物组合物可以包括第二治疗剂。当一种或多种公开的抗体与另一种治疗剂一起施用,所述一种或多种抗体和其它治疗剂可以以任一种次序或同时地施用。上面指出的这样的联合治疗包括组合施用(其中将两种或更多种治疗剂包括在相同制剂或单独制剂中)和分开施用,在后一种情况下,本公开内容的抗体的施用可以发生在另外的治疗剂或试剂的施用之前、同时和/或之后。在一个实施方案中,本公开内容的抗体的施用和另外的治疗剂的施用发生在彼此的约1个月内,或在约1、2或3个周内,或在约1、2、3、4、5或6天内。

[0340] 本公开内容的抗体(和任何另外的治疗剂)可以通过任意合适的方式施用,包括胃肠外、肺内和鼻内施用,并且,如果需要局部治疗,病灶内施用。胃肠外输注包括肌肉内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下施用。定量给药可以通过任意适当的途径,例如通过注射,诸如静脉内或皮下注射,部分地取决于施用是否是短暂的或长期的。各种定量给药计划包括但不限于在不同时间点单次或多次施用,推注施用,并且在本文中预见到脉冲输注。

[0341] 以与良好医学实践一致的方式,配制、定量给药和施用本公开内容的抗体。在该背景下考虑的因素包括正在治疗的特定病症、正在治疗的特定哺乳动物、个体患者的临床状况、病症的起因、药剂的递送位点、施用方法、施用调度和医学从业人员已知的其它因素。抗体不需要、但任选地与一种或多种当前用于预防或治疗讨论的病症的药剂一起使用。这样的其它药剂的有效量取决于存在于所述制剂中的抗体的量,病症或治疗的类型,和上文讨论的其它因素。这些通常以相同剂量并且以本文所述的施用途径使用,或以本文所述的剂量的约1至99%、或以经验上/临床上确定为合适的任意剂量和任意途径使用。

[0342] 为了预防或治疗疾病,本公开内容的抗体(当单独地或与一种或多种其它另外的治疗剂联合使用时)的适当剂量将取决于要治疗的疾病的类型、抗体的类型、疾病的严重程度和进程、施用抗体是否为了预防或治疗目的、以前的治疗、患者的临床史和对抗体的应答、以及主治医师的判断。在某些实施方案中,可以根据需要施用本公开内容的抗体。在某些实施方案中,可以一次性地或在一系列治疗中将所述抗体施用给患者。例如,但不作为限制,可以每天2次、每天1次、每2天1次、每3天1次、每4天1次、每5天1次、每6天1次、每周1次、每2周1次、每3周1次、每个月1次、每2个月1次、每3个月1次、每6个月1次、或每年1次将在本文中公开的抗体和/或含有所述抗体的药物制剂施用给受试者。

[0343] 在某些实施方案中,取决于疾病的类型和严重程度,约 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ 至 $15\text{mg}/\text{kg}$ (例如, $0.1\text{mg}/\text{kg}$ - $10\text{mg}/\text{kg}$)的抗体可以是用于施用给患者的最初候选剂量,例如,不论通过一次或

多次单独施用,还是通过连续输注。一个典型的日剂量可能是在约 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ 至 $100\text{mg}/\text{kg}$ 或更多的范围内,取决于上面提及的因素。在某些实施方案中,所述日剂量可以大于约 $100\text{mg}/\text{kg}$ 。在某些实施方案中,可以调节剂量以达到 $1-1000\mu\text{g}/\text{ml}$ 的血浆抗体浓度,和在某些方法中达到 $25-300\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0344] 对于在几天或更长时间内的重复施用,取决于病症,所述治疗通常持续至发生疾病症状的期望抑制。抗体的一种示例性剂量是在约 $0.05\text{mg}/\text{kg}$ 至约 $10\text{mg}/\text{kg}$ 的范围内。在某些实施方案中,可以将一剂或多剂约 $0.5\text{mg}/\text{kg}$ 、 $2.0\text{mg}/\text{kg}$ 、 $4.0\text{mg}/\text{kg}$ 或 $10\text{mg}/\text{kg}$ (或它们的任意组合)施用给患者。可替换地,可以将抗体作为持续释放制剂来施用,在该情况下,需要更低频率的施用。剂量和频率可以基于患者中抗体的半衰期而变化。在某些实施方案中,可以间歇地(例如,每周或每3周)施用这样的剂量(例如,使得患者接受约2至约20、或例如约6剂抗体)。可以施用最初的较高负荷剂量,继之以一个或多个较低剂量。

[0345] 在某些实施方案中,所述方法还可以包括监测受试者和确定治疗的有效性。例如,通过常规技术和测定可以容易地监测该治疗的进展。

[0346] IV. 药物制剂

[0347] 本文公开的主题还提供了药物制剂,其含有一种或多种如本文中所述的抗体和药学上可接受的载体。在某些实施方案中,所述药物组合物可以包括多种(例如,两种或更多种)本文公开的主题的抗体和/或其抗原结合部分的组合。在某些实施方案中,本公开内容的药物组合物可以包括一种或多种抗-KLB/抗-FGFR1双特异性抗体。

[0348] 在某些实施方案中,通过将具有期望纯度的抗体与一种或多种任选的药学上可接受的载体(Remington's Pharmaceutical Sciences第16版,Osol, A. 编(1980))组合,可以以低压冻干制剂或水溶液的形式制备公开的药物制剂。例如,但不作为限制,低压冻干的抗体制剂描述在美国专利号6,267,958中。在某些实施方案中,水性抗体制剂可以包括在美国专利号6,171,586和W02006/044908中描述的那些,后一种制剂包括组氨酸-乙酸盐缓冲液。在某些实施方案中,所述抗体可以具有大于约80%、大于约90%、大于约91%、大于约92%、大于约93%、大于约94%、大于约95%、大于约96%、大于约97%、大于约98%、大于约99%、大于约99.1%、大于约99.2%、大于约99.3%、大于约99.4%、大于约99.5%、大于约99.6%、大于约99.7%、大于约99.8%或大于约99.9%的纯度。

[0349] 药学上可接受的载体在采用的剂量和浓度对接受者而言通常是无毒的,且包括、但不限于:缓冲剂诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(诸如十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯化六甲双铵;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诸如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;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,诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水聚合物诸如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖类、二糖类和和其它碳水化合物类,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂诸如EDTA;糖类诸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇;形成盐的抗衡离子诸如钠;金属络合物(例如,锌-蛋白复合物);和/或非离子型表面活性剂,诸如聚乙二醇(PEG)。示例性的药学上可接受的载体在本文中还包括间质(interstitial)药物分散剂,诸如可溶性的中性活性的透明质酸酶糖蛋白(sHASEGP),例如,人可溶性的PH-20透明质酸酶糖蛋白,诸如rHuPH20 (HYLENEX[®], Baxter International, Inc.)。包括rHuPH20在内

的某些示例性sHASEGP和使用方法描述在美国专利公开号2005/0260186和2006/0104968中。在一个方面,将sHASEGP与一种或多种另外的糖胺聚糖酶(诸如软骨素酶)组合。

[0350] 所述载体可以适合用于静脉内、肌肉内、皮下、胃肠外、脊柱或表皮施用(例如,通过注射或输注)。取决于施用途径,可以将活性化合物(即,抗-KLB/抗-FGFR1双特异性抗体)包被在材料中以保护所述化合物免于酸的作用和可能灭活所述化合物的其它天然条件。

[0351] 本公开内容的药物组合物还可以在联合治疗中施用,即,与其它药剂组合。在某些实施方案中,本文中公开的药物组合物还可以含有超过一种对于正在治疗的特定适应症而言必要的活性成分,例如,具有不会不利地影响彼此的互补活性的那些。在某些实施方案中,所述药物制剂可以包括用于治疗第一种治疗剂所治疗的相同疾病的第二种活性成分。这样的活性成分适当地以对于预期目的而言有效的量联合存在。例如,且不作为限制,本公开内容的制剂还可以含有超过一种对于正在治疗的特定适应症而言必要的活性成分,优选具有不会不利地影响彼此的互补活性的那些。例如,可能合乎需要的是,还提供可用于治疗相同疾病的第二种治疗剂。这样的活性成分适当地以对于预期目的而言有效的量联合存在。

[0352] 可以通过本领域已知的多种方法施用本公开内容的组合物。施用的途径和/或模式随期望的结果而变化。可以用保护化合物免于快速释放的载体制备活性化合物,诸如控释制剂,包括植入物、透皮贴剂和微囊化的递送系统。可以使用可生物降解的、生物相容的聚合物,诸如乙烯醋酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。许多用于制备这样的制剂的方法描述在例如,Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, 编, Marcel Dekker, Inc., New York, 1978。在某些实施方案中,在美国食品和药品管理局的良好生产规范(GMP)条件下制备药物组合物。

[0353] 还可以制备含有公开的抗体的持续释放制剂。持续释放制剂的合适例子包括含有抗体的固体疏水聚合物的半透性基质,所述基质呈成形制品(例如薄膜或微胶囊)的形式。在某些实施方案中,活性成分可以包埋在例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊(例如,羟基甲基纤维素或明胶-微胶囊和聚-(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊)、胶态药物递送系统(例如,脂质体、白蛋白微球体、微乳液、纳米粒子和纳米胶囊)或大乳剂中。这样的技术公开在Remington's Pharmaceutical Sciences第16版, Osol, A. 编(1980)。

[0354] 为了通过某些施用途径施用本公开内容的抗体,可能必须用防止其失活的物质包被所述化合物,或与所述物质一起共同施用所述化合物。例如,所述化合物可以在适当的载体(例如,脂质体或稀释剂)中施用给受试者。药学上可接受的稀释剂包括盐水和缓冲水溶液。脂质体包括水包油包水CGF乳剂以及常规脂质体(Strejan等人,(1984) J. Neuroimmunol. 7:27)。

[0355] 药学上可接受的载体包括无菌水溶液或分散体和用于即时制备无菌可注射溶液或分散体的无菌粉剂。此类介质和物质用于药学活性物质的用途是本领域已知的。除了任何常规介质或试剂与活性化合物不相容的情况以外,预见到其在本公开内容的药物组合物中的用途。还可将补充性活性化合物掺入所述组合物中。

[0356] 治疗组合物典型地必须是无菌的,基本上等渗的,且在制备和贮存的条件是稳定的。可将所述组合物配制成为溶液、微乳剂、脂质体或其它适用于高药物浓度的有序结构。所述载体可以是含有例如水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)和它

们的合适混合物的溶剂或分散介质。可以维持适当的流动性,例如,通过使用包衣剂诸如卵磷脂通过维持所需的粒度(在分散系的情况下)和通过使用表面活性剂。在许多情况下,优选的是,在组合物中包含等渗剂,例如,糖、多元醇诸如甘露醇、山梨醇或氯化钠。可通过在所述组合物中包含延缓吸收的药剂(诸如单硬脂酸盐和明胶)而实现所述可注射组合物的延长吸收。

[0357] 可以如下制备无菌注射溶液:将所需量的一种或多种公开的抗体掺入根据需要含有上文所列举的一种成分或成分的组合的适当溶剂中,随后灭菌微滤,例如,通过穿过无菌过滤膜过滤。通常,通过将所述活性化合物掺入无菌媒介物来制备分散体,所述媒介物含有基本分散介质和来自上文列举的那些的所需其它成分。就用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末而言,优选的制备方法是从先前无菌过滤的活性成分和任何另外期望成分的溶液产生其粉末的真空干燥和冷冻干燥(低压冻干法)。

[0358] 还可以用本领域已知的医疗装置施用治疗组合物。例如,可以用无针皮下注射装置施用本公开内容的治疗组合物,诸如在例如美国专利号5,399,163、5,383,851、5,312,335、5,064,413、4,941,880、4,790,824或4,596,556中公开的装置。在本公开内容中有用的植入物和模块的例子包括:美国专利号4,487,603,其公开了用于以受控的速率分配药物的可植入的微量输液泵;美国专利号4,486,194,其公开了用于透过皮肤施用药物的治疗装置;美国专利号4,447,233,其公开了用于以精确的输注速率递送药物的输药泵;美国专利号4,447,224,其公开了用于连续药物递送的变速流可植入输注设备;美国专利号4,439,196,其公开了具有多室隔室的渗透药物递送系统;和美国专利号4,475,196,其公开了一种渗透药物递送系统。许多其它这样的植入物、递送系统和模块是已知的。

[0359] 对于治疗组合物,本公开内容的制剂包括适合用于口服、鼻、局部(包括含服和舌下)、直肠、阴道和/或胃肠外施用的那些。所述制剂可以方便地以单位剂型呈现,且可以通过药学领域已知的任意方法制备。可以与载体材料组合以产生单一剂型的抗体的量随正在治疗的受试者和特定施用模式而变化。可以与载体材料组合以产生单一剂型的抗体的量通常是产生治疗效果的组合物的量。通常,在100份中,该量范围是约0.01%至约99%的活性成分,约0.1%至约70%,或约1%至约30%。

[0360] 用于局部或透皮施用本公开内容的组合物的剂型包括粉剂、喷雾剂、软膏剂、糊剂、乳膏剂、洗剂、凝胶剂、溶液剂、贴剂和吸入剂。可以在无菌条件下将所述活性化合物与药学上可接受的载体和与可能需要的任何防腐剂、缓冲剂或推进剂混合。

[0361] 短语“胃肠外施用”和“胃肠外地施用”是指通常通过注射进行的除了肠内和局部施用以外的施用模式,并且包括、但不限于,静脉内、肌肉内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心内、真皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、椎管内、硬膜外和胸骨内的注射和输注。

[0362] 这些药物组合物还可以含有佐剂诸如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。通过上述灭菌程序以及通过包含各种抗细菌及抗真菌剂(例如,对羟基苯甲酸酯、三氯叔丁醇、苯酚山梨酸等),可以确保防止微生物的存在。也可能需要在组合物中包含等渗剂,诸如糖、氯化钠等。另外,通过包含延迟吸收的试剂(诸如单硬脂酸铝和明胶),可以实现可注射的药物形式的延长吸收。

[0363] 在某些实施方案中,当本公开内容的抗体作为药物施用给人类和动物时,它们可

以单独地或作为药物组合物来施用,所述药物组合物含有与药学上可接受的载体组合的例如约0.01%至约99.5%(或约0.1至约90%)的本文描述的抗体。

[0364] V. 制品

[0365] 本文公开的主题还涉及制品,其含有可用于治疗、预防和/或诊断上文所述的病症的材料。

[0366] 在某些实施方案中,制品包括容器和贴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例子包括瓶子、管形瓶、注射器、静脉内溶液袋等。所述容器可以由多种材料如玻璃或塑料形成。所述容器可以容纳单独的组合物或与另一种可有效地治疗、预防和/或诊断病症的组合物组合的组合物,且可以具有无菌入口(例如,容器可以是静脉内溶液袋或具有可被皮下注射针头刺穿的塞子的瓶子)。

[0367] 在某些实施方案中,组合物内的至少一种活性剂是本文公开的主题的抗体。所述标签或包装说明书可以指示,所述组合物用于治疗选择的病症。

[0368] 在某些实施方案中,所述制品可以包含(a)具有包含在其中的组合物的第一容器,其中所述组合物包含本公开内容的抗体;和(b)具有包含在其中的组合物的第二容器,其中所述组合物包含另一种细胞毒性治疗剂或其它的治疗剂。在某些实施方案中,所述制品还可以包含包装说明书,所述包装说明书指示所述组合物可以用于治疗特定病症。

[0369] 可替换地,或另外,所述制品还可以包含另外的容器(例如,第二或第三容器),所述容器包含药学上可接受的缓冲液,例如,但不限于,抑制细菌注射用水(BWFI)、磷酸盐缓冲盐水、林格氏溶液和葡萄糖溶液。所述制品可以包括从商业和用户观点看合乎需要的其它材料,包括其它缓冲液、稀释剂、过滤器、针头和注射器。

[0370] 以下实施例仅仅是本文公开的主题的示例,且不当以任何方式视作限制。

[0371] 实施例

[0372] 实施例1:抗-FGFR1激动剂抗体的表征

[0373] 以前描述了三种噬菌体衍生的抗-FGFR1抗体YW182.2(在本文中也称作“R1MAb1”)、YW182.3(在本文中也称作“R1MAb2”)和YW182.5(在本文中也称作“R1MAb3”)(WO 2012/158704,通过引用并入本文)。三种抗体中的每一种作为有效的FGFR1-选择性激动剂起作用,并在小鼠中表现出胰岛素敏化性能。

[0374] 为了进一步理解该激动活性,试验了这些抗体的Fab片段激动FGFR1c的能力。将HEK293细胞在Dulbecco氏改良的伊格尔培养基(DMEM)+10%胎牛血清(FBS)中培养,并使用FUGENE[®] HD Transfection Reagent (Roche)用编码Renilla萤光素酶(pRL-SV40, Promega)、FGFR1c、转录活化剂(pFA2-Elk1或pFA2-CREB, Stratagene)和由GAL4结合位点驱动的萤火虫萤光素酶报告分子(pFR-luc, Stratagene)的表达载体瞬时转染。在次日,将转染的细胞在无血清培养基和YW182.5 IgG中培养另外6-8h,并以递增的浓度试验YW182.2、YW182.3和YW182.5中的每一种。使用DUAL-GLO[®] Luciferase Assay System (Promega)和ENVISION[®] Multilabel Reader (PerkinElmer)确定细胞的萤光素酶活性。将萤火虫萤光素酶活性标准化至共表达的Renilla萤光素酶活性。令人惊奇地,YW182.2 Fab表现出激动活性,但是YW182.3 Fab或YW182.5 Fab没有(图1A)。

[0375] 图1B描绘了为探究YW182.2 Fab和YW182.3 Fab实现的FGFR1活化的差异的基础而

执行的结合竞争实验。相对于YW182.3(其具有高亲和力)和相对于较低亲和力抗-FGFR1抗体YW182.5,进一步表征了YW182.2。YW182.2和YW182.3两者都与YW182.5竞争对FGFR1细胞外结构域(ECD)的结合,从而指示所有3种抗体识别FGFR1的重叠区域。但是,如在图1B中所示,YW182.5的相对亲和力显著弱于($IC_{50}>30$ 倍)YW182.2和YW182.3的相对亲和力。

[0376] 图2A描绘了抗-FGFR1抗体YW182.2和YW182.3对FGFR1b和FGFR1c的结合亲和力。确定抗-FGFR1抗体的亲和力以评估抗-FGFR1抗体的亲和力差异是否解释在激动活性中观察到的差异。如在Liang等人,J.Mol.Biol.366(3):815-29(2007)中所述,经过以下修改,使用BIACORE®T100仪器执行Fab对FGFR1b或FGFR1c的结合亲和力。首先按照生产商描述的操作,使用直接偶联至游离氨基,将小鼠抗-人Fc抗体包被在BIAcore羧甲基化的葡聚糖CM5芯片上。然后将YW182.2或YW182.3捕获在CM5生物传感器芯片上以达到大约200个应答单位(RU)。使用由10mM HEPES pH 7.4、150mM NaCl、0.005%表面活性剂P20组成的运行缓冲液(HBS-P缓冲液)执行结合测量。在25°C在30 μ L/分钟的流速注射在HBS P缓冲液中在1.5-50nM范围内的FGFR1c ECD-His蛋白的2倍稀释系列。使用简单的一对一Langmuir结合模型(Biacore评价软件3.2版),计算缔合速率(K_{on} ,每mol/s)和解离速率(K_{off} ,每s)。可以将平衡解离常数(K_d ,每mol)计算为比率 k_{off}/k_{on} 。如在图2A中所示,观察到YW182.2和YW182.3的亲和力是非常类似的,从而指示所述亲和力不能解释两种抗体的激动活性之间的差异。

[0377] 图2B显示了YW182.5(R1MAb3)与FGFR1特异性地相互作用的能力。象YW182.2和YW182.3一样,YW182.5通过ELISA显示出与FGFR1的特异性结合(图2B)。

[0378] 图2C描绘了使用基于GAL-ELK1(ETS-样转录因子1)的萤光素酶测定,YW182.5对L6细胞中的各种FGFR的激动活性。对于萤光素酶测定,使用FuGENE HD Transfection Reagent(Promega),用编码适当受体(在CMV-启动子下)、Renilla萤光素酶(pRL-SV40,Promega)、GAL-ELK1转录活化剂融合体(pFA2-ELK1,Agilent)和由GAL4结合位点驱动的萤火虫萤光素酶报道分子(pFR-luc,Agilent)的表达载体瞬时转染HEK293T或大鼠L6细胞。在次日,将转染的细胞在含有不同浓度的适当蛋白配体的无血清的基于DMEM的培养基中培养另外6-8小时。使用Dual-Glo Luciferase Assay System(Promega)和EnVision Multilabel Reader(PerkinElmer),确定细胞的萤光素酶活性。将萤火虫萤光素酶活性标准化至共表达的Renilla萤光素酶活性,并显示为平均值 \pm SEM。类似于YW182.2和YW182.3,YW182.5充当L6细胞中的FGFR1的特异性激动剂(图2C)。

[0379] 使用上述的基于GAL-ELK1的萤光素酶测定,在HEK293细胞中进一步试验了YW182.5的激动活性。如在图2D中所示,YW182.5也在基于GAL-ELK1的萤光素酶测定中充当HEK293细胞中的FGFR1c的特异性激动剂。

[0380] 图2E显示了YW182.5对糖尿病小鼠模型中的血糖水平的影响。为了确定血糖水平,从Jackson Laboratory购买小鼠并在21°C在标准的12h光照/12h黑暗循环下维持在无病原体的动物设备中,随意接近食物(LABDIET®5010)和水。在C57BLKS/J背景中的db/db小鼠是雌性的,且其它小鼠都是雄性的。对于高脂肪饮食饲喂,使用高脂肪、高碳水化合物饮食(Harlan Teklad TD.03584,58.4%卡路里来自脂肪)。通过COBAS INTEGRA®400 Chemistry Analyzer(Roche)确定血清无机磷酸盐和钙水平。通过ELISA(Immutopics)确定血清FGF23水平。通过CONTOUR®葡萄糖计(Bayer)确定血糖水平。对于肝脂质分析,使

用甘油三酯定量试剂盒 (MBL International)。通过比色测量测定,确定血清总胆固醇、甘油三酯、 β -羟基丁酸盐 (Thermo DMA) 和游离脂肪酸 (Roche)。使用ELISA确定血清胰岛素水平 (Crystal Chem)、血清FGF23 (Immutopics)、血清小鼠HMW脂连蛋白 (Alpco) 和血清猴HMW脂连蛋白 (R&D systems)。通过放射免疫测定 (Vanderbilt Hormone Assay&Analytical Services Core), 测量皮质酮。除了klb-缺陷型小鼠 (其在7-8月龄用在某些实验中) 以外, 所有用于注射的小鼠是约2-4月龄。以与YW182.2和YW182.3类似的方式, 当注射进糖尿病ob/ob小鼠中时, YW182.5使血糖水平正常化 (图2E)。

[0381] 实施例2: 抗-FGFR1抗体的表位作图

[0382] FGFR1 ECD由称作D1至D3的三个Ig-样结构域组成。如在图1C中所示, 两个不重叠的肽 (P26:KLHAVPAAKTVKFKCP (SEQ ID NO:143) 和P28:FKPDHRIGGYKVRY (SEQ ID NO:144) 存在于FGFR1的D2结构域内, 且在以前被鉴别为结合YW182.2和YW182.3两者 (WO 2012/158704, 通过引用并入本文)。

[0383] 为了鉴别这些肽中的哪个残基最负责抗体结合, 在HEK293细胞中表达了在鉴别的表位区域内具有不同丙氨酸置换的全长FGFR1蛋白, 并通过蛋白质印迹试验了抗体结合。如在图1D中所示, 在K175、K177、Y205、R208中的丙氨酸置换消除了YW182.2和YW182.5的结合, 没有影响表达, 如通过针对D1结构域 (抗-D1) 的抗-FGFR1所探测的。YW182.3的结合被R208A消除, 但是没有被K175、K177或Y205置换消除。

[0384] 使用上述的GAL-ELK1测定, 试验了所述抗体在体内活化FGFR1的丙氨酸置换突变体的能力。发现活化与这些突变体对每种抗-FGFR1抗体的结合性能较好地相关 (图1E)。这些结果提示, 在D2结构域内的类似氨基酸集合是YW182.2和YW182.5结合所需的 (尽管具有不同的亲和力), 而在相同区域中的不同氨基酸集合对于YW182.3结合而言是重要的。

[0385] 以前已经描述了2:2FGFR ECD/FGF复合物的晶体结构 (Plotnikov等人, Cell 98 (5):641-50 (1999))。在2:2同源二聚体FGFR1c ECD/FGF2结构中, 一个D2结构域与另一个D2结构域相互作用, 每个FGF2结合来自两侧的两个D2结构域以稳定D2二聚体 (图1F)。在这些结构中, 对于YW182.2和YW182.5结合而言重要的丙氨酸置换 (K175、K177、Y205和R208) 位于D2二聚体的内部。由于YW182.2 Fab充当激动剂, 这提示, YW182.2 Fab可能结合同时来自该侧的两个D2结构域以稳定D2二聚体, 基本上充当FGF配体的分子模拟物。基于丙氨酸置换分析, 除了亲和力远远低于YW182.2 Fab以外, YW182.5 Fab可能类似地结合。

[0386] 实施例3: 抗-KLB抗体的分离和表征

[0387] 用稳定地表达hFGFR1c和hKLB蛋白的HEK293细胞免疫Balb/c小鼠。在12周以后收获脾, 并制备杂交瘤。使用用于免疫接种的HEK293细胞, 通过FACS分析鉴别生产抗-hKLB抗体的杂交瘤。简而言之, 将表达单独hKLB、单独hFGFR1或二者的293细胞用稀释的杂交瘤上清液和在FACS缓冲液 (0.5% BSA在PBS中的溶液) 中的PE-缀合的山羊抗-小鼠IgG抗体 (Jackson Labs) 染色。使用相同的FACS缓冲液洗涤染色的细胞。通过FACSscan (Becton Dickinson) 和FlowJo FACS分析软件 (Tree Star) 分析染色的细胞。将编码IgG重链和轻链的cDNA克隆进表达载体中。所有重组单克隆抗体分子在瞬时转染的中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞中产生并使用常规柱色谱法纯化。

[0388] 鉴别了大约20个不同的生产抗-KLB抗体的杂交瘤。这些抗-KLB抗体中的16个的CDR轻链和重链序列显示在表2和3中。这些抗-KLB抗体中的16个以及8C5的轻链序列显示在

图3A中 (11F1、6D12、11D4、8E1、46C3、8H7、21H3、25F7、14E6、14C6、24A1、5F8、6C1、12A1、12B8、14C10和8C5;分别是SEQ ID NO:111-127)。

[0389] 这些抗-KLB抗体中的16个以及8C5的重链序列显示在图3B中 (11F1、6D12、11D4、8E1、46C3、8H7、21H3、25F7、14E6、14C6、24A1、5F8、6C1、12A1、12B8、14C10和8C5;分别是SEQ ID NO:94-110)。

[0390] 表2. 鼠抗-KLB单克隆抗体的CDR H序列。

抗体	CDR H1	CDR H2	CDR H3
11F1	SYGIS (SEQ ID NO: 1)	TVSSGGRYTYYPDSVKG (SEQ ID NO: 16)	GGDGYALDY (SEQ ID NO: 32)
6D12	DYYMN (SEQ ID NO: 2)	WIDPENDDTIYDPKFQG (SEQ ID NO: 17)	FTTVFAY (SEQ ID NO: 33)
11D4	NYGVS (SEQ ID NO: 3)	VIWGDGSINYHSALIS (SEQ ID NO: 18)	THDWFDY (SEQ ID NO: 34)
8E1	DTYMN (SEQ ID NO: 4)	RIDPSNGNAKYDPKFQG (SEQ ID NO: 19)	RALGNGYALGY (SEQ ID NO: 35)
[0391] 46C3	DTYIH (SEQ ID NO: 5)	RIDPANGNTKYDPKFQD (SEQ ID NO: 20)	GTSYSWFAY (SEQ ID NO: 36)
8H7	SYWIH (SEQ ID NO: 6)	EIDPSVSNNSNYNQKFKG (SEQ ID NO: 21)	LGVMVYGSSPFWFAY (SEQ ID NO: 37)
21H3	SYWIH (SEQ ID NO: 6)	EIDPSVSNNSNYNQKFKG (SEQ ID NO: 21)	LGVMVYGSSPFWFAY (SEQ ID NO: 37)
25F7	DTFTH (SEQ ID NO: 7)	RIDPSNGNTKYDPKFQG (SEQ ID NO: 22)	RALGNGYAMDY (SEQ ID NO: 38)
14E6	EYTMN (SEQ ID NO: 8)	GINPNNGETSYNQKFKG (SEQ ID NO: 23)	KTTNY (SEQ ID NO: 39)
14C6	SYWIE (SEQ ID NO: 9)	EIFPGGGSTIYNENFRD (SEQ ID NO: 24)	RGYYDAAWFDY (SEQ ID NO: 40)
24A1	DYEMH (SEQ ID NO: 10)	AIWPENADSVYNQKFKG (SEQ ID NO: 25)	EGGNY (SEQ ID NO: 41)
5F8	DTYIH (SEQ ID NO: 11)	RIDPANGNTKYDPKFQG (SEQ ID NO: 26)	SGNYGAMDY (SEQ ID NO: 42)
6C1	SYWIE (SEQ ID NO: 9)	EILPGSDSTKYVEKFKV (SEQ ID NO: 27)	GGYHYPGWLVIY (SEQ ID NO: 43)
[0392] 12A11	RYWMS (SEQ ID NO: 12)	EISPDSSTINYTPSLKD (SEQ ID NO: 28)	PSPALDY (SEQ ID NO: 44)
12B8	NYGMN (SEQ ID NO: 13)	WIDTDTGEATYTDDFKG (SEQ ID NO: 29)	EEYGLFGFPY (SEQ ID NO: 45)
14C10	TSAMGIG (SEQ ID NO: 14)	HIWWDKDKRYNPALKS (SEQ ID NO: 30)	IDGIYDGSFYAMDY (SEQ ID NO: 46)
8C5	TYGVH (SEQ ID NO: 15)	VIWSSGGSTDYNAAFIS (SEQ ID NO: 31)	DYGSTYVDAIDY (SEQ ID NO: 47)

[0393] 表3. 鼠抗-KLB单克隆抗体的CDR L序列。

抗体	CDR L1	CDR L2	CDR L3
11F1	SASQVISNYLN (SEQ ID NO: 48)	FTSSLRS (SEQ ID NO: 63)	QQYSKLPWT (SEQ ID NO: 79)
6D12	SASSSGRYTF (SEQ ID NO: 49)	DTSKLAS (SEQ ID NO: 64)	FQGTGYPLT (SEQ ID NO: 80)
11D4	RASQDISNYFN (SEQ ID NO: 50)	YTSRLQS (SEQ ID NO: 65)	HQVRTLPWT (SEQ ID NO: 81)
8E1	KASDHINWLA (SEQ ID NO: 51)	GTTNLET (SEQ ID NO: 66)	QQYWNTPFT (SEQ ID NO: 82)
46C3	RSSQNIVHSDGNTYLE (SEQ ID NO: 52)	KVSNRFS (SEQ ID NO: 67)	FQGSHVLT (SEQ ID NO: 83)
8H7	KASQFVSDAVA (SEQ ID NO: 53)	SASYRYT (SEQ ID NO: 68)	QQHYIVPYT (SEQ ID NO: 84)
21H3	KASQFVSDAVA (SEQ ID NO: 53)	SASYRYT (SEQ ID NO: 68)	QQHYIVPYT (SEQ ID NO: 84)
25F7	KASDHINWLA (SEQ ID NO: 51)	GASNLET (SEQ ID NO: 69)	QQYWNTPFT (SEQ ID NO: 82)
14E6	RASQEISGYLS (SEQ ID NO: 54)	AASTLDS (SEQ ID NO: 70)	LQYGSYPWT (SEQ ID NO: 85)
14C6	SASSLSSSYLY (SEQ ID NO: 55)	GASNLAS (SEQ ID NO: 71)	HQWSSYPLT (SEQ ID NO: 86)
24A1	KSSQSLNNSGNQKNSLA (SEQ ID NO: 56)	LASTRES (SEQ ID NO: 72)	QQHHSTPYT (SEQ ID NO: 87)
5F8	RASSSVNHMY (SEQ ID NO: 57)	YTSTLAP (SEQ ID NO: 73)	QQFTISPSMYT (SEQ ID NO: 88)
6C1	KASQNVDSYVA (SEQ ID NO: 58)	SASYRFS (SEQ ID NO: 74)	QQYNISPYT (SEQ ID NO: 89)
12A11	RASQSIDYVY (SEQ ID NO: 59)	YASQSIG (SEQ ID NO: 75)	QNGHNFYPT (SEQ ID NO: 90)
12B8	KASEDIYNRLA (SEQ ID NO: 60)	AATSLET (SEQ ID NO: 76)	QQYWSNPLT (SEQ ID NO: 91)
14C10	RASESVDSYGNSFMH (SEQ ID NO: 61)	RASNLES (SEQ ID NO: 77)	QQSNEDYT (SEQ ID NO: 92)
8C5	RASESVESYGNRYMT (SEQ ID NO: 62)	RAANLQS (SEQ ID NO: 78)	QQSNEDPWT (SEQ ID NO: 93)

[0396] 基于在FACS图(在0.8 μ g/ml,测量所述抗体与表达hKLB的293细胞的结合)中观察到的中间转移,将大多数杂交瘤衍生的抗-KLB抗体以及一个噬菌体衍生的抗体(命名Ph#5,其使用重组hKLB-ECD-HIS蛋白(R&D Systems)通过噬菌体淘选得到)排序(图4)。

[0397] 另外,将一些抗体通过ELISA排序。对于这些实验,使用抗-KLB抗体(其为具有鼠可变区和hIgG1恒定区的嵌合重组IgG)测量与hKLB-ECD-HIS蛋白的结合。除了14E6(其似乎在ELISA条件下比在FACS分析中更好地结合)以外,试验的抗体的相对结合是类似的(图5)。

[0398] 实施例4:抗-KLB抗体的KLB结合

[0399] 为了试验各种抗-KLB抗体之间的竞争,使用了ELISA。在一些实验中,将从杂交瘤上清液纯化的与6D12、8C5和11F1对应的IgG抗体使用EZ-联NHS-PEO Solid Phase Biotinylation Kit(Pierce)生物素化。在有不同浓度的杂交瘤衍生的抗-KLB存在下,使用

HRP-缀合的抗生蛋白链菌素试验与KLB-ECD-HIS蛋白的结合。在一些实验中,在有不同浓度的杂交瘤衍生的抗-KLB存在下,使用HRP-缀合的抗-人IgG (Jackson ImmunoResearch Inc.) 试验了重组人IgG与KLB-ECD-HIS蛋白的结合。观察到,11F1、11D4、8E1和46C3都没有与6D12竞争结合(其它对象没有针对6D12进行试验)。抗-KLB抗体14E6和12A11与8C5竞争结合,但是11D4和14C10没有(其它对象没有针对8C5进行试验),且11D4与11F1竞争结合,但是6D12、8E1和46C3没有(其它对象没有针对11F1进行试验)。

[0400] 实施例5:抗-KLB抗体的物种间交叉反应性

[0401] 使用来自小鼠、大鼠、兔、食蟹猴和恒河猴的KLB cDNA (其克隆进pRK哺乳动物表达载体中,瞬时转染进HEK293T细胞中),通过FACS分析,分析了公开的抗-KLB抗体的物种交叉反应性。表达的KLB细胞外结构域多肽序列如下:

[0402] 小鼠:

FSGDGKAIWDKKQYVSPVNPSQLFLYDTFPKNFSWGVGTGAFQVEGS
 WKTDGRGPSIWDRYVYSHLRGVNGTDRSTDSYIFLEKDLLALDFLGVSFYQFS
 ISWPRLFPNGTVA AVNAQGLRYRALLDSLVLRNIEPIVTLYHWDLPLTLQEE
 YGGWKNATMIDLFNDYATYCFQTFGDRVKYWITIHNPYLVAWHGFGTGMH
 APGEKGNLTA VYTVGHNLKAHASKVWHNYDKNFRPHQKGWLSITLGSHWIE
 PNRTDNMEDVINCQHSMSSVLGWFANPIHGDGDYPEFMKTGAMIPEFSEAEK
 EEVRGTADFFAFSFGPNNFRPSNTVVKMGQNVSLNLRQVLNWKILEYDDPQIL
 ISENGWFTDSYIKTEDTTAIYMMKNFLNQVLQAIKFDEIRVFGYTAWTLLDGF
 EWQDAYTTRRGLFYVDFNSEQKERKPKSSAHYYKQIIQDNGFPLKESTPDMK
 [0403] GRFPCDFSWGVTE SVLKPEFTVSSPQFTDPHLYVWNVTGNRLLYRVEGVRLK
 TRPSQCTDYVSIKKRVEMLAKMKVTHYQFALDWTSILPTGNLSKVNQRVRLY
 YRCVVSEGLKLGVPMTLYHPTSHLGLPLLLSSGGWLNMTAKAFQDY
 AELCFRELGDLVKLWITINEPNRLSDMYNRTSNDTYRAAHNLMIAHAQVWHL
 YDRQYRPVQHGA VSLSLHCDWAEPANPFVDSHWKAAERFLQFEIAWFADPL
 FKTGDYPSVMKEYIASKNQRGLSSSVLPRFTAKESRLVKGTVDIFYALNHFTTR
 FVIHKQLNTNRSVADRDVQFLQDITRLSSPSRLAVTPWGVKLLAWIRRNRYRD
 RDIYITANGIDDLALEDQIRKYYLEKYVQEALKA YLIDKVKIKGYAFKLTEE
 KSKPRFGFFTSDFRAKSSVQFYSKLISSGLPAENRSPACGQPAEDTDCTICSFL
 V (SEQ ID NO: 158).

[0404] 大鼠 (+N-ter FLAG):

DYKDDDDKLEFSGDGKAIWDKKQYVSPVNPGLFLYDTFPKNFSWG
VGTGAFQVEGSWKADGRGPSIWDRIYVDSHLRGNSTDRSTDSYVFLEKDLL
ALDFLGVSFYQFSISWPRLFPNGTVA AVNAKGLQYYRALLDSLVLRNIEPIVTL
YHWDLPLTLQEEYGGWKNATMIDLFNDYATYCFQTFGDRVKYWITIHNPYL
VAWHGFGTGMHAPGEKGNLTA VYTVGHNLKAHASKVWHNYDKNFRPHQK
GWL SITLGS HWIEPNRTENMEDVINCQHSMSV LGWFANPIHGDGDYPEFMK
TSSVIPEFSEAEKEEVRGTADFFAFSFGPNFRPSNTVVKMGQNVSLNLRQVL
NWIKLEYDNPRILISENGWFTDSYIKTEDTTAIYMMKNFLNQVLQAIKFDEIQV
FGYTAWTLLDGF EWQDAYTTRRGLFYVDFNSEQKERKPKSSAHYYKQIIQDN
[0405] GFPLQESTPDMKGGQPCDFSWGVTESVLKPEFTVSSPQFTDPHLYVWNVTGN
RLLYRVEGVRLKTRPSQCTDYVSIKKRVEMLAKMKVTHYQFALDWT SILPTG
NLSKINRQVLRYRVCVSEGLKLGISPMVTLYHPTHSHLGLPMPLSSGGWLN
TNTAKAFQDYAGLCFKELGDLVKLWITINEPNRLSDMYNRTSNDTYRAAHLN
MIAHAQVWHL YDRQYRPVQHGA VSLSLHSDWAEPANPYVESHWKA AERFL
QFEIAWFADPLFKTGDYPLAMKEYIASKKQ RGLSSSVLPRFTL KESRLVKG TID
FYALNHFTTRFVIHKQLNTNCSVADRDVQFLQDITRLSSPSRLAVTPWGM RKL
LGWIRRN YRDMDIYVTANGIDDLALED DQIRKYYLEKYVQEAL KAYLIDKVK
IKGYYAFKLTEEKSKPRFGFFTSDFKAKSSVQFYSKLISSSGFSSENRSPACGQP
PEDTECAICSFLT (SEQ ID NO: 147).

[0406] 兔(+N-ter FLAG) :

DYKDDDDKLDFFPGDGRAVWSQNPNLSPVNESQLFLYDTFFPKNFFWGV
GTGAFQVEGSWKKDGKGLSVWDHFIATHLNVSSRDGSSDSYIFLEKDLALSALD
FLGVSFYQFSISWPRLFDPDGTVAVANAKGLQYYNRLLDSLLLRNIEPVVTLYH
WDLPWALQEKEYGGWKNETLIDLFDYATYCFQTFGDRVKYWITIHNPYLVA
WHGYGTGLHAPGEKGNVAAVYTVGHNLLKAHASKVWHNYNRNFRPHQKGW
LSITLGSHWIEPNRAESIVDILKCQQSMVSVLGFANPIHGDGDYPEVMTKKL
LSVLPAFSEAEKNEVRGTADFFAFSFGPNNFKPLNTMAKMGQNVSLNLRQVL
NWIKLEYGNPRILIAENGWFTDSYVQTEDTTAIYMMKNFLNQVLQAIRLDGV
RVFGYTAWSLLDGFEWQDAYNTRRGLFYVDFNSEQRERRPKSSAHYYKQVI
[0407] GENGFTLREATPDLQGGQPCDFSWGVTESVLKPESVASSPQFSDPHLYVWNA
TGNRMLHRVEGVRLKTRPAQCTDFITIKKQLEMLARMKVTHFRFALDWASV
LPTGNLSEVNRQALRYRRCVVTEGLKLNISPMVTLYYPHTAHLGLPAPLLHSG
GWLDPSTAKAFRDYAGLCFRELGDLVKLWITINEPNRLSDVYNRTSNDTYQA
AHNLLIAHAIVWHL YDRQYRPSQRGALSLSLHSDWAEPANPYVASHWQAAE
RFLQFEIAWFAEPLFKTGDYPVAMREYIASKTRRGLSSSVLPRFSDAERRLVK
GAADFYALNHFTTRFVMHEQQNGSR YDSDRDVQFLQDITRLASPSRLAVMP
WGEGKLLRWMRNNYGDLDVYITANGIDDQALQNDQLRQYYLEKYVQEALK
AYLIDKIKIKGYYAFKLTEEKSKPRFGFFTSDFKAKSSIQFYNKLITSNGFPSEN
GGPRCNQTQGNPECTVCLLLL (SEQ ID NO: 148).

[0408] 食蟹猴 (+N-ter FLAG) :

DYKDDDDKLEFSGDGRAVWSKNPNFTPVNESQLFLYDTFPKNFFWGV
GTGALQVEGSWKKDGKGPSIWDHFVHHLKNVSSTNGSSDSYIFLEKDL
DFIGVSFYQFSISWPRLFPDGIVTVANAKGLQYYNTLLDSLVL
RNIPIVTLYH
WDLPLALQEKEYGGWKNNDTIIDIFNDYATYCFQTFGDRV
KYWITIHNPYLVAW
HGYGTGMHAPGEKGNLAAVYTVGHNLKAH
SKVWHNYNTHFRPHQKGWLS
ITLGS
HWIEPNRSENTMDILK
CQQSMVSVL
GWFASPIHGDGDY
PEGMKKKLLS
ILPLFSEAEKNEVRGTADFFAFSFGPNNFKPLNTMAKMGQNV
SLNLREALNWI
KLEYNNPRILIAENGWFTDSHVKTEDTTAIYMMKNFLSQVLQ
AIRLDEIRVFG
YTAWSLLDGFEWQDAYTIR
RGLFYVDFNSKQKERKPKSSAHYKQIIRENGFS
[0409] LKEATPDVQGGQFPCDFSWGVTESVLKPE
SVASSPQFSDPYLYVWNATGNRLL
HRVEGVRLKTRPAQCTDFVNIKKQLEMLARMKVTHYRFALD
WASVLP
TGNLSAVNRQALRYR
CVVSEGLKLGISAMV
TLYYP
THAHLGLPEPLHAGGWLNP
STVEAFQAYAGLCFQELGDLV
KLWITINEPNRLSDIYNRSGNDTYGAAHNLLV
AHALAWRLYDRQFRPSQ
RGAVSLSLHADWAEPANPYADSHWRAAERFLQFE
IAWFAEPLFKTGDYPAAMREYIASKHRRGLSSSALPRLTEAER
LLKGTVDFC
ALNHFTTRFVMHEQLAGSR
YDSDRDIQFLQDITRLSSP
TRLAVIPWGV
RKLLRWVRRNYGDMDIYITASGIDDQALEDDRLRKYYLEKYLQ
EVLKAYLIDK
VRIKGYAFKLAEEKSKPRFGFFTSDFKAKSSIQFY
NKMISSSGFPSENSSSRCSQTQ
KNTECTVCLFLA (SEQ ID NO: 149).

[0410] 恒河猴 (+N-ter FLAG) :

DYKDDDDKLEFSGDGRAVWSKNPNFTPVNESQLFLYDTFFPKNFFWGV
 GTGALQVEGSWKKDGKGPSIWDHFVHTHLKNVSSTNGSSDSYIFLEKDLSAL
 DFIGVSFYQFSISWPRLFPDGIVTVANAKGLQYYNALLDSLVLRNIEPIVTLYH
 WDLPLALQEKEYGGWKNNDTIIDIFNDYATYCFQTFGDRVKYWITIHNPYLVAW
 HGYGTGMHAPGEKGNLAAVYTVGHNLKAHASKVWHNYNTHFRPHQKGWLS
 ITLGSHWIEPNRSENTMDILKCQQSMVSVLGFANPIHGDGDYPEGMKKKLL
 SILPLFSEAEKNEVRGTADFFAFSFGPNNFKPLNTMAKMGQNVSLNLREALN
 WIKLEYNNPQILIAENGWFTDSHVKTEDTTAIYMMKNFLSQVLQAIRLDEIRVF
 GYTAWSLLDGFEWQDAYTIRRGFLFYVDFNSKQKERKPKSSAHYYKQIIRENG
 [0411] FSLKEATPDVQGGQFPCDFSWGVTESVLKPESVASSPQFSDPYLYVWNATGNR
 LLHRVEGVRLKTRPAQCTDFVNIKKQLEMLARMKVTHYRFALDWASVLPTG
 NLSAVNRQALRYRCVVSEGLKLGISAMVTLYYPHTAHLGLPEPLHAGGWL
 NPSTVEAFQAYAGLCFQELGDLVKLWITINEPNRLSDIYNRSGNDTYGAAHNL
 LVAHALAWRLYDRQFRPSQRGAVSLSLHADWAEPANPYADSHWRAAERFL
 QFEIAWFAEPLFKTGDYPAAMREYIASKHRRGLSSSALPRLTEAERRLLKGTV
 DFCALNHFTTRFVMHEQLAGSRYDSDRDIQFLQDITRLSSPTRLAVIPWGVK
 LLRWVRRNYGDMDIYITASGIDDQALEDDRLRKYYLEKYLQEVLKAYLIDKV
 RIKGYAFKLAEEKSKPRFGFFTSDFKAKSSIQFYNKMISSSGFPSENSSSRCSQ
 TQKNTCTVCLFLV (SEQ ID NO: 150).

[0412] 如在表4中所示,发现大多数抗体(例如,6D12、11D4和8E1)结合来自兔、食蟹猴和恒河猴的KLB,且发现约一半的抗-KLB抗体(例如,8C5、14E6和14C6)结合小鼠和大鼠KLB。

[0413] 表4. 鼠抗-KLB抗体与来自不同物种的KLB的结合。

抗-KLB 抗体	小鼠	大鼠	兔	食蟹猴	恒河猴
11F1	无	无	无	有	有
6D12	无	无	有	有	有
11D4	无	无	有	有	有
8E1	无	无	有	有	有
46C3	无	无	有	无	无
8H7	弱	无	有	有	有
21H3	弱	无	有	有	有

[0415]	25F7	无	无	弱	有	有
	8C5	有	有	无	有	有
	14E6	有	有	有	有	有
	14C6	有	有	有	有	有
	24A1	有	有	有	有	有
	5F8	无	无	有	有	有
	6C1	无	无	有	有	有
	12A11	弱	无	有	有	有
	12B8	无	无	有	有	有
	14C10	无	无	有	有	有

[0416] 实施例6:抗-KLB抗体的表位作图

[0417] 为了确定抗-KLB抗体是否不结合人 α -Klotho (hKLA) 的细胞外结构域 (ECD), 使用了具有下述序列的构建体:

[0418] 预测的表达式多肽序列 (具有C-端 (细胞内) FLAG):

[0419] EPGDGAQTWARFSRPPAPEAAGLFQGTFFPDGFLWAVGSAAYQTEGG
WQQHGKGASIWDTFTHHPLAPPGDSRNASLPLGAPSPQPATGDVASDSYNN
VFRDTEALRELGVTHYRFSISWARVLPNGSAGVPNREGLRYYRLLERLRELG
VQPVVTLYHWDLPQRLQDAYGGWANRALADHFRDYAELCFRHFQGGQVKY
WITIDNPYVVAWHGYATGRLAPGIRGSPRLGYLVAHNLLLAHAKVWHLYNT
SFRPTQGGQVSIALSSHWINPRRMTDHSIKECQKSLDFVLGWFAKPVFIDGDY
PESMKNLSSILPDFTESEKKFIKGTADFFALCFGPTLSFQLLDPHMKFRQLESP
NLRQLLSWIDLEFNHPQIFIVENGWVFSGTTKRDDAKYMYLKKFIMETLKAI
KLDGVDVIGYTAWSLMDGFEWHRGYSIRRGLFYVDFLSQDKMLLPKSSALFY
QKLIKNGFPPLPENQPLEGTFPCDFAWGVVDNYIQVDTTLSQFTDLNVYLWD
VHHSKRLIKVDGVVTKKRKSYCVDFAAIQPQIALQEMHVTHFRFSLDWALIL
[0420] PLGNQSQVNHTILQYYRCMASELVRVNITPVVALWQPMAPNQGLPRLARQG
AWENPYTALAFAYARLCFQELGHHVKLWITMNEPYTRNMTYSAGHLLKA
HALAWHVYNEKFRHAQNGKISIALQADWIEPACPFSSQKDKEVAERVLEFDIG
WLAEPFGSGDYPWVMDWLNQRNNFLLPYFTEDEKLIQGTDFDLALSHYT
TILVDSEKEDPIKYNDYLEVQEMTDITWLNSPSQVAVVPWGLRKVLNWLKFK
YGDLPYIISNGIDDGLHAEDDQLRVYYMQNYINEALKAHILDGINLCGYFAY
SFNDRTAPRFLYRYAADQFEPKASKHYRKIIDSNGFPGPETLERFCPEEFTV
CTECSFFHTRKSLLAFLFFASIIISLIFYSKKGRRSYKLEDYKDDDDK
(SEQ ID NO: 151).

[0421] KLA和KLB都具有两个糖苷酶-样结构域, 一个在N-端且一个在C-端。为了鉴别被抗-KLB抗体识别的KLB的区域, 将hKLB、hKLA和包含hKLA N-端糖苷酶-样结构域和hKLB c-

端糖苷酶-样结构域的嵌合构建体克隆进pCMV-Tag4A哺乳动物表达载体 (Agilent) 中。hKLA和hKLB的N-和C-端结构域分别对应于来自SEQ ID NO:151和SEQ ID NO:145的序列,如在表5中所示。基于两种蛋白之间的序列同源性,将hKLA和hKLB的N-端结构域分成5个区段,并将C-端结构域分成5个区段。

[0422] 表5.KLA和KLB的子序列。

多肽区段	氨基酸序列
KLA 的 N-端糖苷酶-样结构域	SEQ ID NO: 151 的 28-469
KLA 的 C-端糖苷酶-样结构域	SEQ ID NO: 151 的 486-928
KLB 的 N-端糖苷酶-样结构域	SEQ ID NO: 145 的 29-452
KLB 的 C-端糖苷酶-样结构域	SEQ ID NO: 145 的 469-923
KLA ECD 的区段 1	SEQ ID NO: 151 的 1-94

KLA ECD 的区段 2	SEQ ID NO: 151 的 95-201
KLA ECD 的区段 3	SEQ ID NO: 151 的 202-329
KLA ECD 的区段 4	SEQ ID NO: 151 的 330-442
KLA ECD 的区段 5	SEQ ID NO: 151 的 443-472
KLA ECD 的区段 6	SEQ ID NO: 151 的 473-529
KLA ECD 的区段 7	SEQ ID NO: 151 的 530-613
KLA ECD 的区段 8	SEQ ID NO: 151 的 614-729
KLA ECD 的区段 9	SEQ ID NO: 151 的 730-831
KLA ECD 的区段 10	SEQ ID NO: 151 的 832-944
KLB ECD 的区段 1	SEQ ID NO: 145 的 1-77
KLB ECD 的区段 2	SEQ ID NO: 145 的 78-184
KLB ECD 的区段 3	SEQ ID NO: 145 的 185-313
KLB ECD 的区段 4	SEQ ID NO: 145 的 314-425
KLB ECD 的区段 5	SEQ ID NO: 145 的 426-455
KLB ECD 的区段 6	SEQ ID NO: 145 的 456-514
KLB ECD 的区段 7	SEQ ID NO: 145 的 515-598
KLB ECD 的区段 8	SEQ ID NO: 145 的 599-722
KLB ECD 的区段 9	SEQ ID NO: 145 的 723-829
KLB ECD 的区段 10	SEQ ID NO: 145 的 830-992

[0425] 用本公开内容的抗体执行FACS分析,并观察到约一半的抗体识别hKLB的N-端糖苷酶-样结构域,而其它抗体识别C-端糖苷酶-样结构域(表6)。如在表6中所示,识别hKLB的N-端结构域的两种抗体结合至包含区段1的结构域的一部分,而其它抗体仅需要区段2-5即可结合。

[0426] 表6.鼠抗-KLB抗体的结合的绘图。

抗-KLB 抗体	N-或 C-端结构域	区段(1-10)
11F1	N-端	1-5
6D12	N-端	1-5
11D4	N-端	2-5
8E1	N-端	2-5
46C3	N-端	2-5
8H7	N-端	2-5
[0427] 21H3	N-端	2-5
25F7	N-端	2-5
8C5	C-端	5-10
14E6	C-端	5-10
14C6	C-端	5-10
24A1	C-端	5-10
5F8	C-端	5-10
6C1	C-端	5-10
[0428] 12A11	C-端	5-10
12B8	C-端	5-10
14C10	C-端	5-10

[0429] 实施例7:特异性地活化FGFR1c/KLB复合物的双特异性抗体的鉴别

[0430] 基于R1MAb的活化FGFR1为Fab的能力,生产了包含较低亲和力R1MAb与较高亲和力抗-KLB抗体的连接的分子以产生抗-KLB/抗-FGFR1双特异性抗体(图6A;W02012/158704)。

[0431] 不受限于特定理论,有人认为FGF21介导的活化通过向FGFR1c/KLB复合物募集FGF21(通过C-端KLB-结合尾巴)而起作用,而FGFR-特异性的决定簇存在于N-端区域中,其可能通过低亲和力相互作用结合FGFR(参见图6B)(Yie等人,FEBS Lett. 583(1):19-24(2009))。因此,降低亲和力的R1MAb1与作为双特异性抗体的高亲和力抗-KLB抗体的连接可以产生KLB依赖性的FGFR1激动剂。不受限于特定理论,包括具有低亲和力的FGFR1臂的抗-KLB/抗-FGFR1双特异性抗体可以减小抗-KLB/抗-FGFR1双特异性抗体在没有KLB存在下牢固地结合FGFR1并阻止其它FGF配体(例如,FGF1、FGF2、FGF8和FGF23)对FGFR1的结合和/或活化的风险。另外,具有低亲和力的FGFR1臂可以允许较高水平的抗-FGFR1杂质(例如,但不限于,抗-FGFR1半结抗体、非共价抗-FGFR1二聚体、共价抗-FGFR1二聚体和高分子量物质)的存在,而不导致临床上显著的副作用。

[0432] 一般而言,本文中使用的bFKB1表示本文中公开的几种抗-KLB/抗-FGFR1双特异性抗体中的任一种。下面描述了关于在图中公开的具体抗-KLB/抗-FGFR1双特异性抗体的细节。将HEK293细胞用四种表达载体的混合物共转染,所述表达载体编码抗-FGFR1的重链和轻链(YW182.2(R1MAb1)和YW182.3(R1MAb2))以及上述的抗-KLB抗体。抗-FGFR1和抗-KLB的重链分别带有Flag肽和八组氨酸(Oct-Histidine)标签,使得异源二聚体IgG可以通过连续亲和纯化从条件培养基中纯化。然后在基于GAL-ELK1的萤光素酶测定中分析部分地纯化的异源二聚体IgG,以鉴别KLB依赖性的激动剂。为了使重链和轻链的错配最小化,表达了具有人Fab恒定区的抗-FGFR1,并表达了具有小鼠Fab恒定区的抗-KLB。使用3种抗-R1MAb和18种抗-KLB Ab的28种组合,以粗制形式初步试验了带标签的双特异性的IgG(表7)。

[0433] 图7A显示了YW182.2(R1MAb1)、YW182.3(R1MAb2)和YW182.5(R1MAb3)与18C5、

12A11和14E6的某些双特异性组合在GAL-ELK1萤光素酶测定中的诱导数据。在大多数情况下,观察到,与仅表达FGFR1c、但是不表达KLB的细胞相比,在共表达FGFR1c和KLB的细胞中,双特异性抗体显著更好地活化了信号传递。

[0434] 基于这些抗体在这些初步实验中的活性,使用8种代表性的抗-KLB Ab (Ph#5、8C5、12A11、14C10、6D12、11D4、6C1和作为阴性对照的14E6) 生产未标记的具有YW182.5的双特异性抗体(通过使用以前描述的凸起-孔洞技术进行进一步表征(出处同上,和,例如,Atwell, 等人,FEBS Lett. 583 (1) :19-24 (2009))。如在图8A中所示,生产了具有人IgG1恒定区(野生型,具有效应子功能(1))和具有人IgG1恒定区(含有N297G突变以消除效应子功能(3))或小鼠恒定区(具有双重[D265G/N297G]突变(DANG)以消除效应子功能(2))的双特异性抗体。

[0435] 下面的表7列出了使用凸起-进入-孔洞技术制备的各种双特异性抗体。

[0436] 表7. 双特异性的抗-KLB/抗-FGFR1抗体。

[0437]

BsAb ID#	抗-FGFR1 臂	抗-FGFR1 平台	抗-KLB 臂	抗-KLB 平台
1	YW182.3	人 IgG1	Ph#5	人 IgG1
2	YW182.2	人 IgG1	Ph#5	人 IgG1
3	YW182.3	人 IgG1	14E6	鼠 VH/VL-人 IgG1 嵌合体
4	YW182.3	人 IgG1	8C5 (KLBmAb1)	鼠 VH/VL-人 IgG1 嵌合体
5	YW182.5	人 IgG1	11D4 (KLBmAb5)	鼠 VH/VL-人 IgG1 嵌合体
6	YW182.5	人 IgG1	14C10 (KLBmAb3)	鼠 VH/VL-人 IgG1 嵌合体
7	YW182.5	人 IgG1	6C1 (KLBmAb4)	鼠 VH/VL-人 IgG1 嵌合体
8	YW182.5	人 IgG1	6D12 (KLBmAb6)	鼠 VH/VL-人 IgG1 嵌合体
9	YW182.5	人 IgG1	12A11 (KLBmAb2)	鼠 VH/VL-人 IgG1 嵌合体
10	YW182.5	人 IgG1	8C5	鼠 VH/VL-人 IgG1

			(KLBmAb1)	嵌合体
11	YW182.5	人 IgG1 N297G	8C5.K4H3.RNL	人 IgG1 N297G
12	YW182.5	人 IgG1 N297G	8C5.K4H3.KNV	人 IgG1 N297G
13	YW182.5	人 IgG1 N297G	8C5.K4H3.M4L.KNV	人 IgG1
14	YW182.5	人 IgG1 N297G	8C5.K4H3.M4L.KNV	人 IgG1 N297G
15	YW182.5_W33Y	人 IgG1 N297G	8C5.K4H3.M4L.KNV	人 IgG1 N297G
[0438] 16	YW182.2_W33Y	人 IgG1 N297G	8C5.K4H3.M4L.KNV	人 IgG1 N297G
17	YW182.5_YGDY	人 IgG1 N297G	8C5.K4H3.M4L.KNV	人 IgG1 N297G
18	YW182.2_YA	人 IgG1 N297G	8C5.K4H3.M4L.KNV	人 IgG1 N297G
19	YW182.5	人 IgG1 N297G	8C5_W52Y.K4H3.M4L.KNV	人 IgG1 N297G
20	YW182.5	人 VH/VL-鼠 IgG2a 嵌合体 DANG	鼠 8C5	鼠 IgG2a DANG

[0439] 使用的同种型对照IgG是抗-豚草(鼠IgG2a)或抗-人Her2曲妥珠单抗(人IgG1)。在大肠杆菌中表达Fab片段,并使用常规柱色谱法纯化。除了放射性配体细胞结合测定(其来自Phoenix Pharmaceuticals的碘化FGF21和内部生产的未标记的FGF21执行)以外,重组FGF21来自R&D systems (2539-FG/CF)。每种双特异性的组合(除了阴性对照以外)显示出依赖于FGFR1c和KLB的信号传递。某些组合的数据显示在图7B中。另外,抗-KLB臂与YW182.5 (R1MAb3)臂的组合在表达FGFR1c、但是不表达KLB的细胞中表现出更低的背景信号传递。

[0440] 如在图6C中所示,在表达各种受体的FGFR1-缺陷型HEK293细胞中试验了抗-KLB/抗-FGFR1c抗体(BsAb17)的活性。使用CRISPR-cas9方法(其使用引导RNA),制备了FGFR1-缺陷型HEK293T细胞。观察到抗-KLB/抗-FGFR1c抗体在共表达重组hFGFR1c和hKLB的细胞中诱导萤光素酶活性(图6C)。

[0441] 对于其它抗-KLB/抗-FGFR1c抗体,观察到类似的结果。如在图7C中所示,当在基于GAL-ELK1的萤光素酶测定中在表达FGFR1c(具有或没有KLB)的HEK293细胞中试验时,抗-FGFR1和抗-KLB臂的多个双特异性抗体组合(例如,BsAb5、6、7、8、9、10)在表达重组hFGFR1c和hKLB的细胞中以剂量依赖性的方式诱导了萤光素酶活性,但是在没有KLB表达的细胞中没有诱导。这些结果指示,这些双特异性抗体充当KLB依赖性的FGFR激动剂,正如FGF21一样。

[0442] 还试验了抗-KLB/抗-FGFR1c抗体(BsAb17)与FGF21的协同作用。如在图9B中所示,当FGF21的浓度逐渐增加且BsAb17的浓度保持不变时,没有观察到BsAb17和FGF21之间的协同作用。

[0443] 另外,随着抗-KLB/抗-FGFR1c抗体(BsAb17)的浓度逐渐增加和FGF21的浓度保持不变,没有观察到BsAb17和FGF21之间的协同作用(图9C)。

[0444] 两种双特异性抗体BsAb10和BsAb9(连同hFGF21)对来自人、食蟹猴和小鼠的表达KLB的HEK293细胞的溶液结合亲和力(K_d),通过放射性地标记的配体结合测定测量了人

FGFR1c或者hFGFR1c和hKLB二者。对于放射性配体细胞结合测定,将稳定地共表达KLB和/或FGFR1c的HEK293细胞以100,000-200,000个细胞/0.2mL的密度在结合缓冲液(含有1%牛血清白蛋白(BSA)、50mM HEPES (pH 7.2)、0.1%叠氮化钠和350mM人IgG的DMEM)中铺板在96-孔板中。将50μL含有固定浓度的碘化FGF21 (Phoenix Pharmaceuticals)或碘化BsAb以及系列稀释浓度的未标记的FGF21 (Genentech)或未标记的BsAb的竞争反应混合物加至细胞。将含有细胞的竞争反应物在室温温育2h。2h温育以后,将竞争反应物转移至Millipore Multiscreen滤板,并用结合缓冲液洗涤4次以将游离物与结合的碘化FGF21或抗体分离。将过滤器在Wallac Wizard 1470 γ 计数器(PerkinElmer Life and Analytical Sciences)上计数。使用New Ligand软件(Genentech)评价结合数据,所述软件使用Munson和Rodbard的拟合算法(Munson和Rodbard Anal.Biochem.107,220-239 (1980))来确定结合亲和力。

[0445] 如在表8中所示,两种抗体对仅表达KLB的细胞表现出稍微好的反应性(与以前观察到的结果一致的物种间模式),但是二者弱得多地结合仅表达hFGFR1c的细胞且更强烈地结合表达hKLB和hFGFR1c两者的细胞。

[0446] 表8. 双特异性的抗-KLB抗体对来自不同物种的KLB/FGFR1的结合。

	FGFR1c	(无)	(无)	(无)	人	人
	KLB	人	食蟹猴	小鼠	人	(无)
[0447]	BsAb10	6.6 nM	15.4 nM	15.5 nM	2.3 nM	300 nM
	BsAb9	9.8 nM	35 nM	n.d.	2.2 nM	300 nM
	hFGF21	n.d.	n.d.	n.d.	5.3 nM	n.d.

[0448] 图9D显示了使用FACS分析与具有两个对应抗-FGFR1-结合臂(YW182.5)的抗体相比,BsAb10和BsAb9对稳定地表达hKLB、hFGFR1c或二者的HEK293细胞的亲和力。得到了与上面指出的那些类似的结果(图9D)。

[0449] 用一种双特异性抗体BsAb10(其具有YW182.5作为抗-FGFR1臂和8C5作为抗-KLB臂)和BsAb10的衍生物(BsAb11-20)进行了其它实验。如在图6C中所示,在HEK293细胞中表达鼠受体,并证实了BsAb17同样在这些细胞中诱导萤光素酶活性,从而证实了该Ab的物种交叉反应性。

[0450] 接下来在大鼠L6成肌细胞中试验了BsAb10,所述大鼠L6成肌细胞缺少内源性KLB和FGFR,但是被转染成表达hKLB和5种hFGFR同工型中的每一种(图9A)。发现BsAb10仅在表达FGFR1c和KLB的细胞中诱导萤光素酶活性,从而指示BsAb10充当FGFR1c/KLB复合物的特异性激动剂,但是与其它FGFR形成复合物的KLB却没有(图9A)。使用FGF21和FGF19作为对照来证实,当细胞表达KLB和FGFR1c、2c或3c中的任一种的组合时,FGF21诱导萤光素酶活性,且FGF19在表达KLB和FGFR4的组合的细胞中诱导活性。除了放射性配体细胞结合测定(其来自Phoenix Pharmaceuticals的碘化FGF21和内部生产的未标记的FGF21执行)以外,重组FGF21来自R&D systems (2539-FG/CF)。将编码人FGFR1b、1c、2b、2c、3b、3c和4的细胞外结构域(ECD)的cDNA克隆进含有巨细胞病毒(CMV)启动子的表达载体中以产生人FGFR-人Fc嵌合蛋白或His-标记的FGFR蛋白。

[0451] 但是,如上所述,亲本抗-FGFR1c抗体,即BsAb10的R1MAb3 (YW182.5)可以令人惊奇地结合FGFR1b,即不会与KLB相互作用的FGFR1的同工型。另外,R1MAb3 (YW182.5)和可以在

GAL-ELK1测定中活化L6细胞中的FGFR1b,这与BsAb10的活性相反(参见图2C和2B)。

[0452] 此外,FGFR1b和KLB的组合没有支持BsAb10实现的活化(图9A)。不受限于特定理论,这些数据提示,预先形成的FGFR1/KLB复合物的存在是BsAb10对FGFR1的KLB依赖性活化的先决条件。

[0453] 实施例8:BsAb10、及其衍生物充当FGF21的分子模拟物

[0454] BsAb10及其衍生物(BsAb11-20)和FGF21的进一步表征揭示了一些相似性和差异。为了确定MAPK信号传递中间体的磷酸化水平,将细胞在含有FBS、L-谷氨酰胺和GA-1000的前体脂肪细胞基础培养基-2中培养。一旦汇合,将皮下前体脂肪细胞(得自Lonza)在含有地塞米松、吡啶美辛和3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(IBMx)的生长培养基中分化。对于基因表达分析,使细胞分化14天,然后与指示的激动剂一起进一步培养另外48h。对于MAPK信号传递分析,使细胞分化10天,在无血清培养基中培养3h,然后与指示的激动剂一起进一步培养另外1h。

[0455] 如在图6D中所示,BsAb10、BsAb17、BsAb20和FGF21表现出可比较的活性以诱导原代人脂肪细胞中MAPK信号传递中间体(诸如MEK和ERK)的磷酸化,所述原代人脂肪细胞代表FGF21的抗糖尿病活性的有关细胞类型,如通过蛋白质印迹所确定的。用于蛋白质印迹分析的抗体来自Cell Signaling Technology:pFRS2a(T196)(#3864)、pMEK1/2(S217/221)(#9154)、pERK1/2(T202/204)(#4370)、ERK1/2(#4695)、HSP90(#4874)、 β -肌动蛋白(#5125),来自abcam:UCP1(ab10983),或来自R&D Systems:KLB(AF2619)。

[0456] 如在图8B中所示,在用BsAb10、BsAb17、BsAb20或FGF21处理的原代人脂肪细胞中观察到ERK的磷酸化的增加,其表示为pERK水平的倍数变化。

[0457] 另外,BsAb10的亲合力特性类似于FGF21的亲合力特性。当通过FACS试验时,BsAb10表现出与表达hKLB的细胞的强烈结合,无论FGFR1c是否共表达(图10A)。稍微令人惊奇的是,当细胞表达FGFR1c、但是不表达KLB时,观察到非常小的BsAb10结合,从而指示YW182.5臂的单价亲合力是极低的(图10A)。

[0458] 如在图10B中所示,放射性地标记的配体测定指示,BsAb10对表达FGFR1c和KLB的细胞的解离常数(K_d)是2.3nM,接近于以类似的测定形式关于hFGF21所观察到的5.3nM。这些值接近于在GAL-ELK1测定中在HEK293细胞中观察到的这些分子的 EC_{50} (对于BsAb10和FGF21,分别是3.2nM和4.7nM)。当细胞表达单独的人KLB或单独的小鼠KLB时, K_d 分别是6.6nM和15.5nM。

[0459] 由于对FGFR1的亲合力如此低,放射性标记配体测定不能可靠地确定BsAb10对仅表达FGFR1c的细胞的 K_d ,但是据估计它 >300 nM,如在图3B中所示。由于类似的原因,通过SPR不能可靠地确定BsAb10与FGFR1的结合动力学。

[0460] 此外,如以前关于FGF21观察到的,FGFR1c-ECD和KLB-ECD蛋白之间的相互作用会被BsAb10稳定化,这与BsAb10充当FGFR1c-选择性的FGF-21模拟物的观念相一致(图11)(Yie等人,Chemical Biology;Drug Design 79,398-410(2012))。通过表面等离子体共振(SPR)测量在PROTEON™XPR36(Bio-Rad Laboratories)仪器上在25°C研究了FGFR1/KLB/BsAb10相互作用。使用如生产商所述的标准胺偶联操作,将FGFR1-HIS蛋白(20 μ g/ml)在pH4.5以表面密度(1000RU)固定化在活化的PROTEON™GLC传感器芯片上。在80 μ l/min的流速在含有0.005%(v/v) TWEEN®-20、0.3M NaCl(pH7.4)的PBS中在6.25nM、12.5nM、25nM、

50nM、100nM或200nM注射BsAb10和/或BsAb10和KLB-ECD的1:1混合物,并记录结合和解离阶段的传感图。将分析物注射300秒,并允许解离600秒。将数据用interspot索引,处理,并用PROTEON™Manager软件(3.0版,Bio-Rad)测量解离常数。BsAb10对FGFR1c/KLB复合物的活化提示FGFR1c-ECD、KLB-ECD和BsAb10的三元复合物形成。

[0461] 如在图11中所示,还观察到,BsAb10与重组KLB-ECD和FGF21或FGF19形成三元复合物。通过生物层干扰量度法(BLI)测量在Octet RED (ForteBio)仪器上在25°C研究了BsAb10/KLB/FGF相互作用。如生产商所述,将BsAb10(20μg/ml)在pH 4.5固定化在活化的胺反应性生物传感器尖部上。将在含有0.005% (v/v) TWEEN®-20、0.3M NaCl的PBS (pH 7.4)中的KLB-ECD(20μg/ml)捕获在相同生物传感器尖部上,并用在相同缓冲液中的0、0.2、0.8或2μM的FGF21(R&D Systems)测量。用数据采集软件(ForteBio)处理定性数据。

[0462] 图12A显示了执行的细胞-表面时间分辨荧光共振能量转移(TR-FRET)实验的示意图。对于TR-FRET,将COS7细胞共转染成表达SNAP-标记的FGFR1和不带标签的KLB,并以100,000个细胞/孔接种在白底96-孔板(Costar)中。将转染的细胞在转染后24h用100nM供体-缀合的苜蓿基鸟嘌呤SNAP-Lumi4-Tb(Cisbio)和1μM受体-缀合的苜蓿基-鸟嘌呤SNAPAlexa647(NEB)在37°C、5%CO₂下标记1h。洗涤3次以后,在配体添加以后t=0和t=15min,在343nm激光激发以后延迟60μs后使用Safire2平板读数器(Tecan)分别在620nm和665nm记录Lumi4-Tb发射和TR-FRET信号400μs。使用相同平板读数器在640nm激发以后在682nm检测Alexa647的发射信号。然后将FRET强度计算为:(来自用SNAP-供体和SNAP-受体标记的细胞的在665nm的信号)-(来自用SNAP-供体标记的和未用SNAP标记的相同转染细胞批次的在665nm的信号)。

[0463] 如在图12B中所示,TR-FRET实验提示,当KLB也存在于细胞中时,BsAb17和FGF21都增强FGFR1c-ECD的二聚化。将结果显示为FRET比率:FRET强度除以在620nm的供体发射。

[0464] 另外,BsAb10结合KLB-ECD的C-端半,而FGF21和FGF19已经被认为结合N-端半中的KLB上的相同位点(Goetz等人,Mol. Cell. Biol. 32(10):1944-54(2012);Foltz等人,Sci. Transl. Med. 4:162ra153(2012)),这提示,KLB上的BsAb10的表位应当不同于FGF21和FGF19结合位点。为了映射BsAb10的KLB表位,研究了8C5(BsAb10的KLB-结合臂)与在HEK293细胞中表达的一系列嵌合抗原的结合。通过融合人KLB和人Klothoα(KLA)蛋白(与人KLB蛋白具有50%同一性)或兔KLB(与人KLB具有86%同一性),构建每个嵌合体。如在图13A中总结的,8C5结合KLB的C-端结构域,具体地,在含有KLB的C-端结构域中的34个氨基酸(SSPTR LAVIPWGVKLLRWVRRNYGDMDIYITAS;SEQ ID NO:142)的区域中。

[0465] 如在图13B中所示,SEQ ID NO:142的氨基酸序列可以对应于包括信号序列的KLB蛋白的氨基酸857-890,例如,诸如具有SEQ ID NO:157所示序列的52氨基酸序列,或可以表示不包括信号序列的KLB蛋白的氨基酸805-838。

[0466] 尽管FGF21和BsAb10及其衍生物之间在下游作用中具有相似性,在KLB上的BsAb10的表位不同于FGF21和FGF19结合位点(图14A)。

[0467] 图14B显示了在大鼠L6成肌细胞中执行的GAL-ELK1萤光素酶测定的结果,所述大鼠L6成肌细胞用FGFR4和KLB共转染并用单独的FGF19或与抗-KLB/抗-FGFR1c抗体(BsAb17)组合的FGF19处理过。如在图14B中所示,BsAb17预处理也没有阻断表达FGFR4/KLB复合物的L6细胞中的FGF19-活性。

[0468] 另外,且如在图14C中所示,BsAb17预处理没有阻断表达FGFR4和KLB的H4IIE肝细胞瘤细胞中的FGF19-活性。在有BsAb17存在下,FGF19仍然能够活化FGFR4/KLB复合物以诱导ERK的磷酸化(图14C)。这些数据指示,公开的抗-KLB/抗-FGFR1双特异性抗体(例如,抗-KLB/抗-FGFR1c双特异性抗体)不会干扰FGF19或FGF21与KLB/FGFR1c复合物的相互作用。

[0469] 实施例9:BsAb10、及其衍生物在体内充当长效FGF21模拟物

[0470] 如上所述的BsAb10及其衍生物与鼠受体复合物的交叉反应性(参见,例如,图6C和10B)允许在小鼠模型中试验它的体内活性。为了避免来自IgG效应子功能的潜在毒性,将双重突变[D265A/N297G]引入BsAb20的Fc区,其消除与FcγR的结合和免疫效应细胞的募集。另外,为了避免来自IgG效应子功能的潜在毒性,将N297G引入BsAb17的Fc区,其消除与FcγR的结合和免疫效应细胞的募集。

[0471] 如在图15A中所示,当以5mg/kg腹膜内注射进糖尿病db/db小鼠中时,BsAb17将血糖水平降低至类似的程度,没有影响食物摄入或体重。用BsAb17治疗的瘦C57BL/6小鼠表现出降低的血糖,但是没有达到有毒的低血糖症(图15A)。

[0472] 另外,当在第0天和第6天给高脂肪饮食饲喂的C57BL/6小鼠(饮食诱导的肥胖,DIO)注射3mg/kg的BsAb17时,观察到重量减轻以及血糖的显著下降(图15B)。对于高脂肪饮食饲喂,使用高脂肪、高碳水化合物饮食(Harlan Teklad TD.03584,58.4%卡路里来自脂肪)。

[0473] 如在图15C中所示,在注射了3mg/kg的BsAb17的高脂肪饮食饲喂的C57BL/6小鼠(饮食诱导的肥胖,DIO)中观察到葡萄糖耐受性的改善。

[0474] 在注射了3mg/kg的BsAb17的高脂肪饮食饲喂的C57BL/6小鼠(饮食诱导的肥胖,DIO)中观察到也观察到肝甘油三酯、血清胰岛素、游离脂肪酸、甘油三酯和总胆固醇的下降(图15D)。以前用FGF21注射观察到了类似的结果。

[0475] 在k1b杂合小鼠和纯合k1b缺陷型小鼠中执行一个单独实验,以确定在用抗-KLB/抗-FGFR1c双特异性抗体治疗以后观察到的葡萄糖耐受性的改善是否需要功能性KLB。为了制备k1b-缺陷型(KO)小鼠,从Sigma-Aldrich得到K1b-特异性的锌指核酸酶(ZFN)对,并根据确立的方法用于原核显微注射。ZFN对靶向小鼠基因组中的下述K1b序列(切割部位以小写字母显示),且所述KO小鼠缺少造成移码的1个碱基对缺失(g以粗体显示):GTTACCGGCTT CtcggaGACGGGAAAGCAATATGG (SEQ ID NO:156)。图16A显示了小鼠KLB蛋白的N-端氨基酸序列和k1b缺陷型小鼠中由k1b等位基因编码的对应氨基酸序列。

[0476] 图16B显示了为了证实k1b缺陷型小鼠中的KLB蛋白表达缺失而执行的蛋白质印迹的结果。

[0477] 如在图16C中所示,BsAb20改善了k1b杂合的小鼠中的葡萄糖耐受性,如通过葡萄糖耐受性试验(GTT)所测得的,但是纯合的k1b缺陷型小鼠却没有,从而指示葡萄糖耐受性的改善需要功能性KLB。对于葡萄糖耐受性试验(GTT),将小鼠禁食过夜并腹膜内注射2g/kg葡萄糖溶液。

[0478] 另外,不同于改变血清FGF23和磷的水平(Wu等人,Sci Transl Med 3,113ra126 (2011)和Wu等人,PLoS One 8,e57322 (2013))的抗-FGFR1 R1MAb1,抗-KLB/抗-FGFR1双特异性抗体没有影响这些血清参数,从而指示独立于KLB的FGFR1激动活性的缺失(图16D)。

[0479] 如在图17中所示,BsAb17没有改变血清FGF23或磷水平,它们是独立于KLB的FGFR1

的敏感标志物。通过高胰岛素血-正常血糖钳测量了BsAb17治疗的小鼠中的胰岛素作用。简而言之,将小鼠用异氟烷麻醉,并将左总颈动脉和右颈静脉分别插入导管用于取样和输注。将导管的自由端在皮肤下面穿行至颈后,在此处将导管的自由端连接至由MICRO-RENATHANE[®]制成的管道(0.033的OD)。在外科手术以后将动物单个地圈养,并每天记录体重。所有代谢实验在5-天手术后恢复期以后执行,且已经在前面描述。在上午7:00(t=-300min)将有意识的无限制的小鼠放在衬有垫层的1-L塑料容器中并禁食。立即将小鼠连接至Dual Channel Stainless Steel Swivel(Instech Laboratories)以允许同时的颈静脉输注和动脉血取样。没有处理小鼠并允许其自由地移动以消除应激。在钳开始之前2h,将5 μ Ci的[3-³H]-D-葡萄糖推注施用进颈静脉(t=-120min),这之后是在0.05 μ Ci/min的速率的恒定输注。2h平衡时段以后在t=0min(即,5h禁食),抽取基线动脉血样品用于测量血糖、[3-³H]-D-葡萄糖、血细胞比容和血浆胰岛素。然后开始145min高胰岛素血-正常血糖(4mU/kg/min)钳。将[3-³H]-D-葡萄糖加入用于维持正常血糖的可变葡萄糖输注,并将[3-³H]-D-葡萄糖的恒定输注中断从而将动脉葡萄糖比活性钳在恒定水平。将来自C57B1/6J背景的供体小鼠的红血细胞用等体积的0.9%肝素化盐水(血细胞比容约50%)洗涤并在其中重构,并在研究持续期间以4 μ l/min的速率输注以替换在研究过程中取出的血液。每10分钟取动脉血样品以确定血糖水平。在t=80、90、100和120min,取血液样品以确定[3-³H]-D-葡萄糖。在t=120min,将13 μ Ci的2-脱氧[¹⁴C]葡萄糖([2-¹⁴C]DG)推注施用进颈静脉导管中。在t=122、125、130、135和145min,将动脉血取样以确定血糖、血浆[3-³H]-D-葡萄糖和[2-¹⁴C]DG。在100和120min测量动脉胰岛素浓度。然后在t=145min,将小鼠麻醉。将比目鱼肌、腓肠肌、白色浅表股外侧肌(Quad)、肝、心脏、附睾和皮下白色脂肪组织、棕色脂肪组织和脑切离,立即在液氮中冷冻,并在将来的组织分析之前在-70 $^{\circ}$ C保存。使用Linco Rat Radioimmunoassay试剂盒(LincoResearch)测定免疫反应胰岛素。

[0480] 为了测量[3-³H]-D-葡萄糖,将血浆样品用氢氧化钡(Ba(OH)₂)和硫酸锌(ZnSO₄)去蛋白化,干燥,并使用液体闪烁计数确定放射性。将切离的组织用高氯酸去蛋白化,然后中和至约7.5的pH。将样品的一部分计数([2-¹⁴C]DG和[2-¹⁴C]DG-G磷酸盐([2-¹⁴C]DGP),并将一部分用Ba(OH)₂和ZnSO₄处理并将上清液计数([2-¹⁴C]DG)。使用液体闪烁计数确定[2-¹⁴C]DG和[2-¹⁴C]DG-磷酸([2-¹⁴C]DGP)放射性水平。使用假定分布体积(130ml/kg)的非稳态方程式评估葡萄糖通量率。如前面所述,计算[2-¹⁴C]DG的组织特异性清除(K_g)和葡萄糖摄取指数(R_g) (Kraegen, E. W. 等人, Am. J. Physiol. 248, E353-362 (1985)): $K_g = [2-^{14}C]DGP_{组织} / AUC [2-^{14}C]DG_{血浆}$, $R_g = K_g \times [葡萄糖]_{血浆}$, 其中[2-¹⁴C]DGP_{组织}是在组织中的[2-¹⁴C]DGP放射性(dpm/g), AUC [2-¹⁴C]DG_{血浆}是在血浆[2-¹⁴C]DG消失曲线下的面积(dpm/mL/min),且[葡萄糖]_{血浆}是在实验阶段中的平均血糖(μ g/ μ l)(t=102-125min)。将数据呈现为平均值 \pm SEM。

[0481] 如在图15E(该图描绘了单次注射10mg/kg的BsAb17以后测量的全身葡萄糖利用)中所示,BsAb17改善了胰岛素刺激的全身葡萄糖利用的速率。

[0482] 另外,且如在图15F中所示,在单次注射10mg/kg的BsAb17以后,BsAb17改善了内源性葡萄糖生产速率的胰岛素抑制。这些结果指示,在所述钳之前5天在DIO小鼠中单次注射10mg/kg的BsAb17会显著地降低禁食葡萄糖和胰岛素浓度。

[0483] 增强了在胰岛素刺激的阶段结束时在心脏、骨骼肌、白色脂肪组织(WAT)和肩胛间BAT组织(iBAT)中的组织葡萄糖摄取(R_g),从而指示BsAb17实现的全身胰岛素致敏(图

15G)。

[0484] 在钳实验过程中确定了动脉血葡萄糖旅行的量。如在图18A中所示,在高胰岛素血-正常血糖钳实验过程中,在注射了BsAb17的小鼠相对于注射了对照IgG的小鼠之间,动脉血葡萄糖旅行的量是不同的。

[0485] 还确定了在注射了BsAb17的小鼠相对于注射了对照IgG的小鼠之间的重量差异。如在图18B中所示,观察到葡萄糖和胰岛素浓度的变化,没有显著的重量减轻。

[0486] 还在注射BsAb17以后分析了稳态葡萄糖输注速率。如在图18C中所示,在BsAb17注射以后,稳态葡萄糖输注速率增加了64%。这些结果证实,BsAb17改善了DIO小鼠中的全身胰岛素敏感性,甚至在重量减轻变得明显之前。

[0487] 以前使用药理学剂量的FGF19或FGF21的研究已经证实了增加的能量消耗(EE) (Fu等人,Endocrinology 145,2594-2603 (2004);Coskun等人,Endocrinology 149,6018-6027 (2008);Wu等人,PLoS One 8,e57322 (2013);Lin等人,Cell Metab 17,779-789 (2013)),因而有理由认为观察到类似的效应。使用下述方程式计算EE和呼吸商(RQ)。EE=VO₂X(3.815+1.232×RQ),其中(RQ=VC₀₂/VO₂)。实际上,在正常室温(21℃)向DIO或瘦小鼠中的单次BsAb17注射导致每只注射的动物的O₂消耗(VO₂)、CO₂产生(VC₀₂)和EE的显著增加,在活性计数方面没有显著变化(图19A)。意外的是,观察到的EE的15-46%增加没有伴随呼吸商(RQ=VC₀₂/VO₂)的显著变化(图19A)。

[0488] 通过向DIO小鼠中连续地输注FGF21,引起了EE的类似增加,没有RQ的变化(图21C)。

[0489] 图20A显示了在正常室温用单次BsAb17注射治疗的DIO小鼠的VO₂、VC₀₂和总活性计数的量。

[0490] 如在图19B中所示,当将笼温度升高至中性温度(29-30℃)时,EE的增加会持续,从而提示,棕色脂肪活化的BsAb17-诱导不依赖于来自交感神经系统的适当产热输入。

[0491] 图20B显示了在正常室温用单次BsAb17注射治疗、随后将温度转换至中性温度的DIO小鼠的VO₂、VC₀₂和总活性计数的量。

[0492] 当将在热中性室温(29-30℃)适应的DIO小鼠试验2周时,EE的增加也是明显的(图21B)。

[0493] 如在图21A(其显示了平均EE值)中总结的,在正常室温的瘦和DIO小鼠中和在适应热中性室温的瘦和DIO小鼠中观察到EE的变化。

[0494] 相反,如预期的,β3-特异性的肾上腺素受体激动剂CL-316,243的连续输注诱导了EE的急性增加和RQ的下降(图19H)。使用皮下植入的渗透微型泵(Alzet 2001),执行了FGF21或CL-316,243的连续输注。因而,BsAb17-和FGF21诱导的EE是稳健的,但是似乎比其它以前描述的BAT活化机制更有选择性,所述BAT活化机制是诸如拟交感神经药(去甲肾上腺素或β3-特异性的肾上腺素受体激动剂CL-316,243)、心利钠肽或白介素-4的施用,其伴有脂质氧化的促进和RQ的下降(Gerhart-Hines等人,Mol.Cell 44,851-863 (2011);Mattsson等人,American journal of physiology.Endocrinology and metabolism 299,E374-383 (2010);Nguyen等人,Nature 480,104-108 (2011);Birkenfeld等人,Diabetes 57,3199-3204 (2008);Bordicchia等人,J.Clin.Invest.122,1022-1036 (2012);和de Souza等人,Diabetes 46,1257-1263 (1997))。

[0495] 不局限于特定理论,许多证据提示BAT活化在BsAb17的代谢作用中的主导作用。首先,如在图19C中所示,BsAb17注射会增加18F-氟[18F]脱氧葡萄糖(FDG)特异性地向iBAT中的摄取。

[0496] 其次,单次BsAb17注射会诱导腹股沟WAT(ingWAT)中的UCP1蛋白表达,这指示脂肪组织褐变(图19D)。

[0497] 如在图19E中所示,还在培养的用FGF21或BsAb17处理过的原代脂肪细胞中观察到UCP1表达的诱导,从而指示对成熟的脂肪细胞的直接作用。为了确定UCP1表达,使用SUPERSCRIPT[®]VIL0 cDNASynthesis Kit(ABI)使用总RNA合成了cDNA。对于qPCR,在ViiA 7Real-Time PCR仪器(Applied Biosystems)中一式三份地运行样品。使用Applied Biosystems预先设计的TAQMAN[®]Gene Expression Assay探针作为UCP1(Hs01027785_m1)。对于每个样品,将mRNA丰度标准化至TBP(Hs00427620_m1)和SDHA(Hs00188166_m1)转录物的量。

[0498] 第三,使用遥测系统,在单次BsAb17注射以后观察到静止深部体温的增加,其持续 ≥ 26 天,然后逐渐恢复至基线(图19F)。

[0499] 图22显示了与用对照IgG治疗的小鼠相比,单次BsAb17注射以后在小鼠中观察到的深部体温的差异。使用通过外科手术植入腹腔中的TA-F10变送器(Data Sciences International,DSI)监测深部体温。从外科手术恢复以后,基于体重和深部体温将小鼠随机分组。使用DSI Implantable Telemetry System监测深部体温和活性。

[0500] 在接受BsAb17、FGF21或对照IgG的单次注射的DIO小鼠的iBAT中分析基因表达谱。如在图19G中所示,单次BsAb17注射诱导iBAT中的基因表达变化,其类似于FGF21的每天2次注射。

[0501] 最后,当注射进C57BL/6小鼠中时,FGF21和BsAb20在不同的脂肪组织(包括iBAT和ingWAT)中诱导了ERK和MEK磷酸化(图23)。

[0502] 在以前的研究中,提示脂连蛋白会促进FGF21的完整作用(Lin等人,Cell Metab 17,779-789(2013);Holland等人,Cell Metab 17,790-797(2013))。实际上,BsAb17向DIO小鼠中的单次注射会导致血清高分子量(HMW)脂连蛋白水平的增加,伴有相关的重量减轻(图24A)。

[0503] 类似地,BsAb17向瘦食蟹猴中的单次注射(图24B)导致血清高分子量(HMW)脂连蛋白水平的增加,伴有相关的重量减轻。

[0504] 如在图24C中所示,在单次注射BsAb17后,接受HFD的脂连蛋白(Adipoq)KO小鼠在升高EE方面表现出稳健应答(25.3%增加相对于野生型小鼠中的20.9%增加)。

[0505] 另外,在单次注射BsAb17后,接受HFD的脂连蛋白(Adipoq)KO小鼠表现出减小的体重和肝甘油三酯水平(图24D)。但是,葡萄糖耐受性、胰岛素耐受性的应答、血清胰岛素和各种脂质的变化都在KO小鼠中稍微钝化(图24D),这与以下理论一致:BsAb17部分地通过脂连蛋白功能在调节全身营养物代谢方面充当FGF21模拟物。为了确定胰岛素耐受性,将小鼠禁食4h,并腹膜内注射1U/kg人胰岛素溶液(Humulin R,Eli Lilly&Company)。

[0506] 增强的BsAb10的受体选择性(参见图9A)和以前描述的IgG分子的低脑渗透率(Yu等人,Sci Transl Med 3,84ra44(2011))预示BsAb10及其衍生物与FGF21/19相比改变的安

全性谱。与FGFR1在肝中的低表达水平一致,FGF21诱导了肝中经典的FGFR靶基因Spry4和Dusp6的mRNA表达,但是BsAb17没有(图25)。

[0507] BsAb17或BsAb20也导致在不同的脂肪组织和胰腺腺泡细胞中增加的磷酸-ERK信号,但是在肝中没有(图23)。

[0508] 图26表明,BsAb17也没有增加不同脑切片(包括心室周围器官)中ERK的磷酸化,如通过免疫组织化学所确定的。

[0509] 另外,DIO小鼠的慢性BsAb20治疗8周将肝中BrdU+细胞的数目减少至瘦C57BL/6小鼠的水平,关于FGF19-样活性预见到其相反结果(图27)。关于肝BrdU掺入,在安乐死之前2h给小鼠腹腔内地注射100mg/kg BrdU(BD Biosciences)。如所述地进行抗-BrdU染色(Nicholes,K.,等人,Am.J.Pathol.160,2295-2307(2002)),并使用Ariol自动化图像分析系统计数BrdU阳性的肝细胞。

[0510] 执行用抗-KLB/抗-FGFR1c抗体治疗的小鼠的骨分析。图28A显示了分析的示意图。为了执行骨分析,通过SCANCO Medical(Basserdorf,瑞士) μ CT40微成像系统(其用x-射线管能级70keV和114微安培的电流运行)获取股骨样品的图像。用12 μ m的各向同性体素大小得到连续轴向图像切片。用SCANCO Medical(Basserdorf,瑞士) μ CT40评价软件执行股骨内的小梁骨的形态测定分析。使用半自动化轮廓描绘限定目标体积(VOI),其包含在近侧股骨生长板背面且向第一小梁骨远侧延伸1.5mm的第二小梁骨。通过将VOI边界放置在骨皮质的内边界内部,排除骨皮质。在图像分割之前,将有约束的三维(3D)高斯低通滤波器应用于图像数据用于噪音抑制(滤波器sigma=0.5,滤波器支持=1)。应用总阈值(0.36gHA/cm³)以从VOI提取“二值化运算的”小梁骨结构。通过目检来自代表性样品子集的分割结果,选择小梁骨分割阈值。通过直接3D形态测定分析,量化小梁骨结构特征。以前的研究已经证实,通过微型计算机体层摄影术对小梁骨的形态测定分析与通过组织形态测定法做出的类似估计值较好地关联。

[0511] 如在图28B中所示,DIO小鼠的慢性BsAb20治疗6周导致预期的代谢参数的变化,基于微型计算机体层摄影术在胫骨小梁骨和股骨骨皮质的不同骨参数方面没有任何负面信号。

[0512] 如在图29中所示,BsAb17向DIO小鼠中的注射没有使血清皮质酮水平增加至对照以上。在现代社会中常见的慢性正能量平衡已经在驱动肥胖大范围流行和以胰岛素抗性、高胰岛素血症、葡萄糖不耐受性、高脂血症和脂肪肝为特征的有关代谢紊乱,它们经常导致严重疾病诸如II型糖尿病、肝硬化、中风和心脏病。在2009年,报道了UCP1-阳性的BAT在成年人中的存在和它们通过热消散在驱动EE方面的功能重要性,从而激发了BAT的治疗性诱导和活化用于治疗肥胖和有关的代谢疾病的巨大兴趣(Yoneshiro和Saito,Ann.Med.,1-9(2014))。

[0513] 但是,大多数已知的BAT-活化机制也诱导白色脂肪组织脂解,其可能对心血管结果具有负面影响(Dong等人,Cell Metab.18,118-129(2013))。应当指出,BAT移植物会增加EE和诱导重量减轻,而RQ没有变化(Stanford等人,J.Clin.Invest.123,215-223(2013))。在这点上,本文描述的FGF21和抗-FGFR1/KLB激动剂抗体呈现了在不改变RQ的情况下在BAT中选择性地诱导产热应答的独特方案,从而模仿BAT移植物,而不是非特异性的交感活化(sympathoactivation)。另外,基于在小鼠中观察到的结果,预见到,抗体介导的FGFR1c/

KLB复合物的活化可能提供更安全的且更有效的用于抗肥胖和抗糖尿病疗法的方式,这不同于FGF21或FGF19类似物实现的更宽FGFR/KLB复合物活化。

[0514] 实施例10:抗-KLB抗体8C5的人源化

[0515] 将8C5的鼠轻链CDR移植进入Kappa2和Kappa4轻链框架中。除了主要移植物以外,还在每个中产生点突变,使得轻链的位置4转化成亮氨酸(命名为“M4L”)。执行分析以鉴别表达得最好且没有表现出显著聚集的那些。类似地,将重链CDR移植进入H1、H2、H3和H4 IgG1重链框架中。如下突变重链主链中的各个残基:对于H1,引入下述变化:K71R、N73T和V78A(母体命名为“KNV”且构建体命名为“RTA”);对于H2,引入下述变化:N73T(母体命名为“KNV”且构建体命名为“KTV”);对于H3,引入下述变化:K71R和V78L(母体命名为“KNV”且构建体命名为“RNL”);和对于H4,引入下述变化:K71V、N73T和V78F(母体命名为“KNV”且构建体命名为“VTF”)。

[0516] 生产了基于4个轻链和8个重链的所有逐对组合的抗体(对于共计32种抗体),并试验了表达水平和亲和力。基于这些实验,8C5衍生的轻链K4.M4L和重链H3.KNV表现出表达水平和期望的亲和力的最佳组合。

[0517] 8C5.K4.M4L.H3.KNV可变区和全长抗体的序列如下:

[0518] 8C5.K4.M4L.H3.KNV重链可变区

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASDFSLTTYGVHWVRQAPGKGLEW

[0519] LGVIWSSGGSTDYNAAFISRLTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARDY
GSTYVDAIDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 128)

[0520] 8C5.K4.M4L.H3.KNV完整重链

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASDFSLTTYGVHWVRQAPGKGLEW

LGVIWSSGGSTDYNAAFISRLTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARDY

GSTYVDAIDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD

YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV

[0521] NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT

PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLT

VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT

KNQVLSLCAVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTV

DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 129)

[0522] 8C5.K4.M4L.H3.KNV轻链可变区

DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVESYGNRYMTWYQQKPGQPP

[0523] KLLIYRAANLQSGVDPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSNEDPWT

FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 130)

[0524] 8C5.K4.M4L.H3.KNV完整轻链

DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVESYGNRYMTWYQQKPGQPP
 KLLIYRAANLQSGVDPDRFSGSGSGTDFLTISLQAEDVAVYYCQQSNEDPWT
 [0525] FGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
 DNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS
 SPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 131)

[0526] 实施例11:YW182.3和YW182.5之间的抗-FGFR1抗体杂合体的制备

[0527] 发现YW182.5 (其为在没有抗-FGFR1臂存在下不会活化KLB/FGFR1c复合物的抗-FGFR1臂) 当与8C5组合时给出了好结果,且具有色氨酸作为重链的位置33,其易于氧化。YW182.2 (其似乎与YW182.5结合相同的表位) 也在重链的位置33具有这样的色氨酸。将几个突变引入在该位置以避免该问题:对于YW182.5,引入W33Y、W33H、W33F和W33L,且对于YW182.2,引入W33Y和W33F。令人惊奇地,引入的突变在两种抗体中具有不同的作用。在YW182.2的情况下,观察到,所述突变没有可察觉地影响对FGFR1的亲合力或激动活性,而对于YW182.5,所述突变极大地降低了对FGFR1的亲合力和激动活性(参见,例如,图31)。因此,使用两个方案执行实验以鉴别具有W33Y突变的抗体,但是其具有更接近YW182.5抗体的亲合力。

[0528] 在一个方案中,对于YW182.2 W33Y重链序列,执行跨CDR3的丙氨酸扫描,将位置95、96、97、98、99、100、100a和100b突变为丙氨酸。分析得到的抗体的亲合力,并鉴别保留YW182.2 W33Y母体的非常高亲和力的那些(表9)。

[0529] 表9.YW182.2衍生物的亲合力。

[0530]

抗体	EC ₅₀ (nM)
YW182.2_W33Y_96A	2.4
YW182.2_W33Y_97A	5.3
YW182.2_W33Y_100A	5.8
YW182.2_W33Y_98A	8.8
YW182.2_W33Y_GDY	11.1
YW182.5	34.6
YW182.2_W33Y_100aA	55.1
YW182.2_W33Y_95A	221.1
YW182.2_W33Y_99A	316.2
YW182.2_W33Y_100bA	未检测

[0531] 在第二个方案中,将来自YW182.2 W33Y抗体(具有非常高的亲合力)和YW182.5 W33Y抗体(几乎没有结合)的CDR混合并匹配。YW182.2W33Y和YW182.5 W33Y抗体具有在轻链中的相同的CDR序列(CDR-L1,RASQDVSTAVA (SEQ ID NO:139);CDR-L2,SASFLYS (SEQ ID NO:140);和CDR-L3 QQSYTTPPT (SEQ ID NO:141),在CDR-H1中的单个氨基酸差异(YW182.2 W33Y CDR-H1,STYIS (SEQ ID NO:152)和YW182.5 W33Y CDR-H1,SNYIS (SEQ ID NO:136));在CDR-H2中或附近的三个氨基酸差异(YW182.2 W33Y CDR-H2,EIDPYDGDYADSVKG (SEQ ID NO:137和YW182.5 W33Y,EIDPYDGATDYADSVKG (SEQ ID NO:153));和非常不同的CDR-H3序列(YW182.2 W33Y,EHFDAWVHYVMDY (SEQ ID NO:154)和YW182.5 W33Y GTDVMDY (SEQ ID NO:

138)。构建并试验了具有基于来自YW182.5 W33Y和YW182.2 W33Y的重链CDR的所有可能组合(8个,包括2个亲本抗体)的重链的抗体。大多数抗体具有与一种或其它抗体类似的亲和力,但是令人惊奇的是,一种组合表现出与亲本YW182.5抗体几乎相同的结合。该抗体具有来自YW182.5 W33Y的CDR-H1和CDR-H3,但是具有来自YW182.2 W33Y的CDR-H2。该抗体被命名为“YW182.5 YGDY”以代表YW182.5序列中的下述变化:W33Y、A49G、A56D和D58Y。

[0532] YW182.5 YGDY抗体的序列如下:

[0533] YW182.5_YGDY重链可变区

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSNYISWVRQAPGKGLEW

[0534] VGEIDPYDGDY Y ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCATG
TDVMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 132).

[0535] YW182.5_YGDY完整重链

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSNYISWVRQAPGKGLEW

VGEIDPYDGDY Y ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCATG

TDVMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE

PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK

[0536] PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
VSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 133).

[0537] YW182.5_YGDY轻链可变区

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPKGKAPKLLI

[0538] YSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQSYTTPPTFGQGTK
VEIK (SEQ ID NO: 134).

[0539] YW182.5_YGDY完整轻链

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPKGKAPKLLI

YSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQSYTTPPTFGQGTK

[0540] VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS
GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF
NRGEC (SEQ ID NO: 135)

[0541] 实施例12:具有人源化的8C5的双特异性抗体和抗-FGFR1变体的试验

[0542] 在基于GAL-ELK1的萤光素酶测定中在表达FGFR1c(有或没有KLB)的HEK293细胞中试验了8C5.K4H3.M4L.KNV和不同抗-FGFR1臂的各种双特异性抗体组合。如以前观察到的,每种双特异性抗体组合在表达重组hFGFR1c和hKLB的细胞中以剂量依赖性的方式诱导了萤光素酶活性,但是在没有KLB表达的细胞中不会(图30)。这些数据证实,这些修饰的变体保

留亲本抗体(例如,BsAb13)的优点。具有人源化的8C5臂(8C5.K4.M4L.H3.KNV)和YW182.5_YGDY臂的抗-KLB/抗-FGFR1抗体对HEK293细胞表面上的人、食蟹猴和小鼠KLB/FGFR1c复合物的结合亲和力显示在表10中。

[0543] 表10. 结合亲合力。

细胞系	抗-KLB/抗-FGFR1c 抗体 K _d (nM)	平均 K _d (nM)	标准 差
293huKLB/huR1c	1.87	1.88	0.06
	1.95		
	1.83		
293cynoKLB/cynoR1c	2.54	2.55	0.25
	2.80		
	2.31		
293msKLB/msR1c	4.12	3.92	0.17
	3.85		
	3.80		

[0545] 除了描绘的和要求保护的各种实施方案以外,公开的主题也涉及具有本文中公开的和要求保护的特征的其它组合的其它实施方案。这样,本文中呈现的特定特征可以在公开的主题的范围内以其它方式彼此组合,使得公开的主题包括本文中公开的特征的任意合适组合。为了例证和描述的目的,已经呈现了公开的主题的具体实施方案的前述描述。它无意成为穷尽性的或将公开的主题限制为公开的那些实施方案。

[0546] 本领域技术人员显而易见,可以在公开的主题的组合物和方法中做出多种修改和变化,而不脱离公开的主题的精神或范围。因而,公开的主题意图包括在所附权利要求和它们的等同方案的范围内的修改和变化。

[0547] 本文中引用了各种出版物、专利和专利申请,它们的内容特此通过引用整体并入。

序列表

<110> 豪夫迈·罗氏有限公司
 <120> 抗体及其使用方法
 <130> 00B206.0170
 <140>
 <141>
 <150> 62/081,435
 <151> 2014-11-18
 <150> 61/920,396
 <151> 2013-12-23
 <160> 166
 <170> PatentIn 3.5版
 <210> 1
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注="人工序列的描述: 合成的肽"
 <400> 1
 Ser Tyr Gly Ile Ser
 1 5
 <210> 2
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注="人工序列的描述: 合成的肽"
 <400> 2
 Asp Tyr Tyr Met Asn
 1 5
 <210> 3
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注="人工序列的描述: 合成的肽"
 <400> 3
 Asn Tyr Gly Val Ser
 1 5
 <210> 4
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注="人工序列的描述: 合成的肽"
 <400> 4
 Asp Thr Tyr Met Asn
 1 5
 <210> 5
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注="人工序列的描述: 合成的肽"
 <400> 5
 Asp Thr Tyr Ile His
 1 5
 <210> 6
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注="人工序列的描述: 合成的肽"
 <400> 6
 Ser Tyr Trp Ile His
 1 5
 <210> 7
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

[0001]

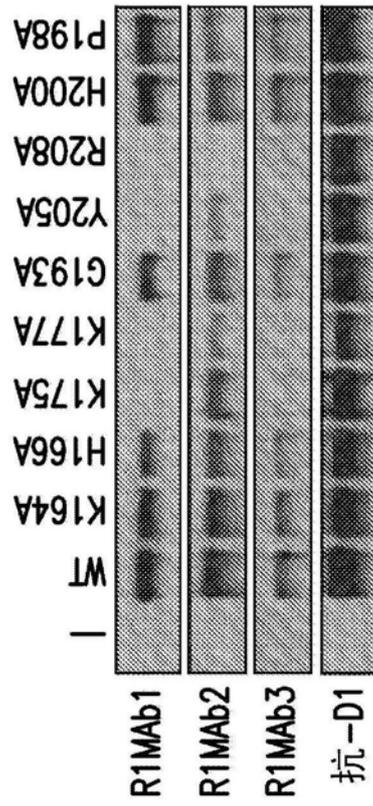


图1D

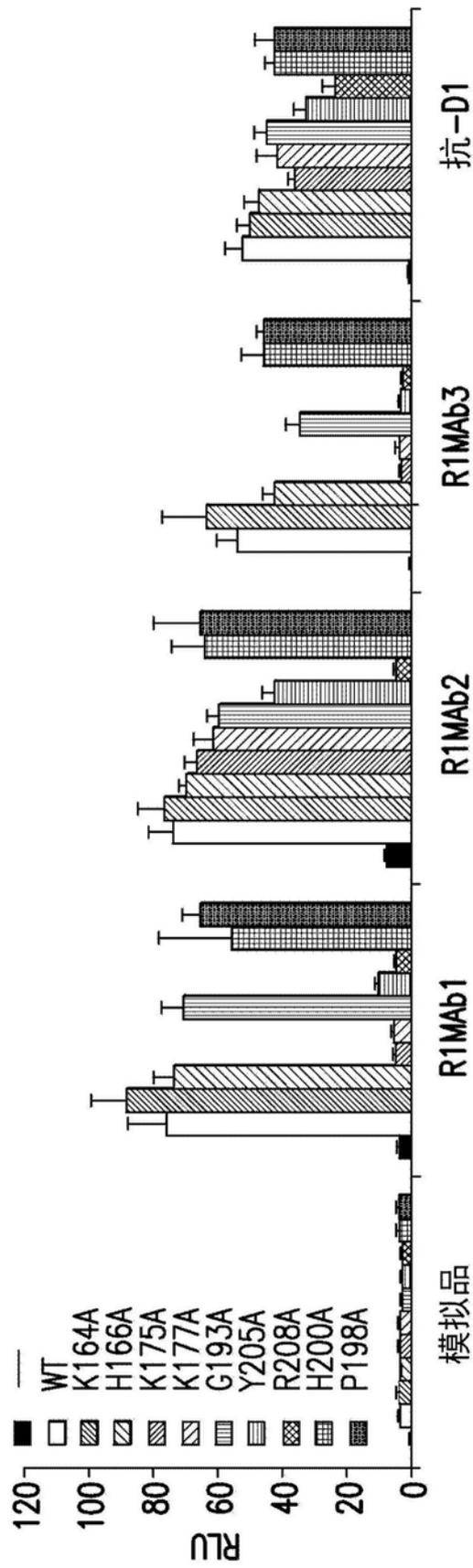


图1E

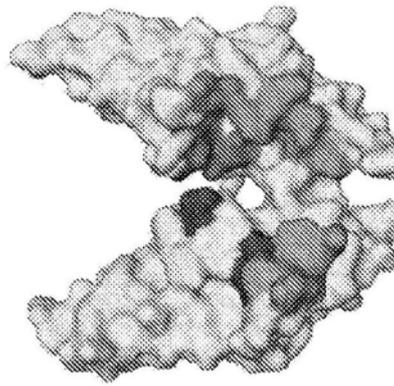


图1F

		k_{on} ($M^{-1} s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	K_D (M)
R1MAb1	FGFR1b	1.9×10^6	2.2×10^{-3}	11.3×10^{-10}
	FGFR1c	4.6×10^6	3.6×10^{-3}	7.8×10^{-10}
R1MAb2	FGFR1b	4.5×10^5	3.7×10^{-4}	8.2×10^{-10}
	FGFR1c	7.3×10^5	5.1×10^{-4}	7.1×10^{-10}

图2A

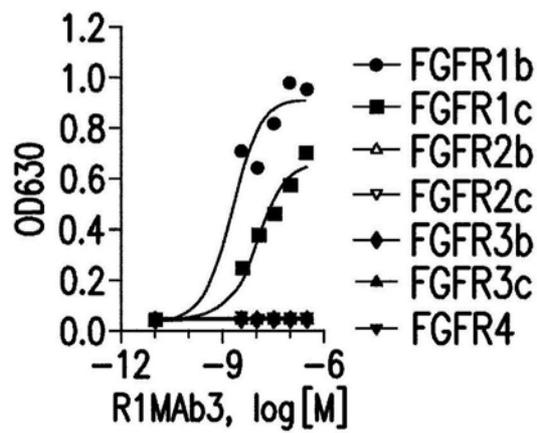


图2B

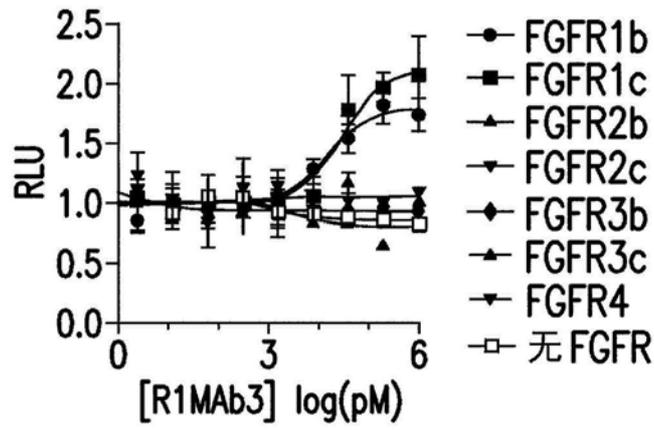


图2C

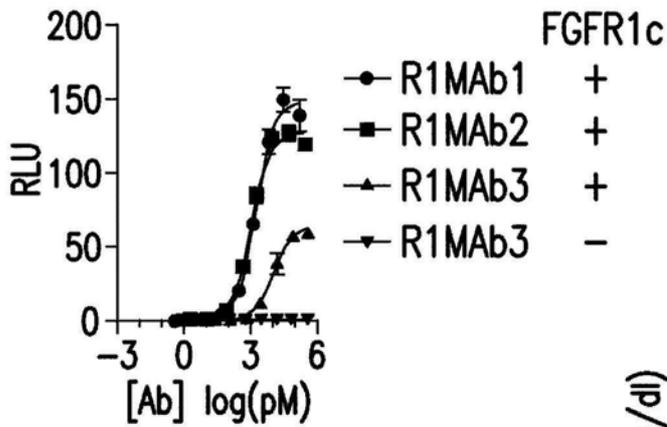


图 2D

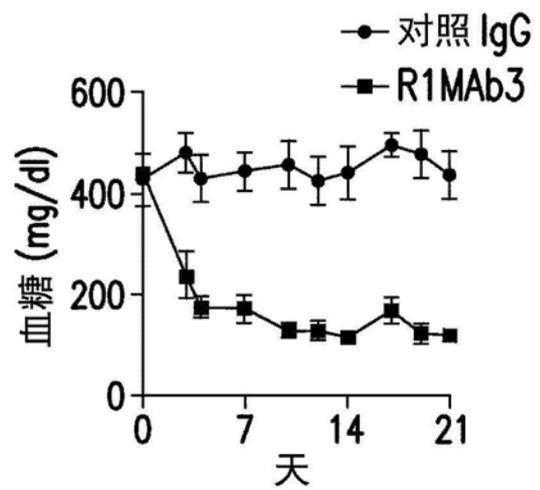


图 2E

根据 Kabat 定义的 CDR 序列标有下划线

轻链可变区

Kabat 编号	CDR L1 - 接触																																											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	27a	27b	27c	27d	27e	27f	28	29	30	31	32	33	34	35	36		
11F1	D	I	Q	M	T	Q	T	T	S	S	L	S	A	S	L	G	D	R	V	T	I	I	C	S	A	S	Q	V	I	S	N	Y	L	N	W	Y
6012	E	N	V	L	T	Q	S	P	A	I	M	S	A	S	P	G	E	K	V	T	M	T	C	S	A	S	S	S	G	R	Y	T	F	W	W	Y
11D4	D	I	Q	M	T	Q	T	P	S	S	L	S	A	S	L	G	D	R	V	T	I	N	C	R	A	S	Q	D	I	S	N	Y	F	N	W	Y	
8E1	D	I	Q	M	T	Q	S	S	S	Y	L	S	V	S	L	G	G	S	V	T	I	T	C	K	A	S	D	H	I	N	N	W	L	A	W	Y	
46C3	A	V	L	M	T	Q	T	P	L	S	L	P	V	S	L	G	D	Q	A	S	I	S	C	R	S	S	Q	N	I	V	H	S	.	D	G	N	T	Y	L	E	W	Y		
8H7	D	I	V	M	T	Q	S	Q	K	F	M	S	T	S	V	G	D	R	V	S	I	T	C	K	A	S	Q	F	V	S	D	A	V	A	W	Y	
21H3	D	I	V	M	T	Q	S	Q	K	F	M	S	T	S	V	G	D	R	V	S	I	T	C	K	A	S	Q	F	V	S	D	A	V	A	W	Y		
25F7	D	I	Q	M	T	Q	S	S	S	Y	L	S	V	S	L	G	G	R	V	T	I	T	C	K	A	S	D	H	I	N	N	W	L	A	W	Y	
14E6	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	L	G	E	R	V	S	L	T	C	R	A	S	Q	E	I	S	G	Y	L	S	W	L		
14C6	Q	I	V	L	T	Q	S	P	A	I	M	S	A	S	P	G	E	R	V	T	L	T	C	S	A	S	S	L	S	S	S	Y	L	Y	W	Y		
24A1	D	I	V	M	T	Q	S	P	S	S	L	P	M	S	V	G	Q	K	V	T	M	S	C	K	S	S	Q	S	L	L	N	S	G	N	Q	K	N	S	L	A	W	Y		
5F8	E	S	V	L	T	Q	S	P	A	L	M	S	A	S	L	G	E	K	V	T	M	T	C	R	A	S	S	S	V	N	H	M	Y	W	Y		
6C1	D	I	V	M	T	Q	S	Q	K	F	M	S	T	S	V	G	D	R	V	S	V	T	C	K	A	S	Q	N	V	D	S	Y	V	A	W	Y		
12A11	D	I	V	M	T	Q	S	P	A	T	L	S	V	T	P	G	D	R	V	S	L	S	C	R	A	S	Q	S	I	S	D	Y	V	Y	W	Y		
12B8	D	I	Q	M	T	Q	S	S	S	S	F	S	V	S	L	G	D	R	V	T	I	T	C	K	A	S	E	D	I	Y	N	R	L	A	W	Y		
14C10	D	I	V	L	T	Q	S	P	A	S	L	A	V	S	L	G	Q	R	A	T	I	S	C	R	A	S	E	S	V	D	S	.	Y	G	N	S	F	M	H	W	Y			
8C5	D	I	V	L	T	Q	S	P	T	S	L	A	V	S	L	G	Q	R	A	T	I	S	C	R	A	S	E	S	V	E	S	.	Y	G	N	R	Y	M	T	W	Y			

图3A

		CDR L3 - 接触
		CDR L3 - Chothia
		CDR L3 - Kabat
Kabat 编号		
11F1	E P E D V A T Y F C Q Q Q Y S K L P . .	107
6D12	E A E D V A T Y Y C F Q Q G T G Y P . .	106
11D4	E Q E D K A T Y F C H Q V R T L P . .	105
8E1	Q S E D V A S Y Y C Q Q Y W N T P . .	104
46C3	E A G D L G V Y Y C F Q Q G S H V . .	103
8H7	R T E D L A V Y Y C Q Q H Y I V P . .	102
21H3	R T E D L A V Y Y C Q Q H Y I V P . .	101
25F7	Q T E D V A T Y Y C Q Q Y W N T P . .	100
14E6	E S E D F A D Y Y C L Q Y G S Y P . .	99
14C6	E A E D A A S Y F C H Q W S S Y P . .	98
24A1	Q A E D L A D Y F C Q Q H S T P . .	97
5F8	E G E D A A T Y Y C Q Q F T I S P S M . .	96
6C1	Q S E D L A E Y F C Q Q Y N I S P . .	95
12A11	E P E D V G V Y Y C Q Q N G H N F P . .	94
12B8	Q T E D V A T Y Y C Q Q Y W S N P . .	93
14C10	E A D D V A N Y Y C Q Q S N E D . .	92
8C5	E A D D V A T Y Y C Q Q S N E D P . .	91
		90
		89
		88
		87
		86
		85
		84
		83
		82
		81
		80
		79

图3A续

CDR H3 - 接触	
CDR H1 - Contact	CDR H3 - Kabat
11F1	W S S L R S E D T A M Y Y C T R G G D G Y A L
6D12	L T S L T S E D T A V Y Y C A A F T H T V F
11D4	L N S L E A D D T A T Y Y C A K T R A L G N G Y A L
8E1	L S S L T S E D T A V Y Y C A S R A L S Y S W F
46C3	F N S L T S E D T A V Y Y C A R G L G V M V Y G S S P F
8H7	L S G L T S E D S A V Y Y F C V R L G V M V Y G S S P F
21H3	L S G L T S E D S A V Y Y F C V R L G V M V Y G S S P F
25F7	L I G L T S E D T A V Y Y C A S R A L G N G Y A M
14E6	L R I L T S E D S A V Y Y F C A R K T T
14C6	L S S L T S E D S A V Y Y F C A R R G Y D A A W F
24A1	L R S L T S E D S A V Y Y C T R E G
5F8	L S S L T S E D T A V Y Y C A S S G N Y G A M
6C1	L S S L T S E D S A V Y Y C A R G Y P G W L
12A11	M S K V R S A D T A L Y Y C A R P S P A L
12B8	I N N L K N E D M A T Y F C A R E E Y G L F G F
14C10	I A S V D T A D T A T Y F C A R I D G S F Y A M
8C5	M N S L Q T T A I Y Y C A R D Y G S T Y V D A I
82	W S S L R S E D T A M Y Y C T R G G D G Y A L
82a	L T S L T S E D T A V Y Y C A A F T H T V F
82b	L N S L E A D D T A T Y Y C A K T R A L G N G Y A L
82c	L S S L T S E D T A V Y Y C A S R A L S Y S W F
83	F N S L T S E D T A V Y Y C A R G L G V M V Y G S S P F
84	L S G L T S E D S A V Y Y F C V R L G V M V Y G S S P F
85	L S G L T S E D S A V Y Y F C V R L G V M V Y G S S P F
86	L I G L T S E D T A V Y Y C A S R A L G N G Y A M
87	L R I L T S E D S A V Y Y F C A R K T T
88	L S S L T S E D S A V Y Y C T R E G
89	L S S L T S E D S A V Y Y C A S S G N Y G A M
90	L S S L T S E D T A V Y Y C A R G Y P G W L
91	I N N L K N E D M A T Y F C A R E E Y G L F G F
92	I A S V D T A D T A T Y F C A R I D G S F Y A M
93	M N S L Q T T A I Y Y C A R D Y G S T Y V D A I
94	W S S L R S E D T A M Y Y C T R G G D G Y A L
95	L T S L T S E D T A V Y Y C A A F T H T V F
96	L N S L E A D D T A T Y Y C A K T R A L G N G Y A L
97	L S S L T S E D T A V Y Y C A S R A L S Y S W F
98	F N S L T S E D T A V Y Y C A R G L G V M V Y G S S P F
99	L S G L T S E D S A V Y Y F C V R L G V M V Y G S S P F
100	L S G L T S E D S A V Y Y F C V R L G V M V Y G S S P F
100a	L I G L T S E D T A V Y Y C A S R A L G N G Y A M
100b	L R I L T S E D S A V Y Y F C A R K T T
100c	L S S L T S E D S A V Y Y C T R E G
100d	L S S L T S E D T A V Y Y C A S S G N Y G A M
100e	L S S L T S E D S A V Y Y C A R G Y P G W L
100f	I N N L K N E D M A T Y F C A R E E Y G L F G F
100g	I A S V D T A D T A T Y F C A R I D G S F Y A M
101	M N S L Q T T A I Y Y C A R D Y G S T Y V D A I
102	W S S L R S E D T A M Y Y C T R G G D G Y A L
103	L T S L T S E D T A V Y Y C A A F T H T V F
104	L N S L E A D D T A T Y Y C A K T R A L G N G Y A L
105	L S S L T S E D T A V Y Y C A S R A L S Y S W F
106	F N S L T S E D T A V Y Y C A R G L G V M V Y G S S P F
107	L S G L T S E D S A V Y Y F C V R L G V M V Y G S S P F
108	L S G L T S E D S A V Y Y F C V R L G V M V Y G S S P F
109	L I G L T S E D T A V Y Y C A S R A L G N G Y A M
110	L R I L T S E D S A V Y Y F C A R K T T
111	L S S L T S E D S A V Y Y C T R E G
112	L S S L T S E D T A V Y Y C A S S G N Y G A M
113	L S S L T S E D S A V Y Y C A R G Y P G W L

图3B续

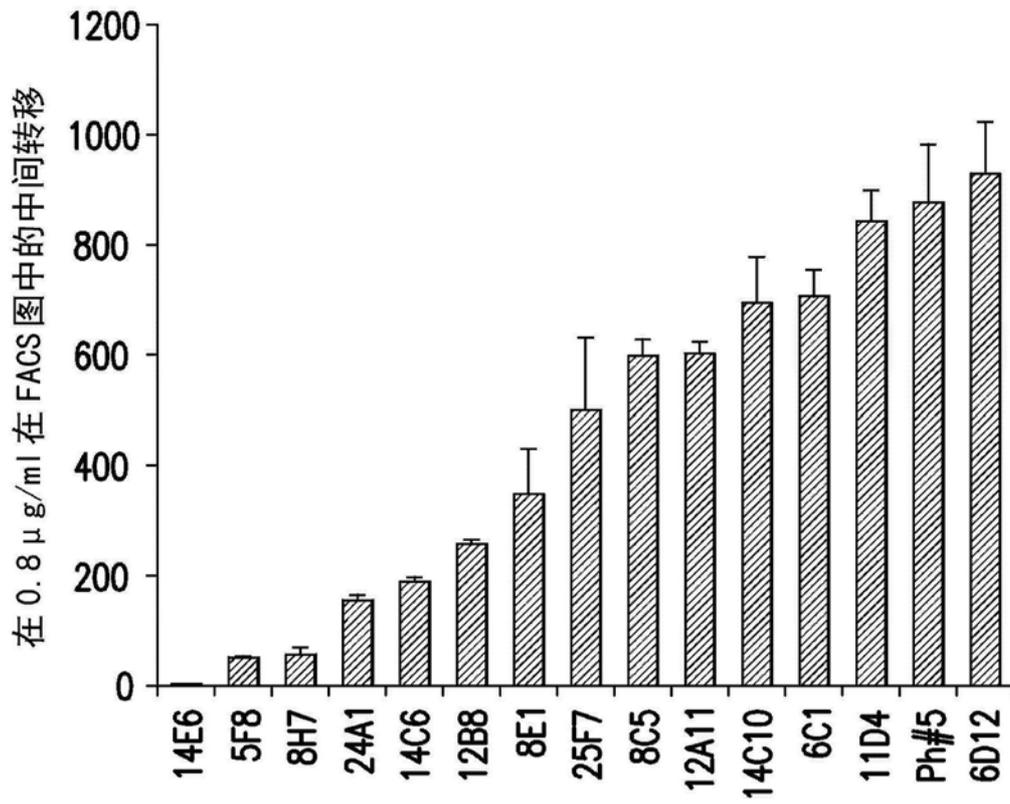


图4

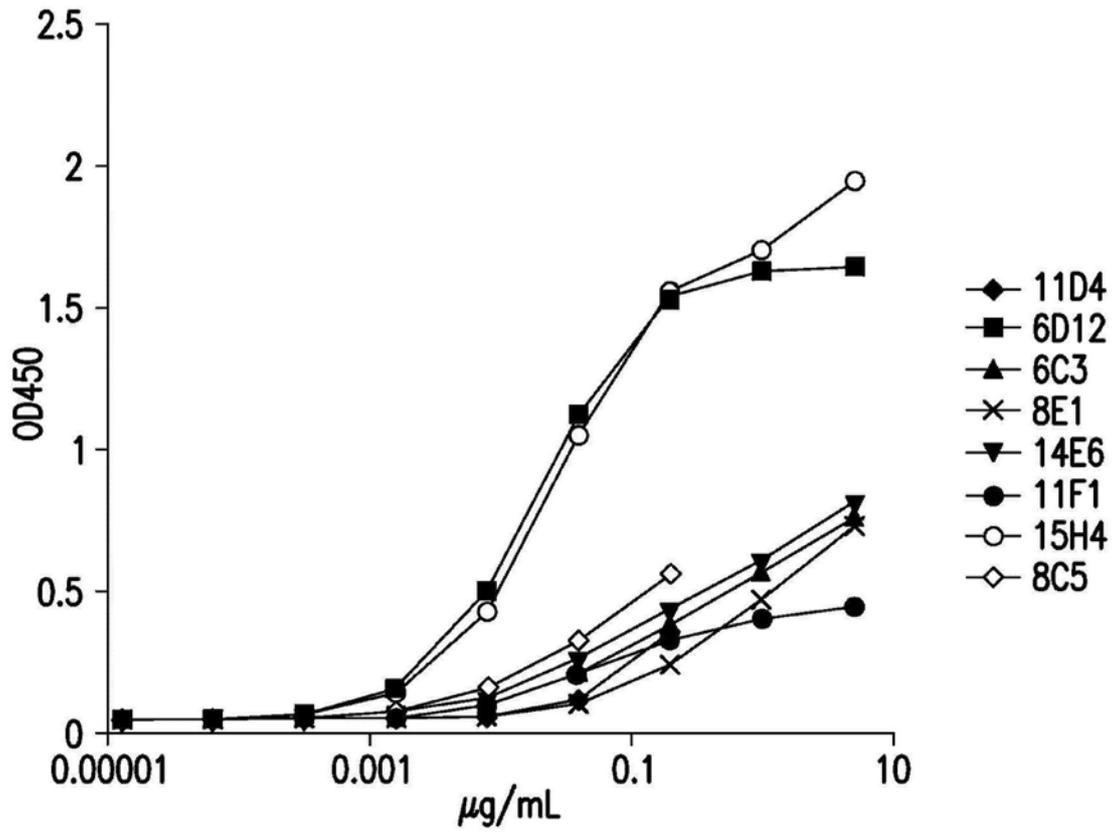


图5

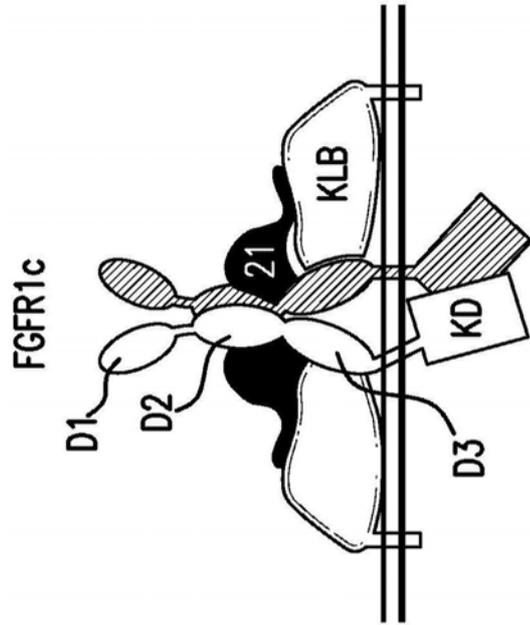


图 6B

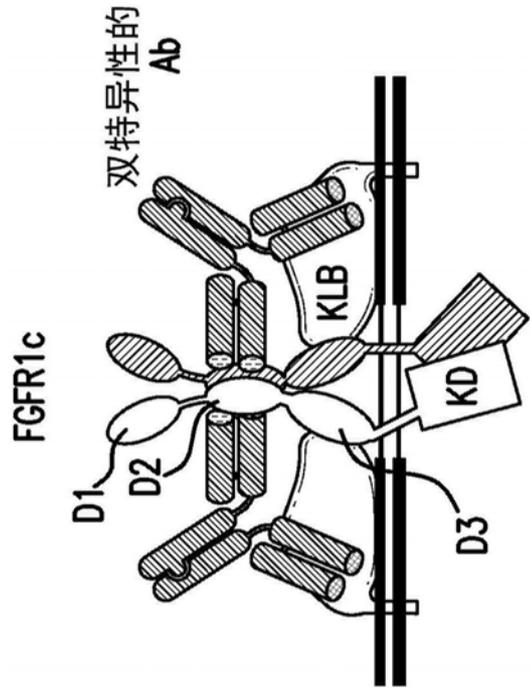
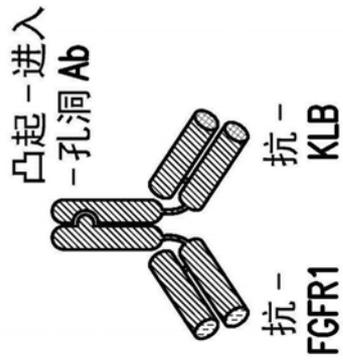


图 6A



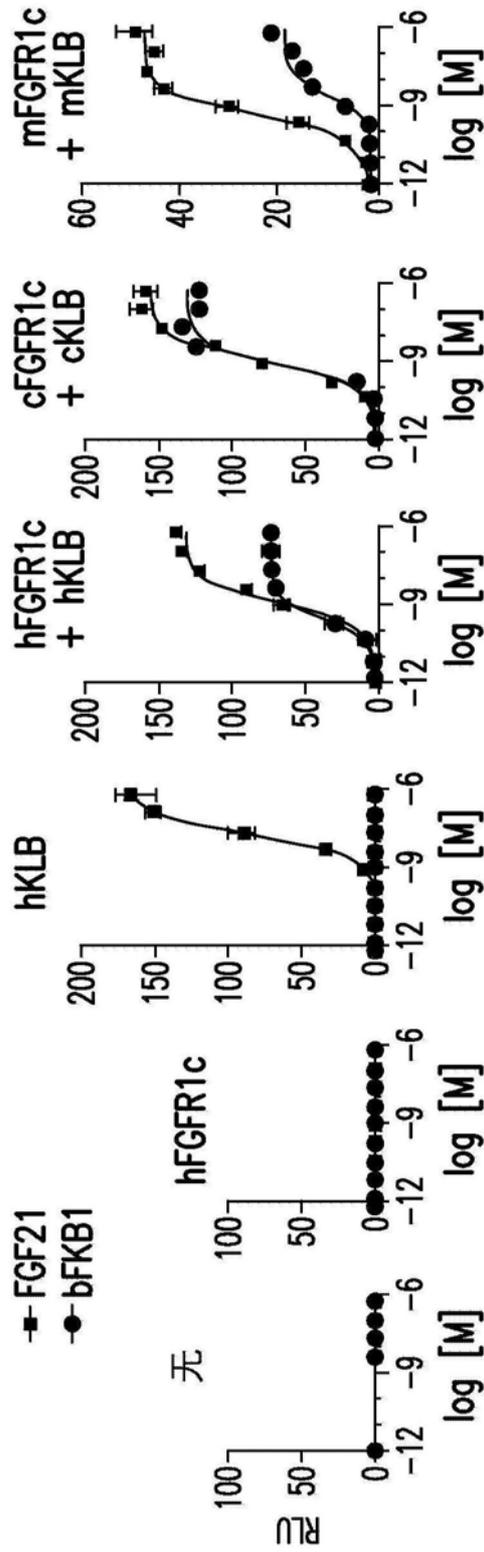


图6C

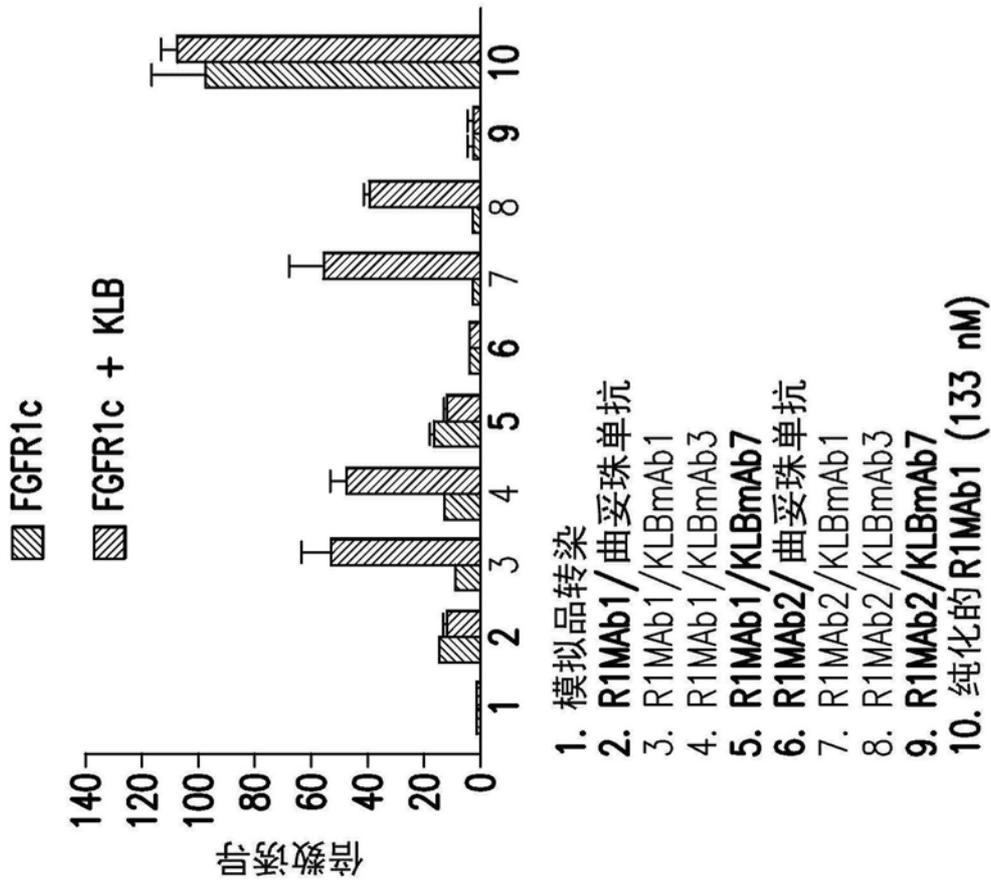


图7A

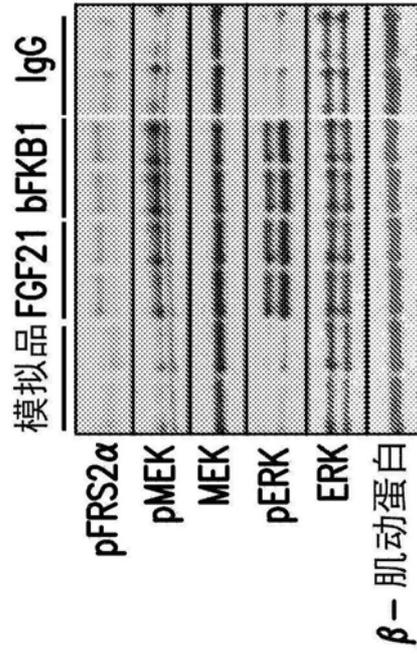


图6D

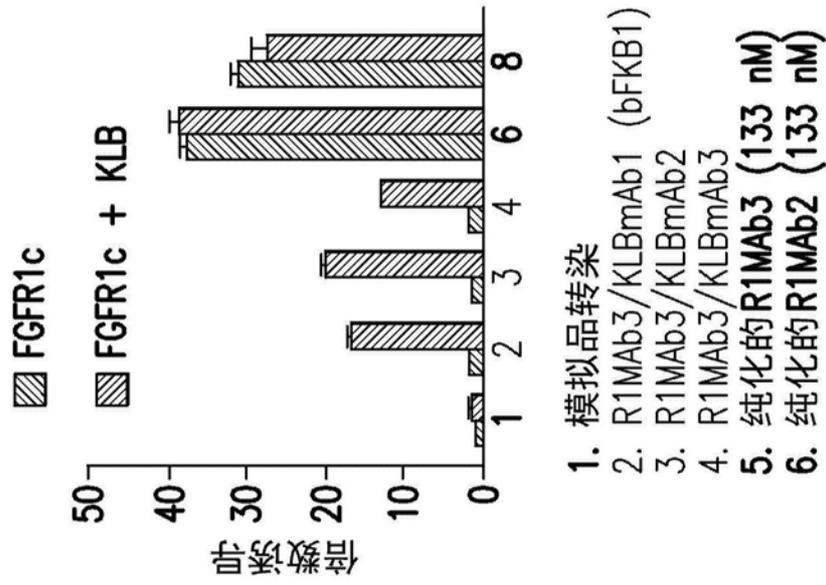


图7B

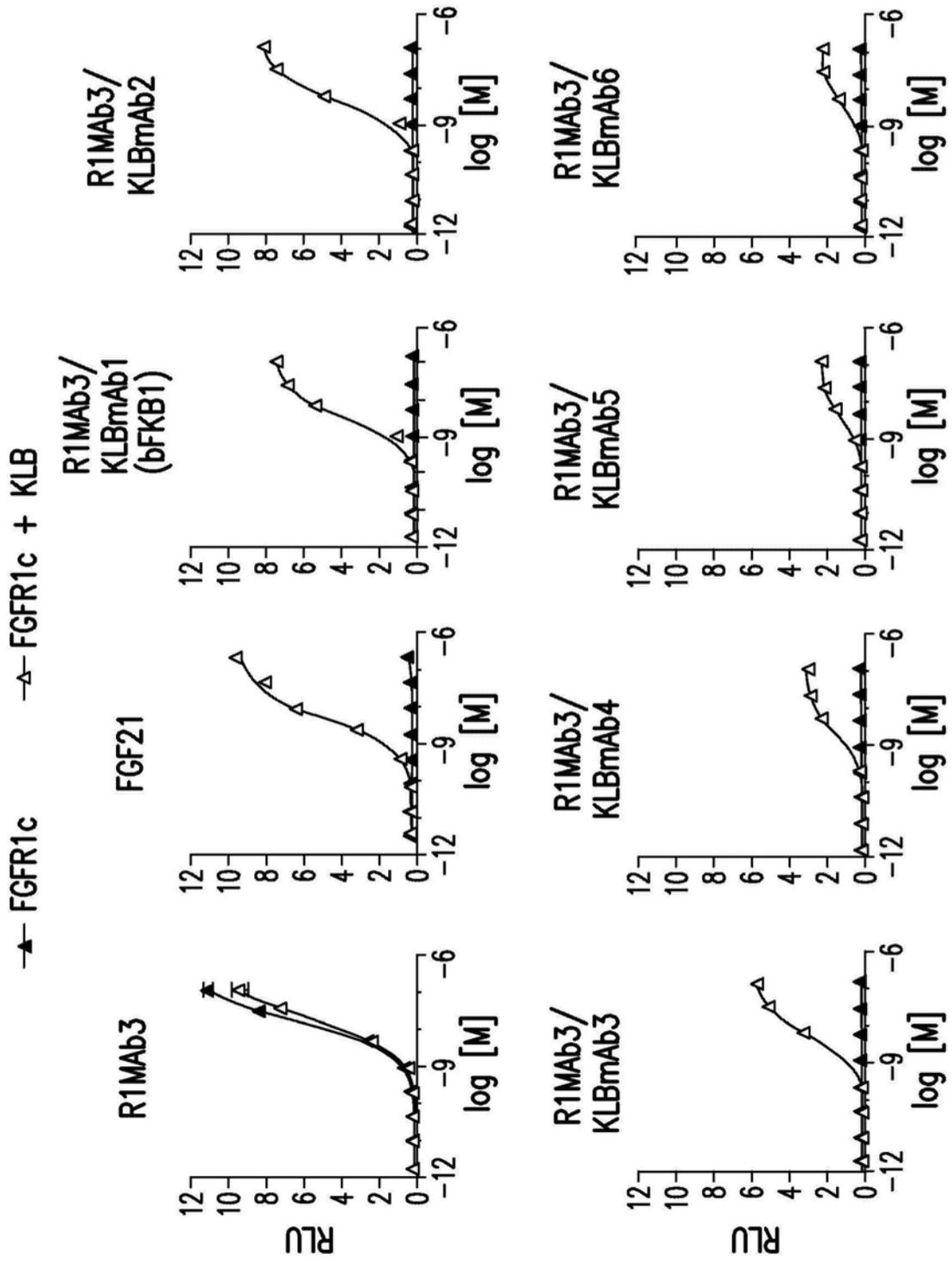


图7C

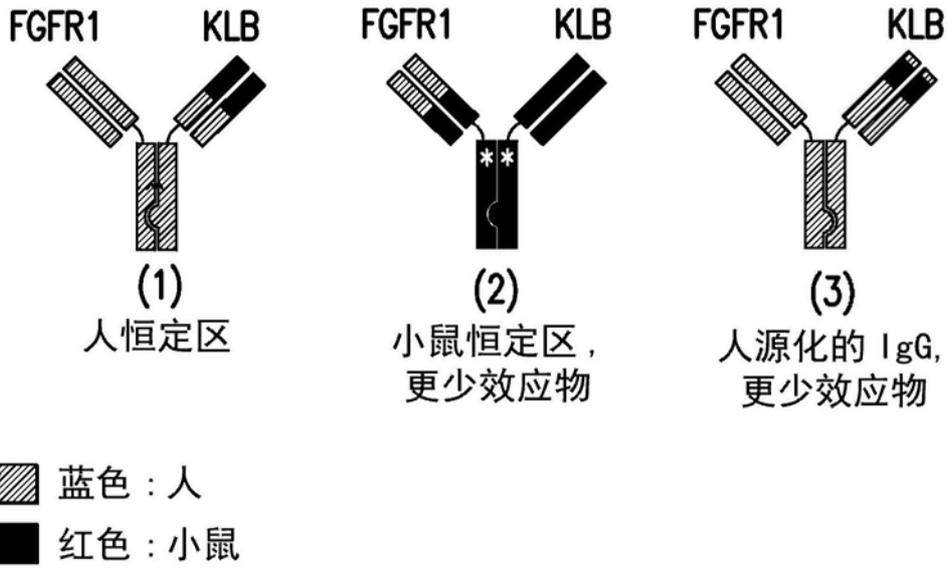


图8A

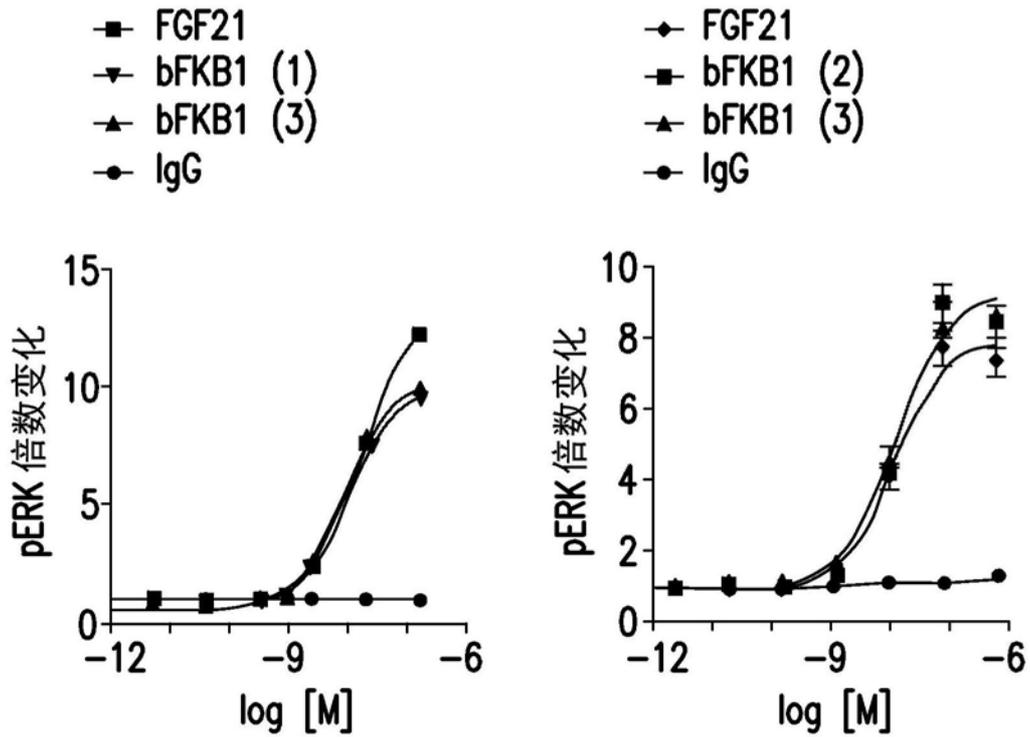


图8B

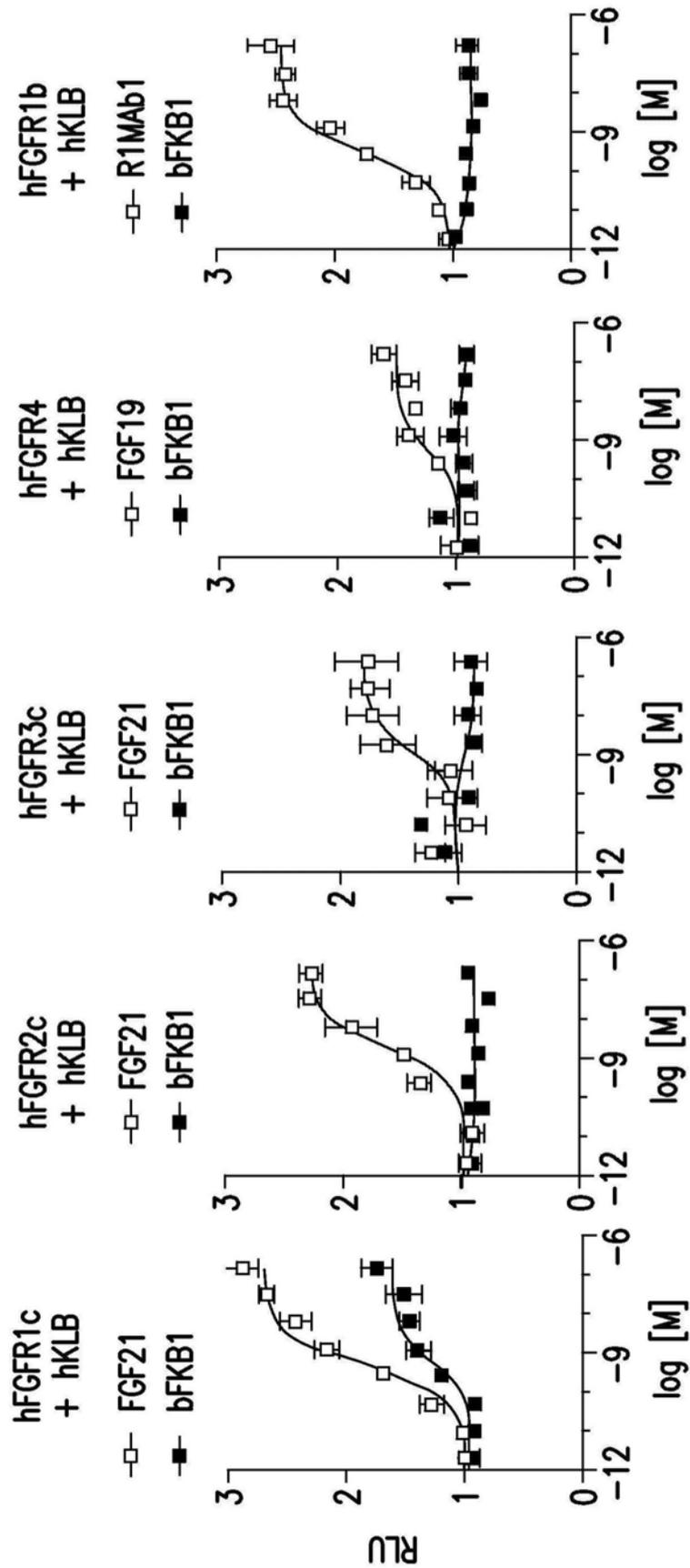


图9A

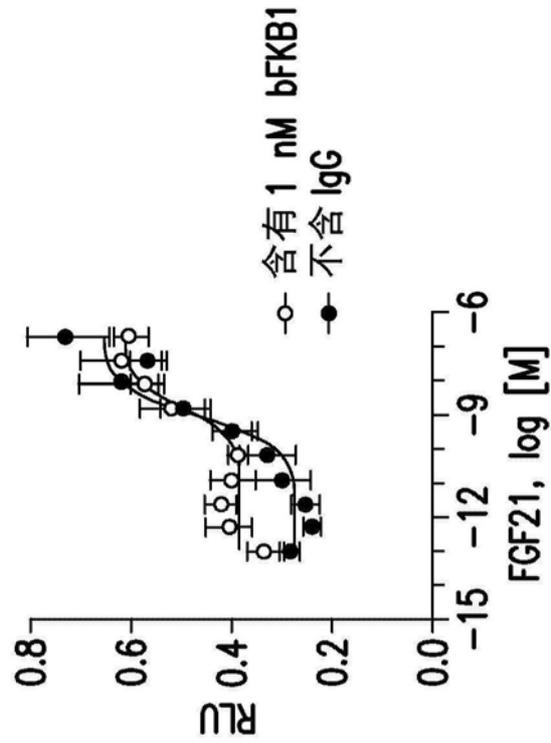


图9B

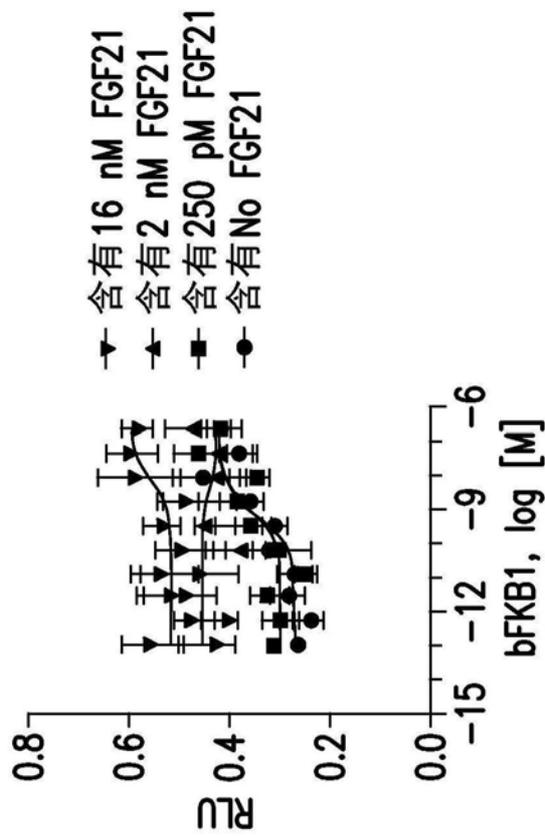


图9C

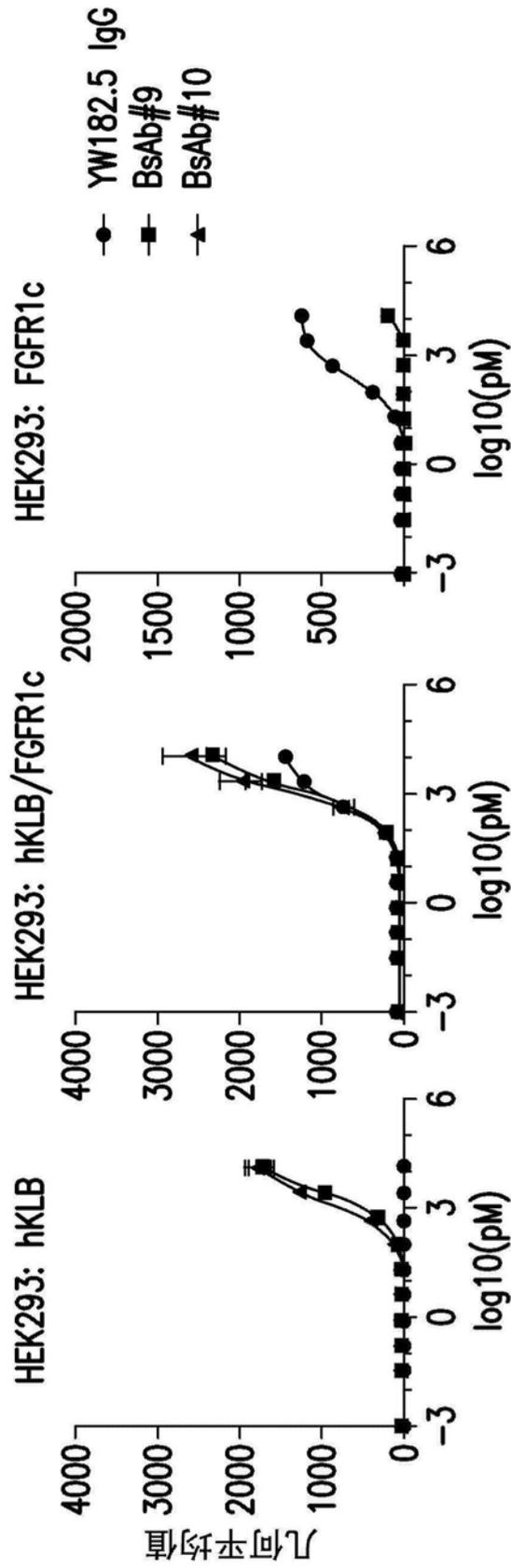


图9D

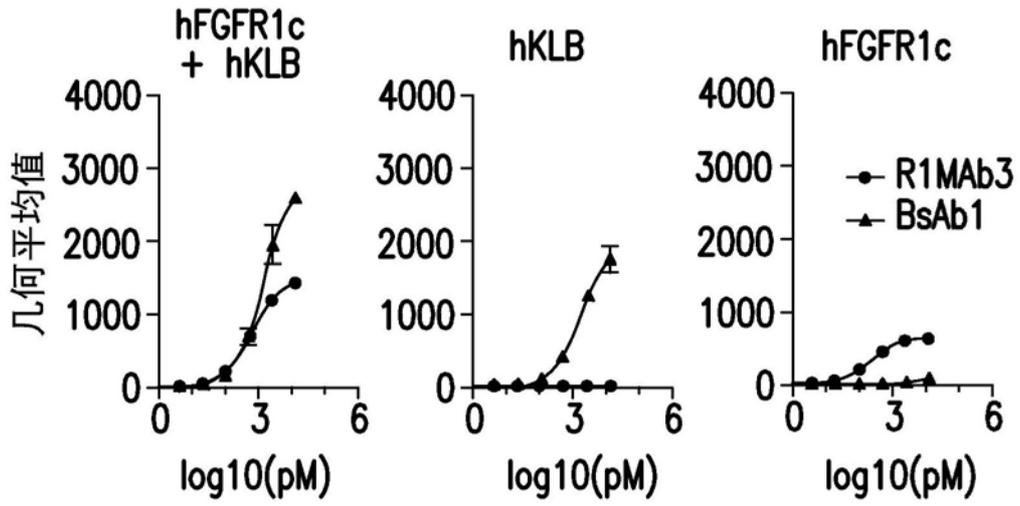


图10A

FGFR1 KLB	人 人	人 (无)	(无) 人	(无) 小鼠
BsAb1	2.3 nM	>300nM	6.6nM	15.5 nM
FGF21	5.3 nM	n.d.	n.d.	n.d.

图10B

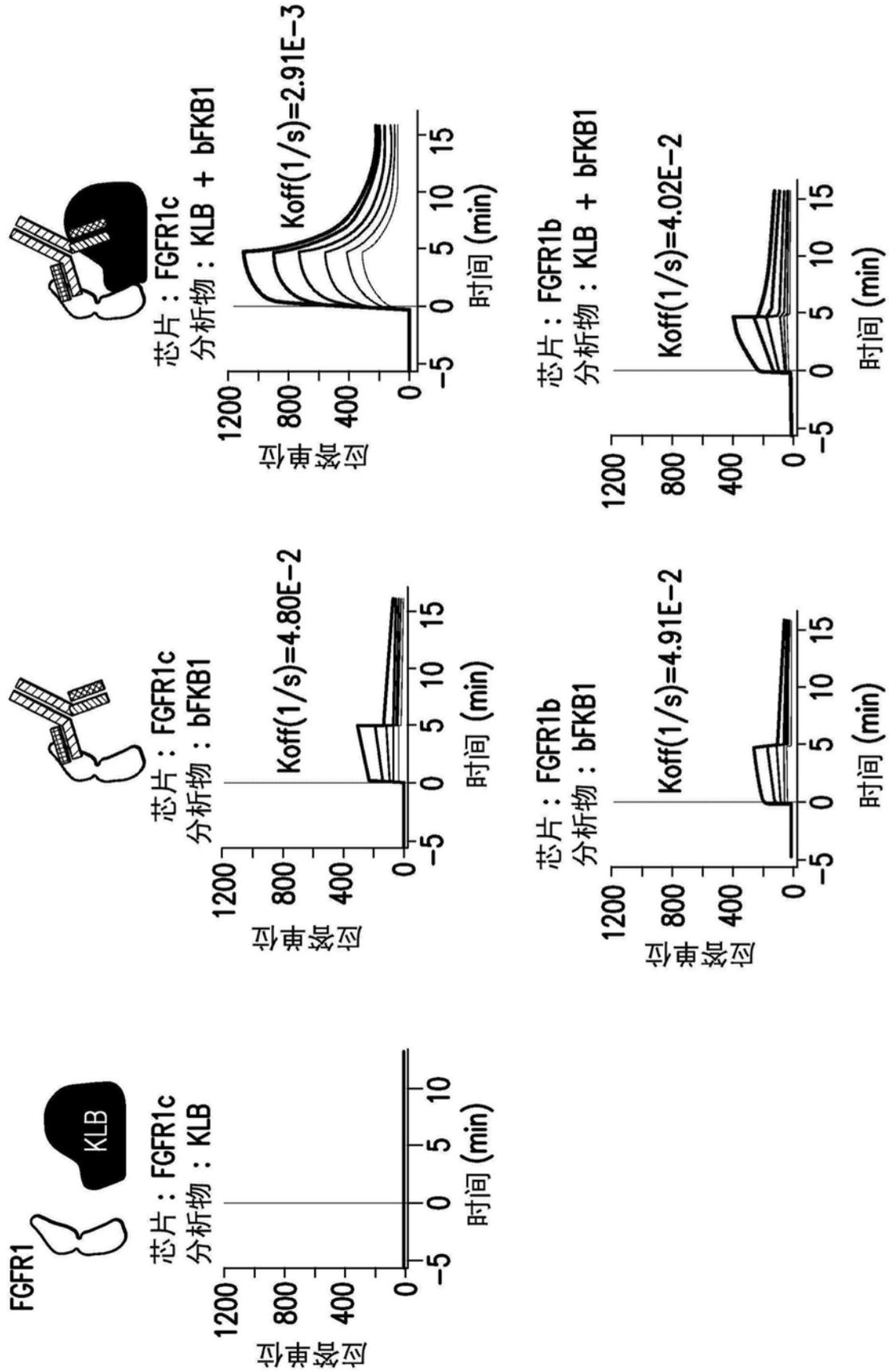


图11

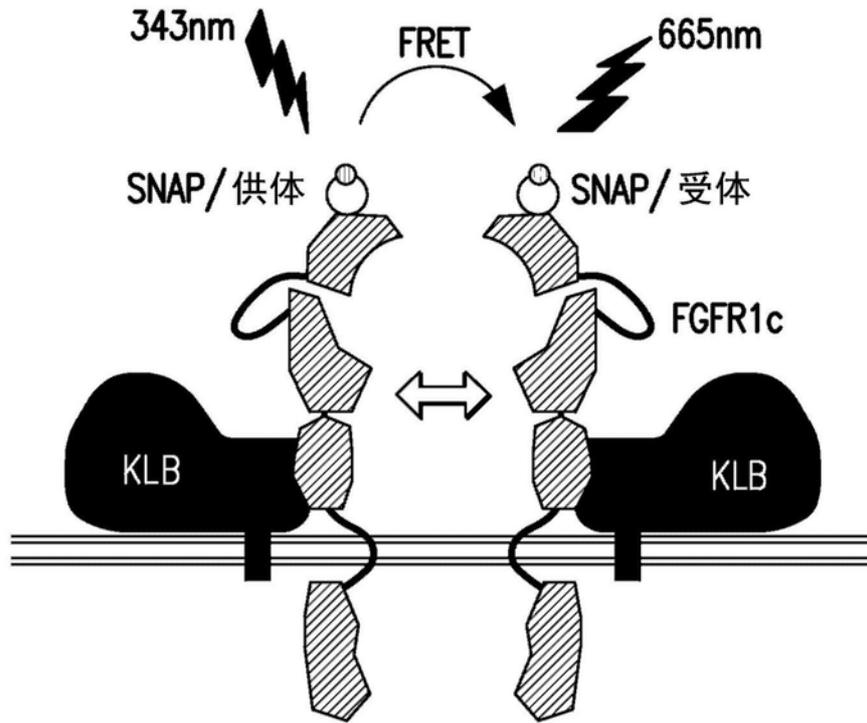


图12A

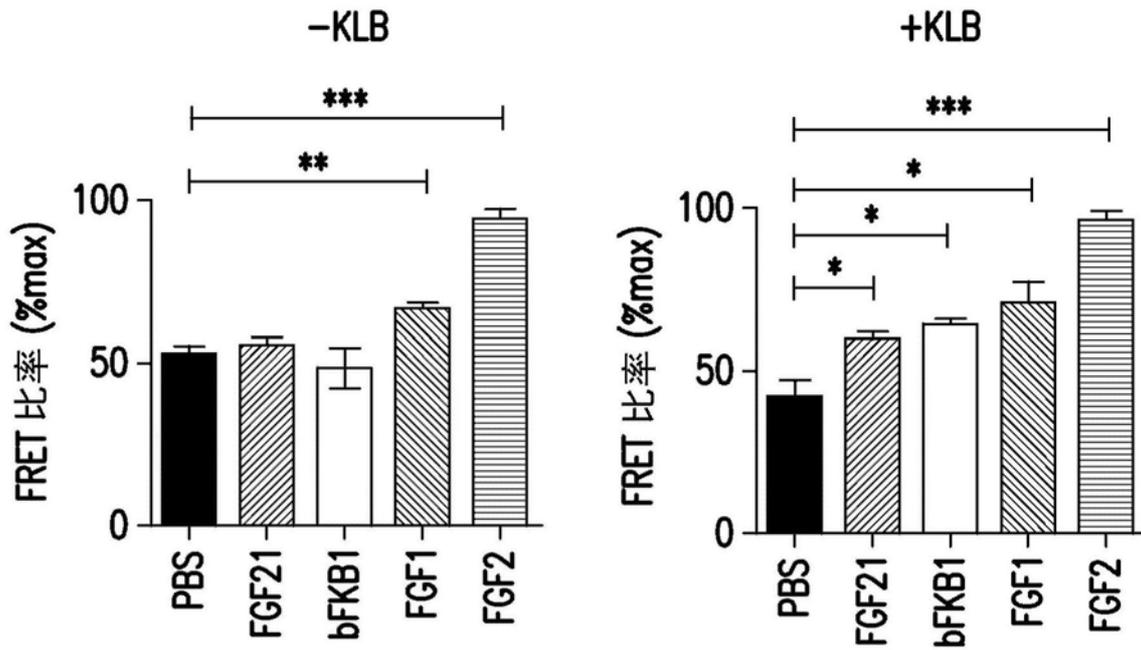


图12B

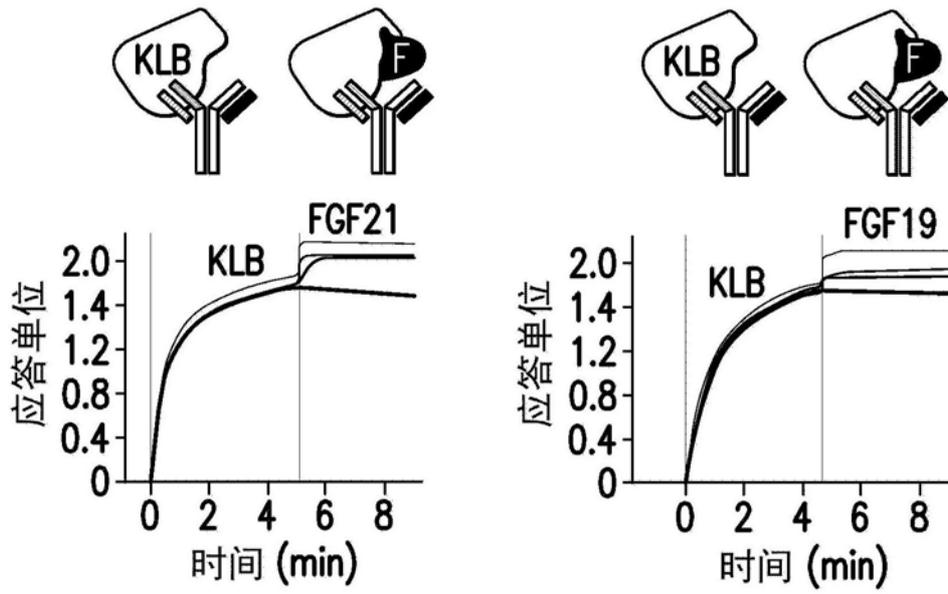


图14A

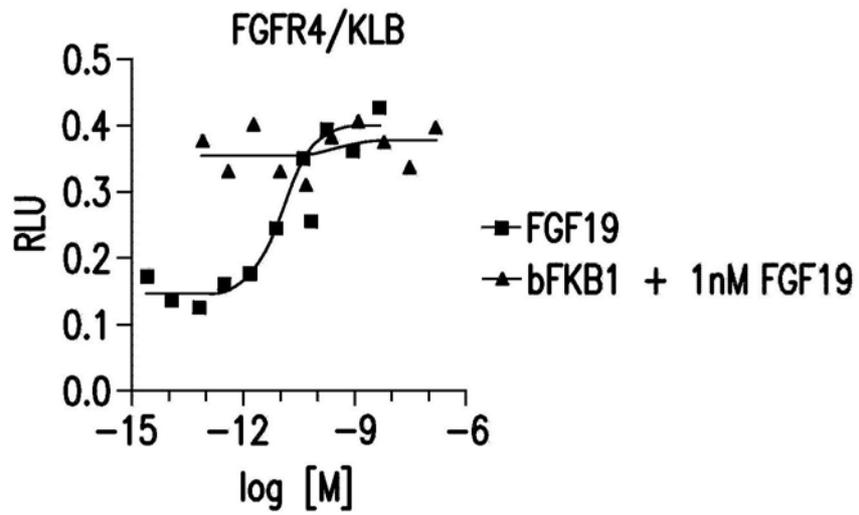


图14B

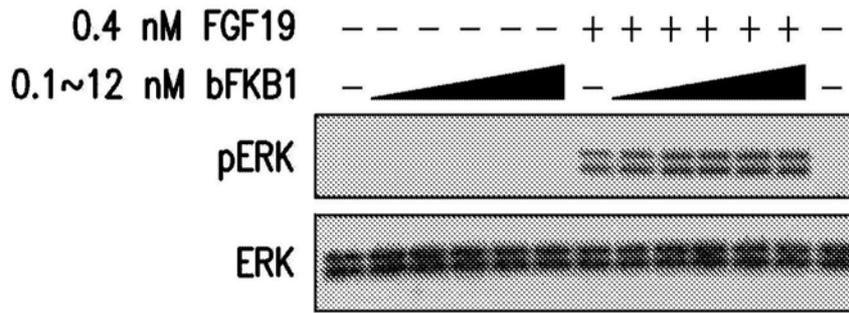


图14C

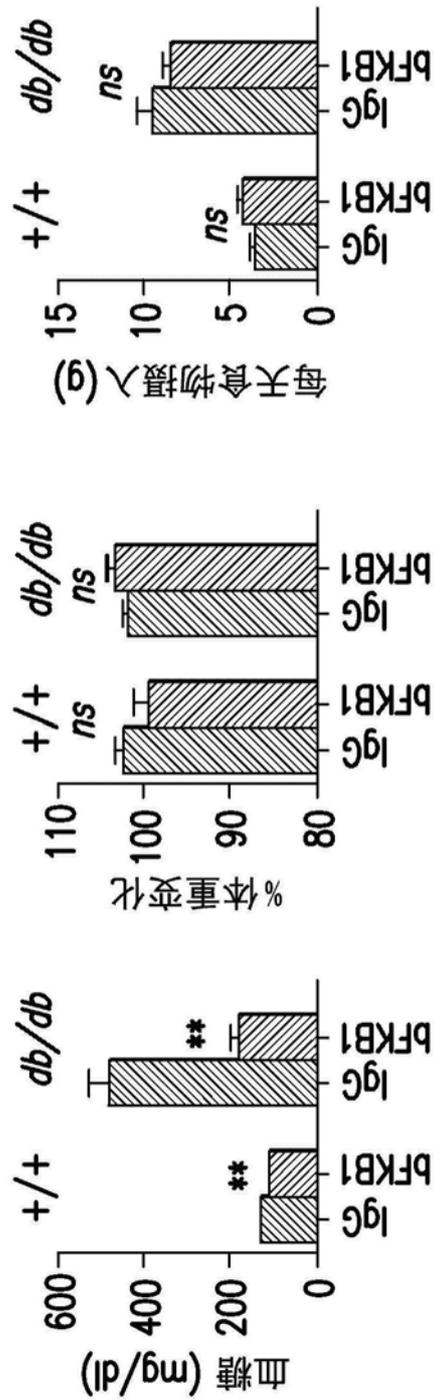


图15A

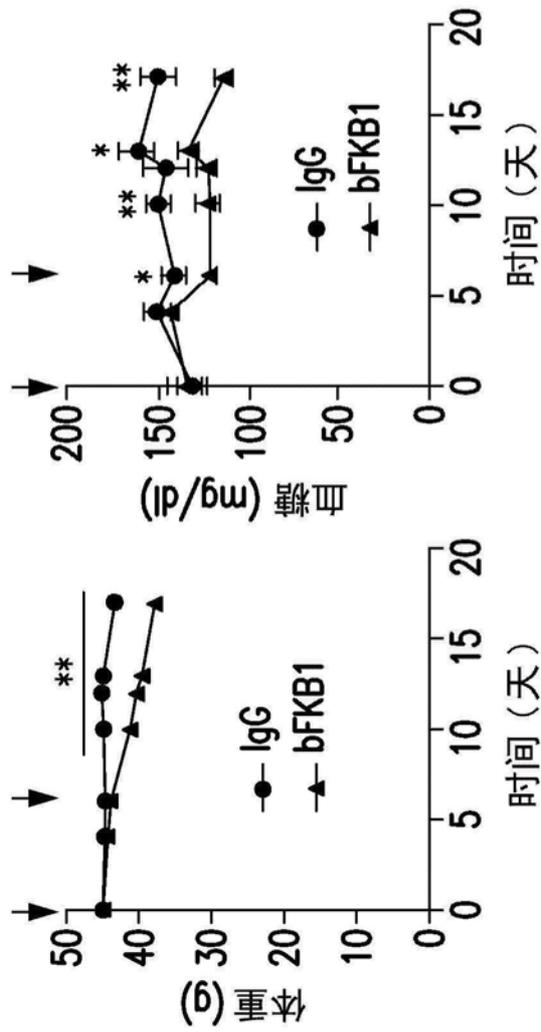


图15B

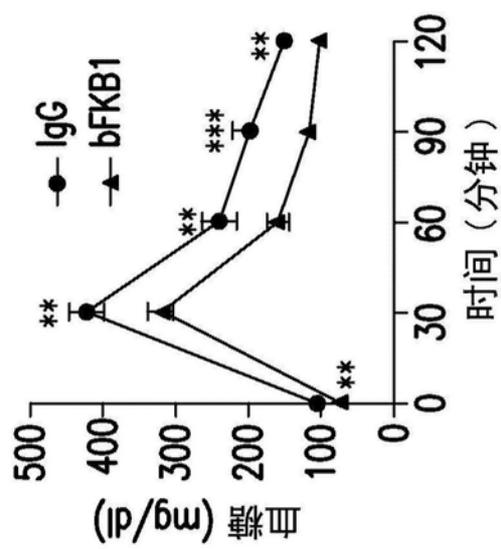


图15C

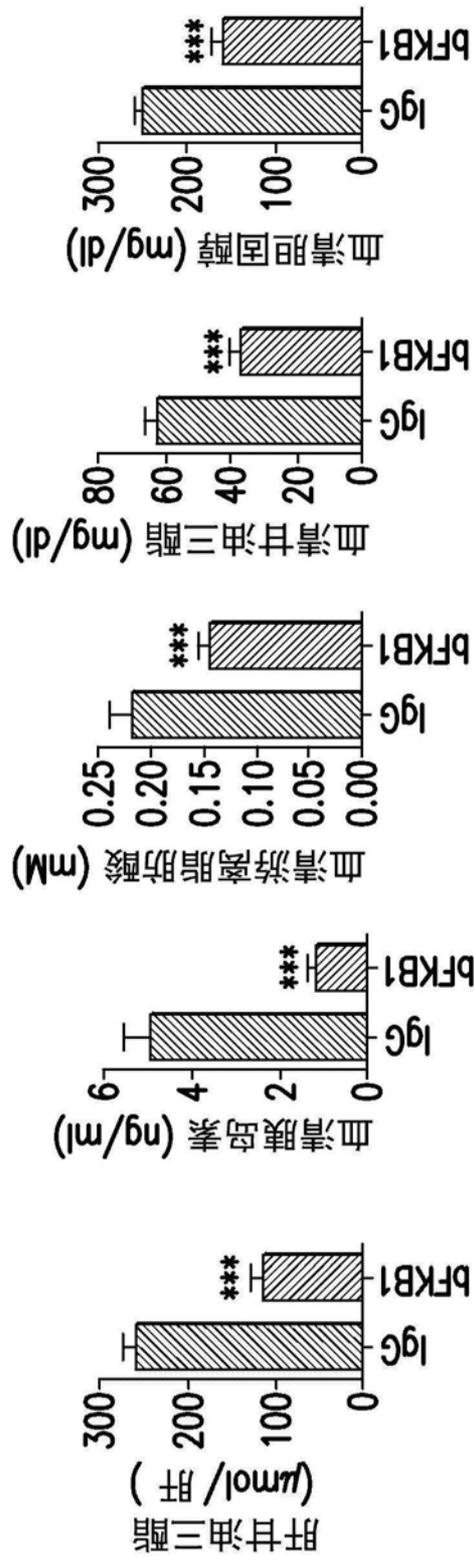


图15D

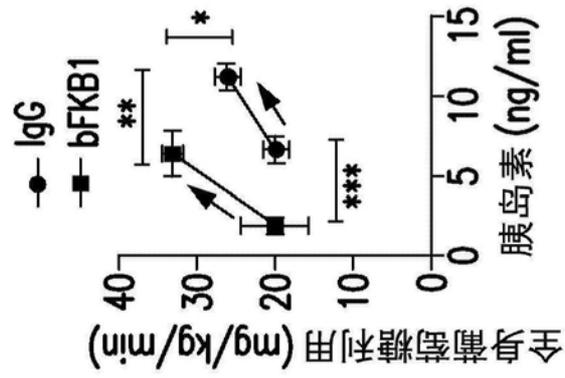


图15E

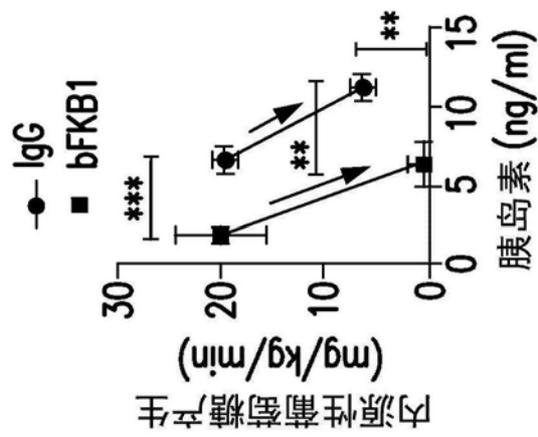


图15F

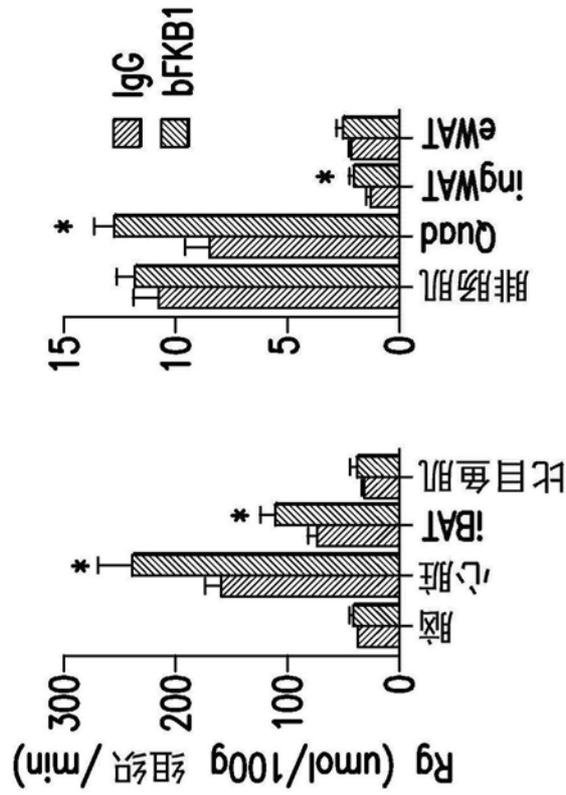


图15G

wt: F S G D G K A I W D K K Q Y V S P ...
 ko: F S E T G K Q Y G I K N S T *

图 16A

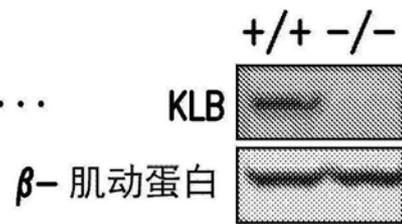


图 16B

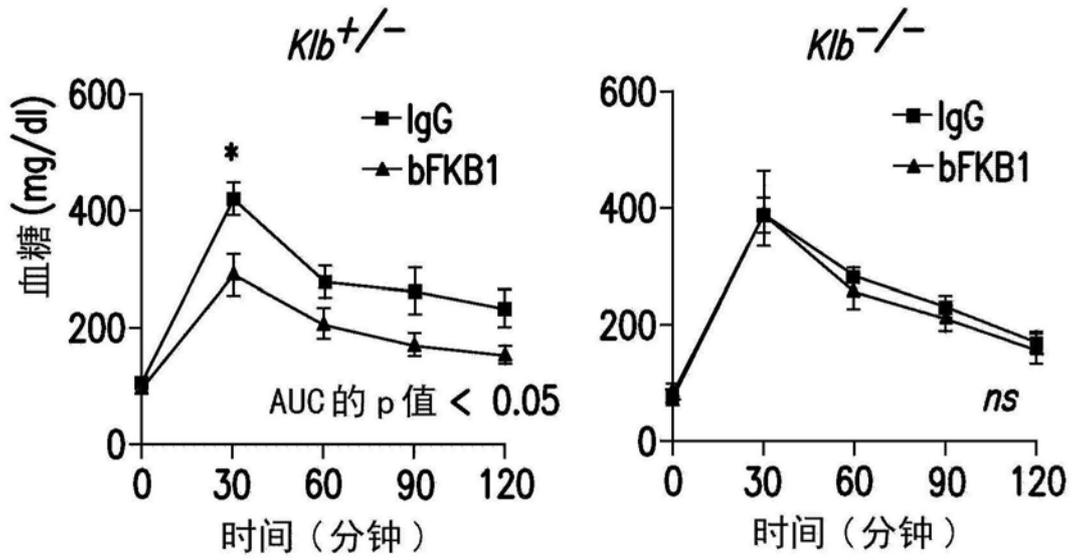


图16C

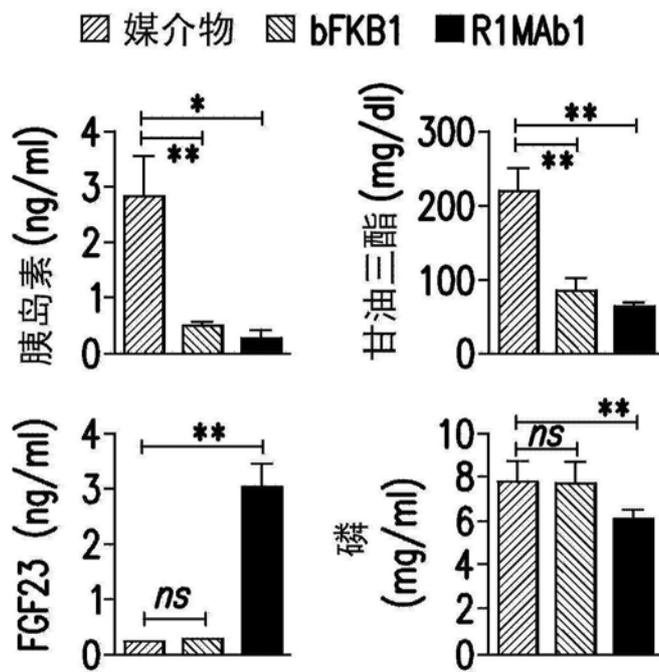


图16D

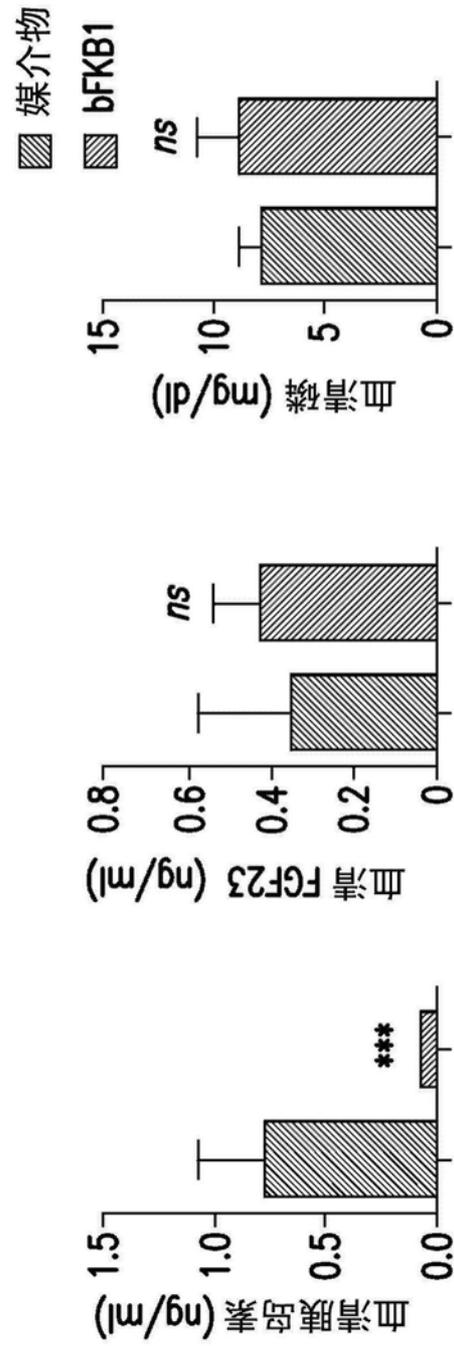


图17

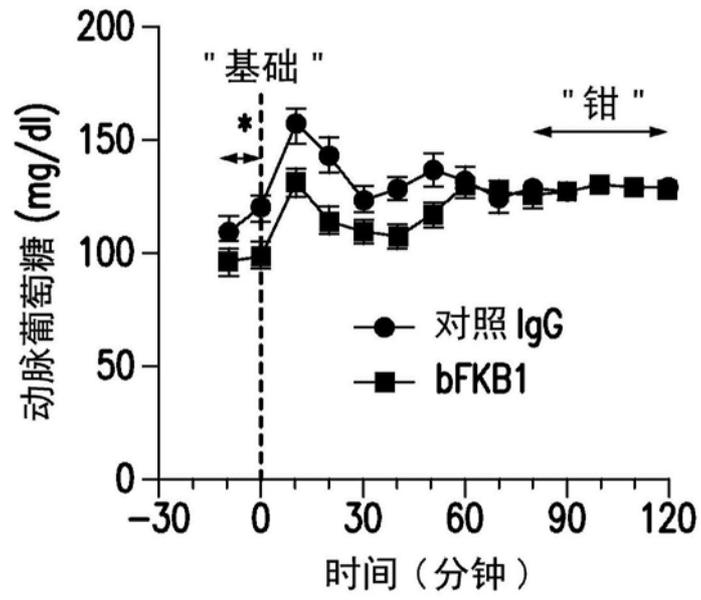


图18A

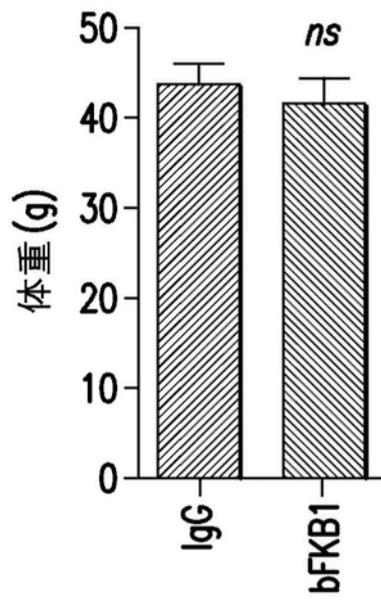


图18B

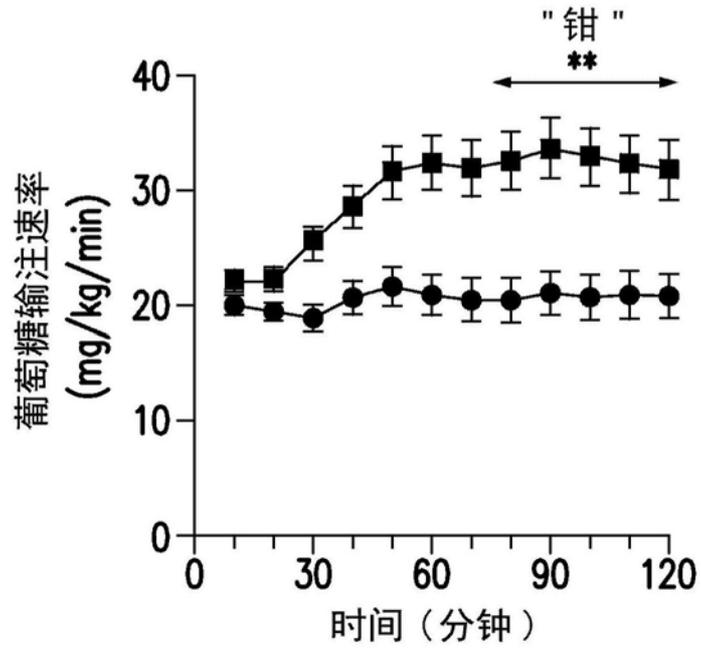


图18C

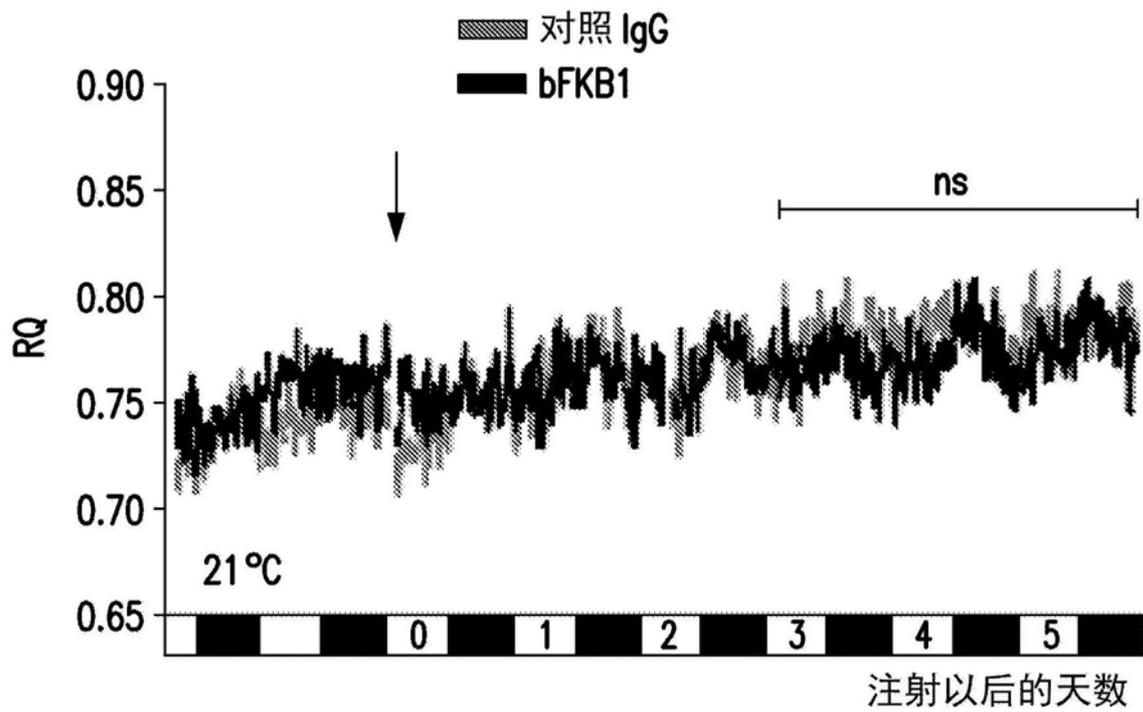
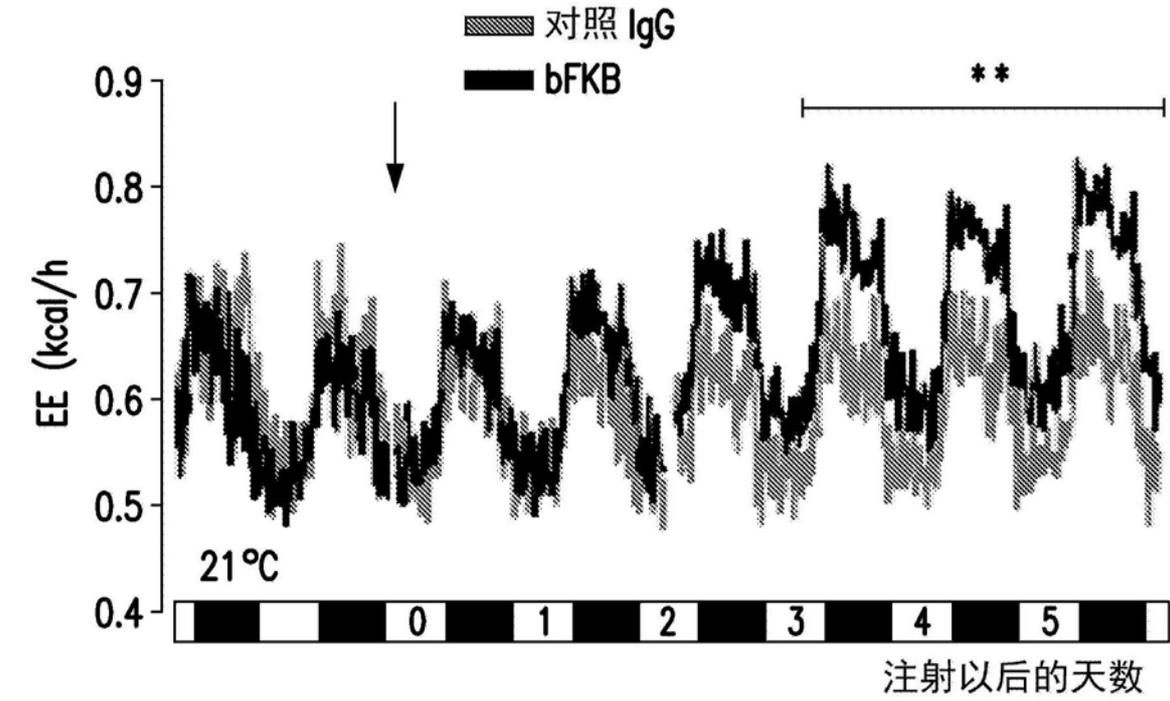


图19A

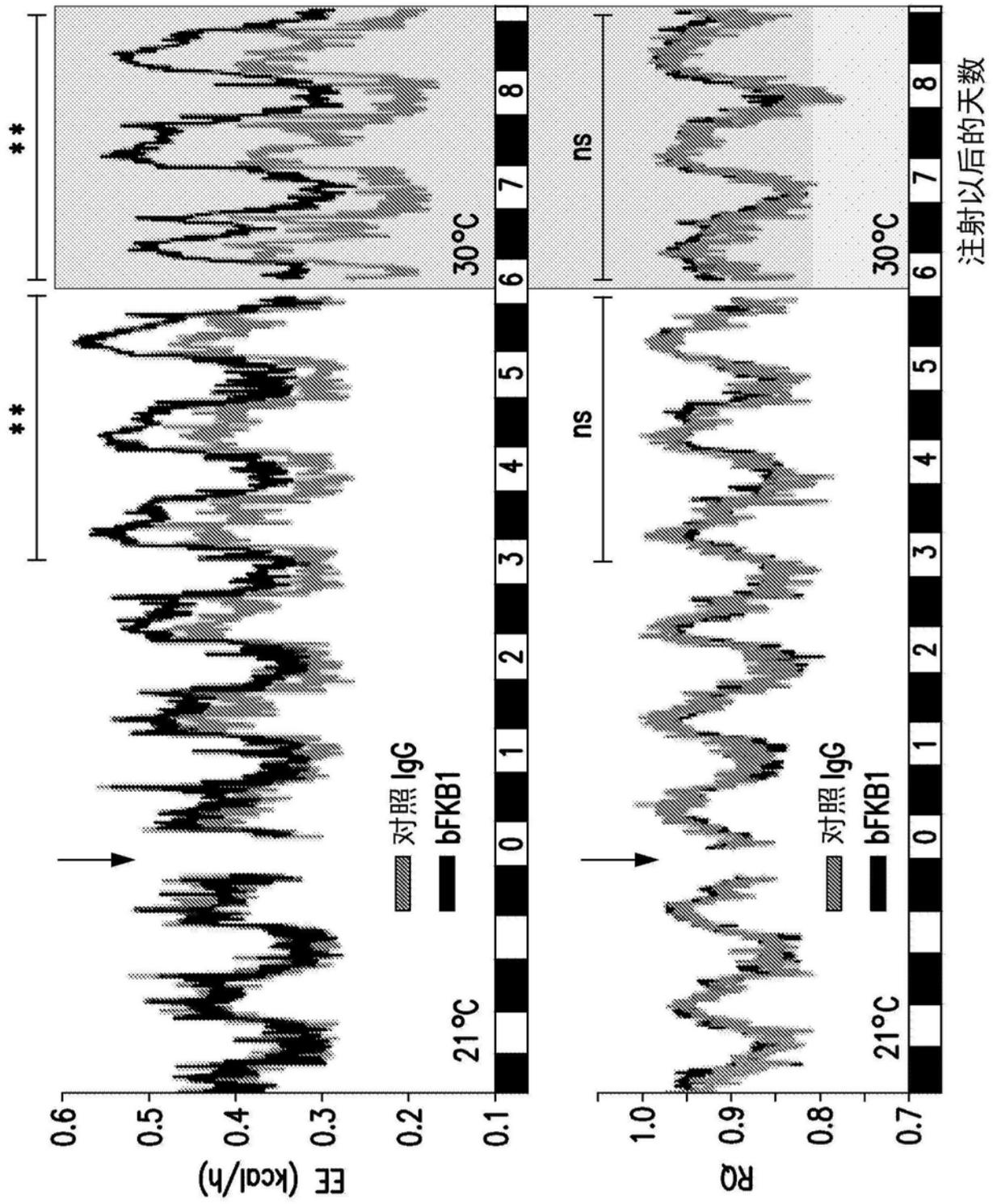


图19B

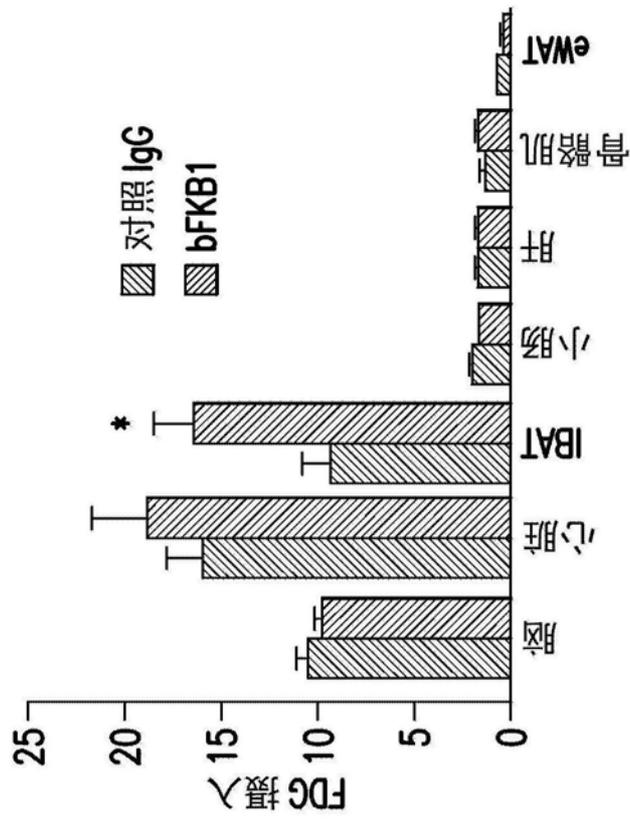


图19C

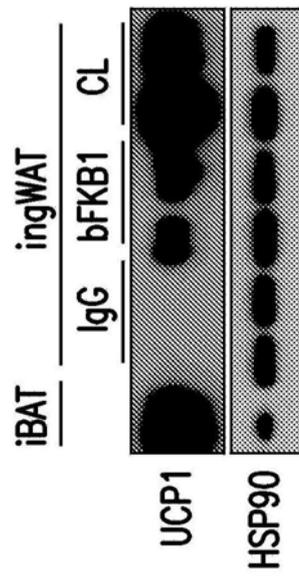


图19D

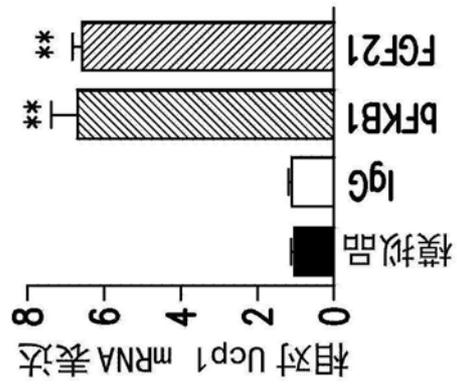


图19E

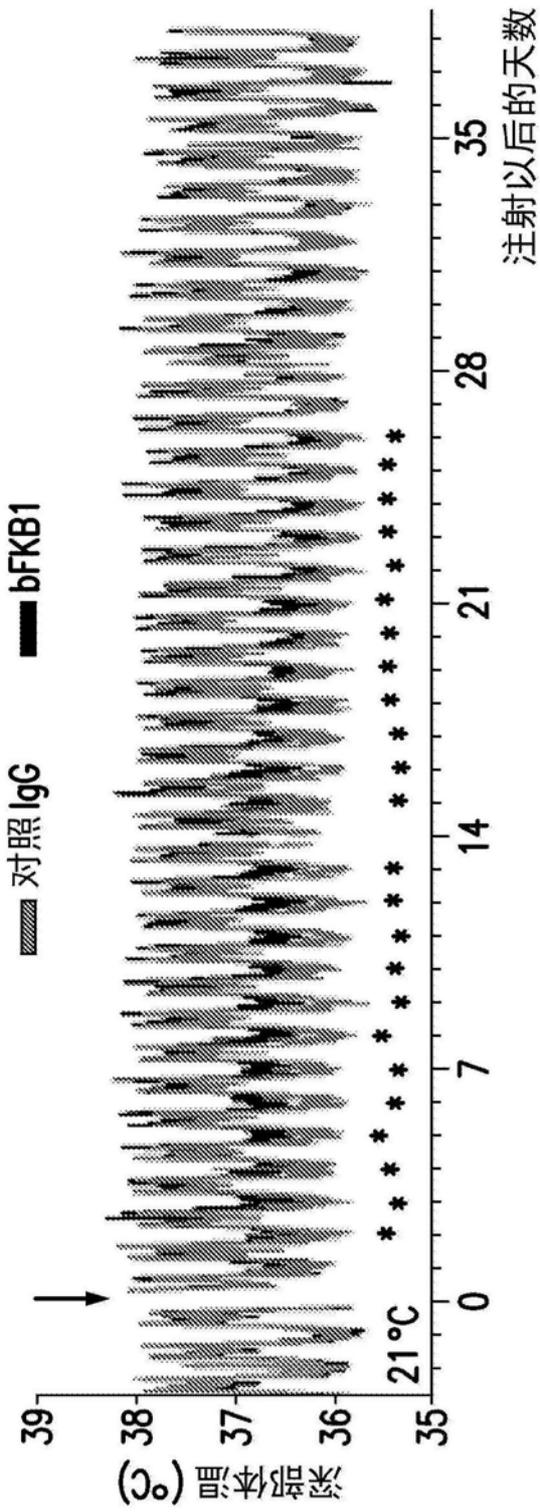


图19F

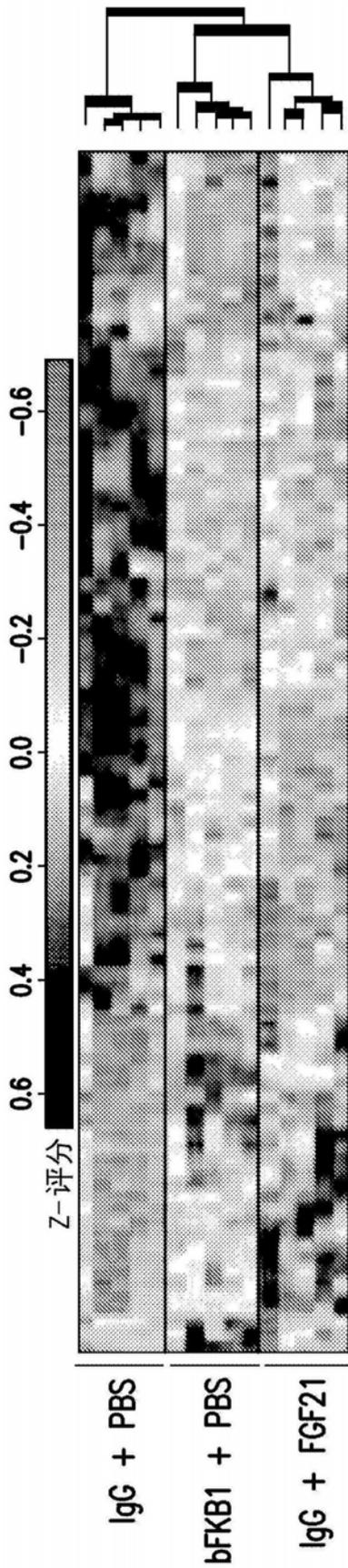


图19G

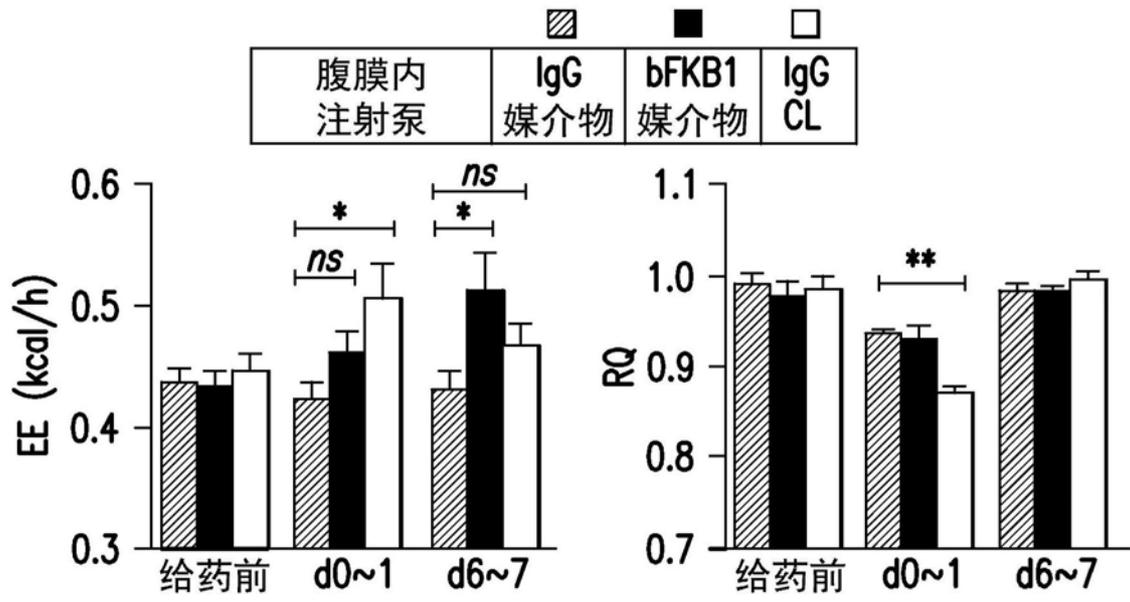


图19H

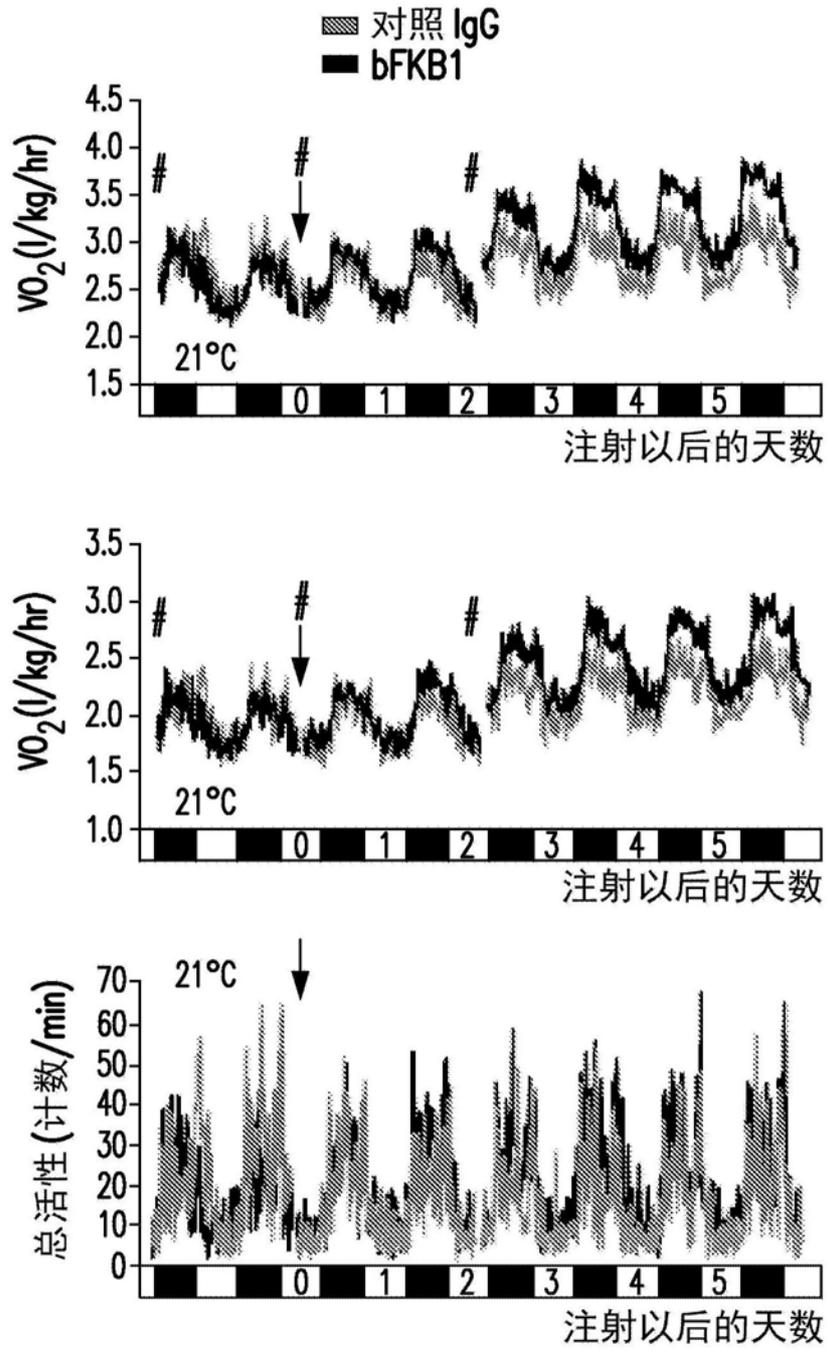


图20A

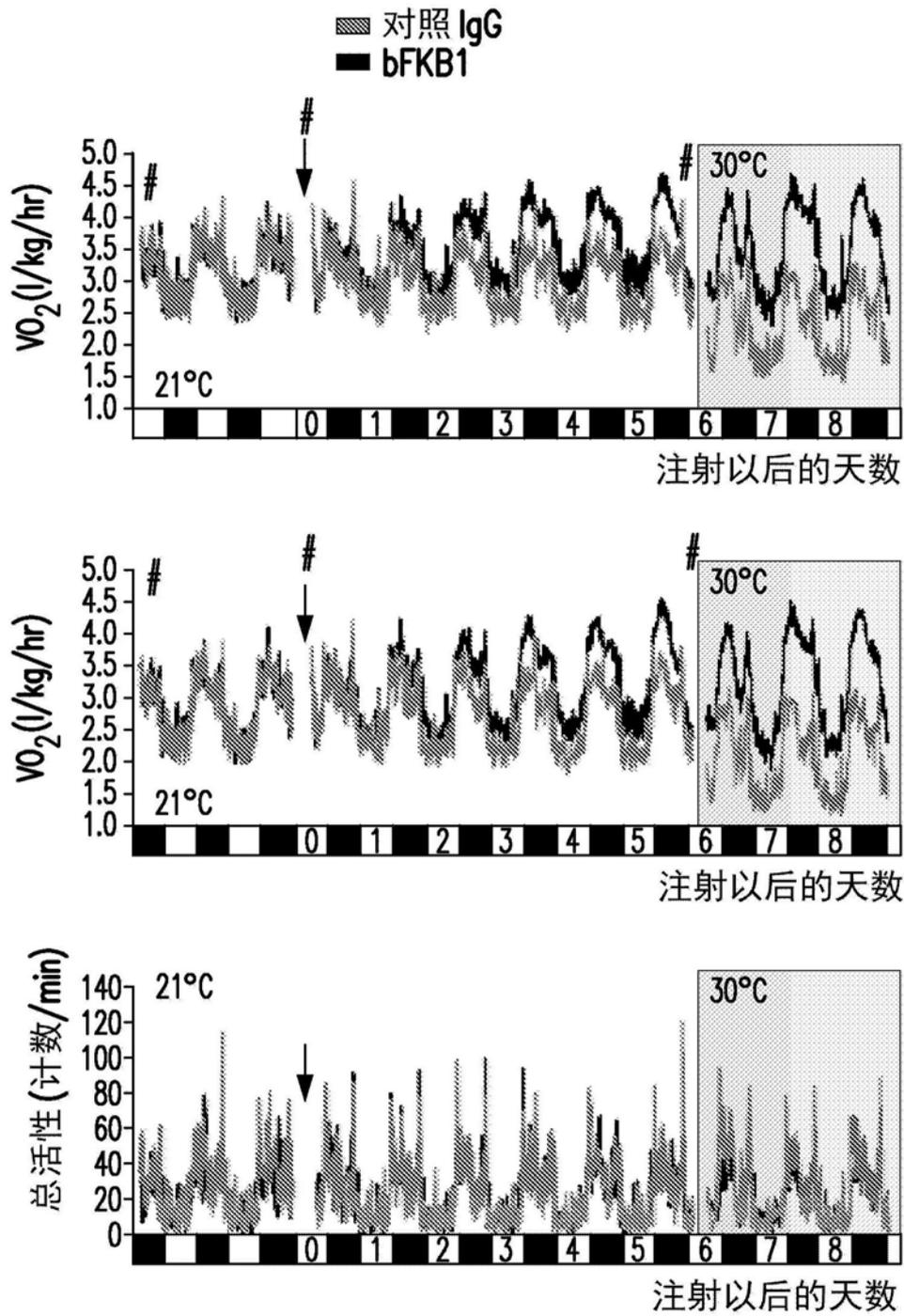


图20B

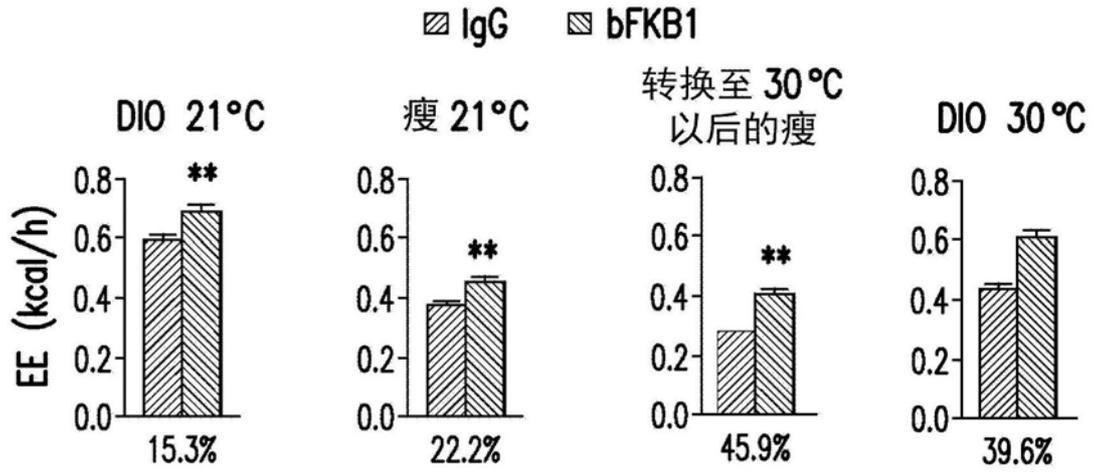


图21A

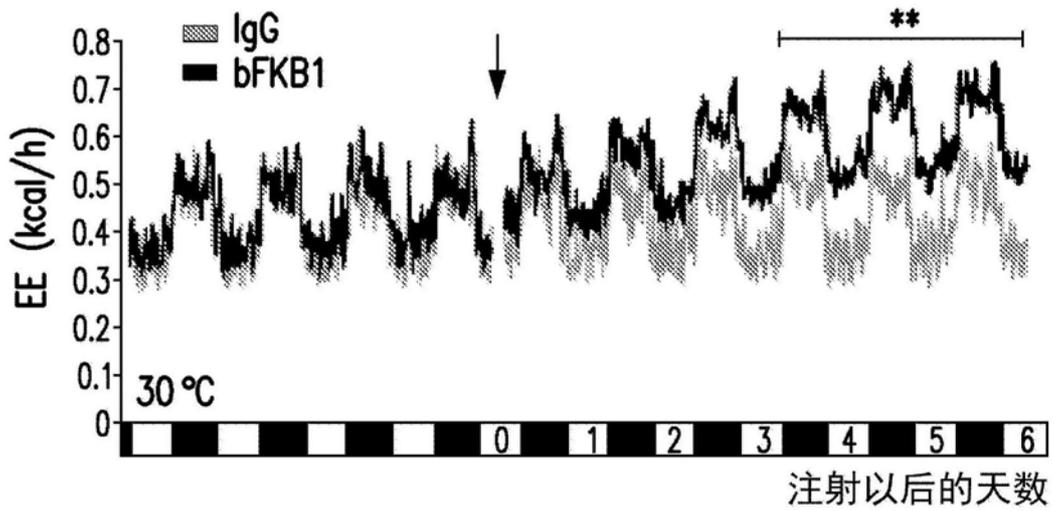


图21B

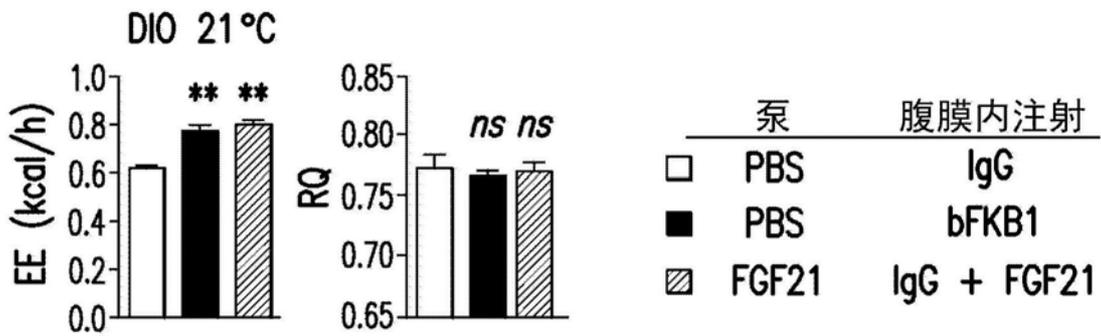


图21C

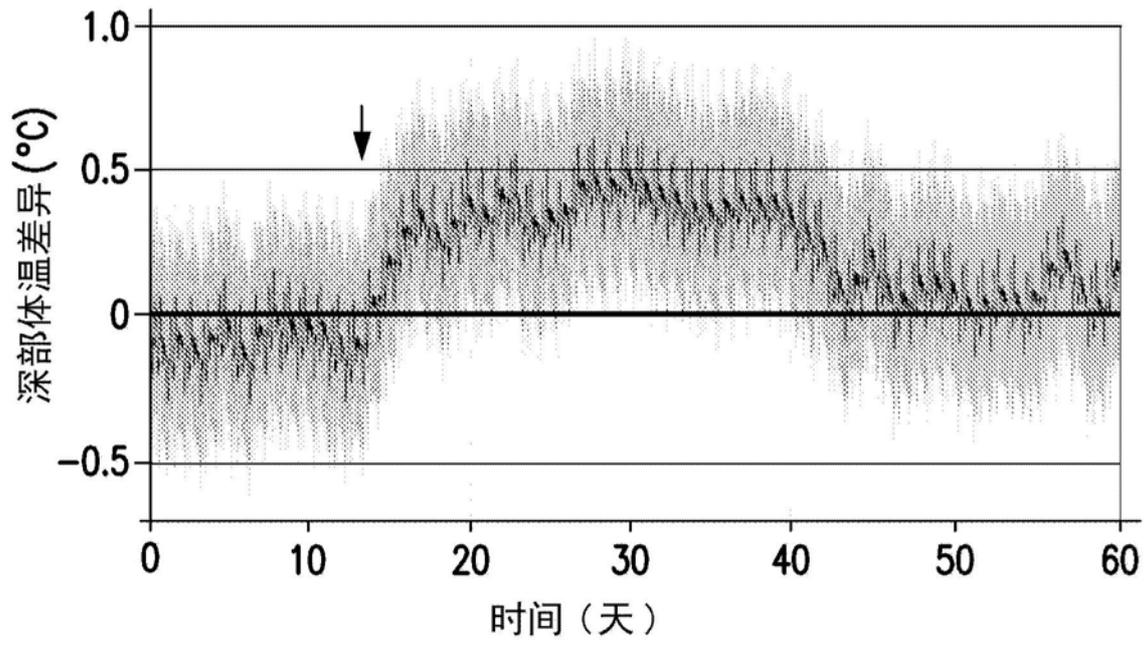


图22

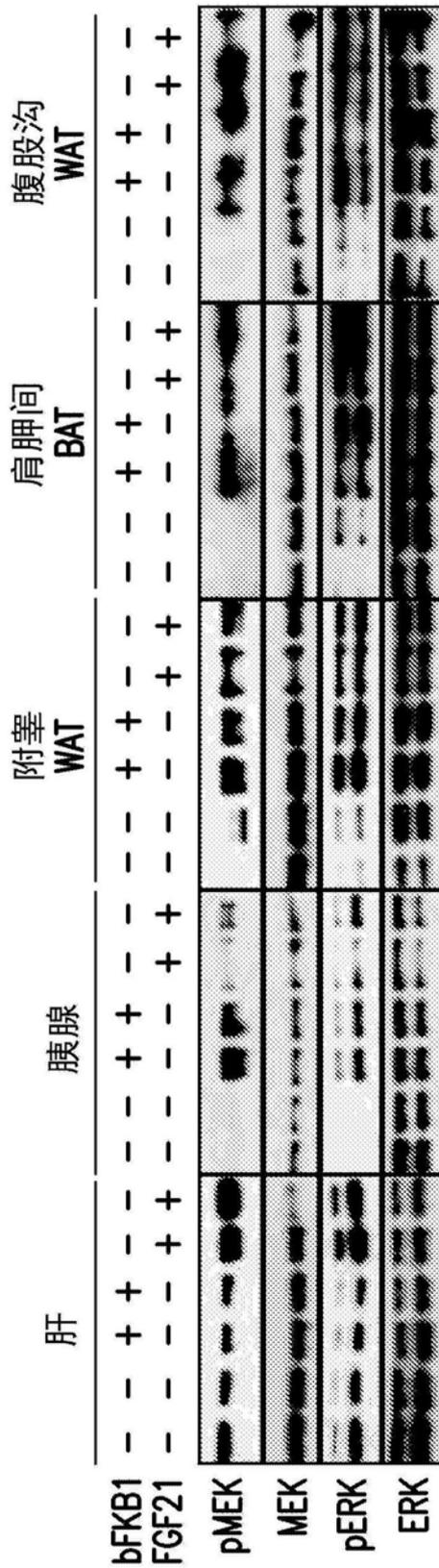


图23

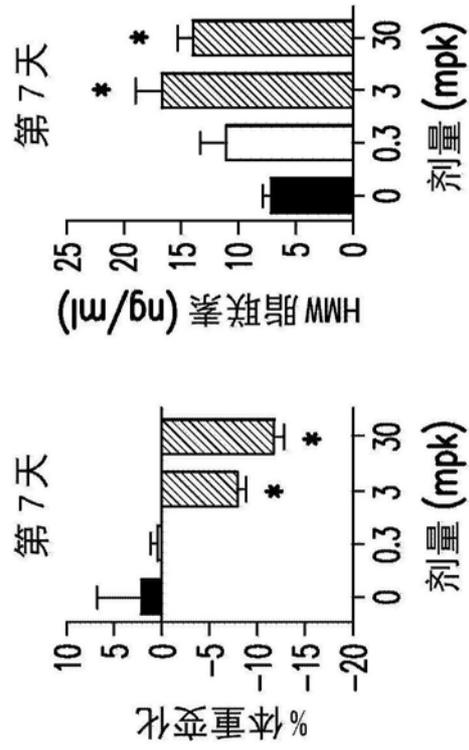


图24A

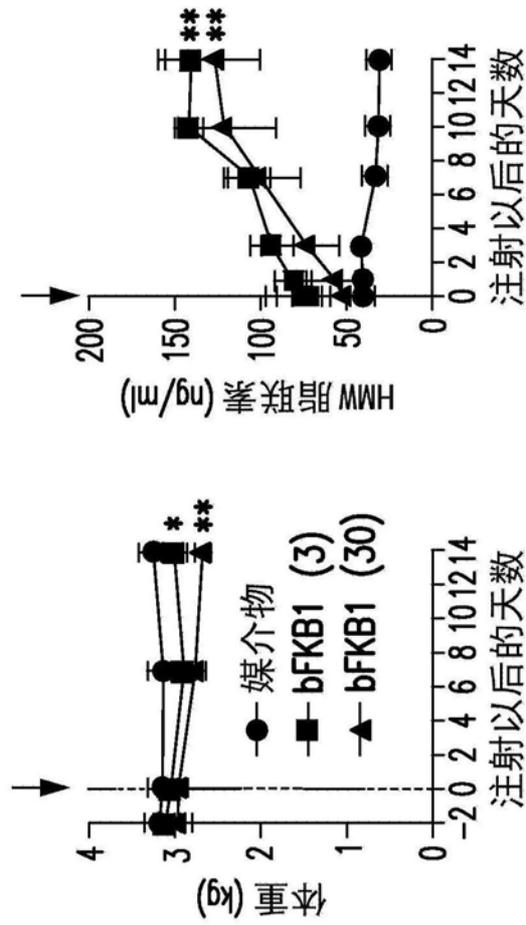


图24B

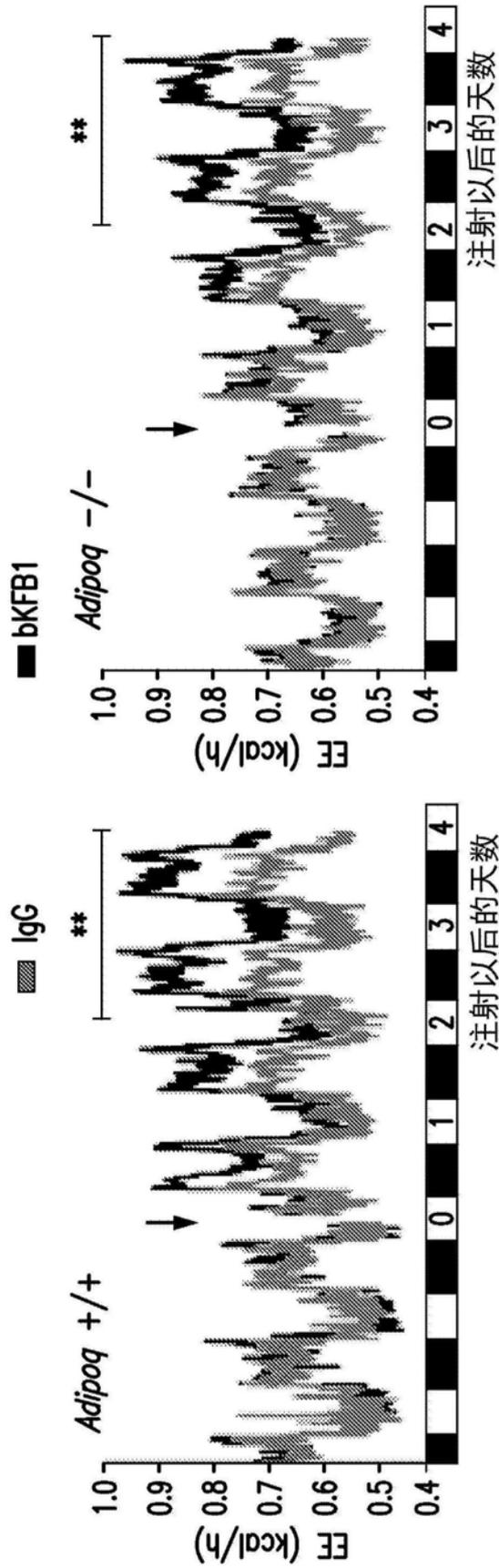


图24C

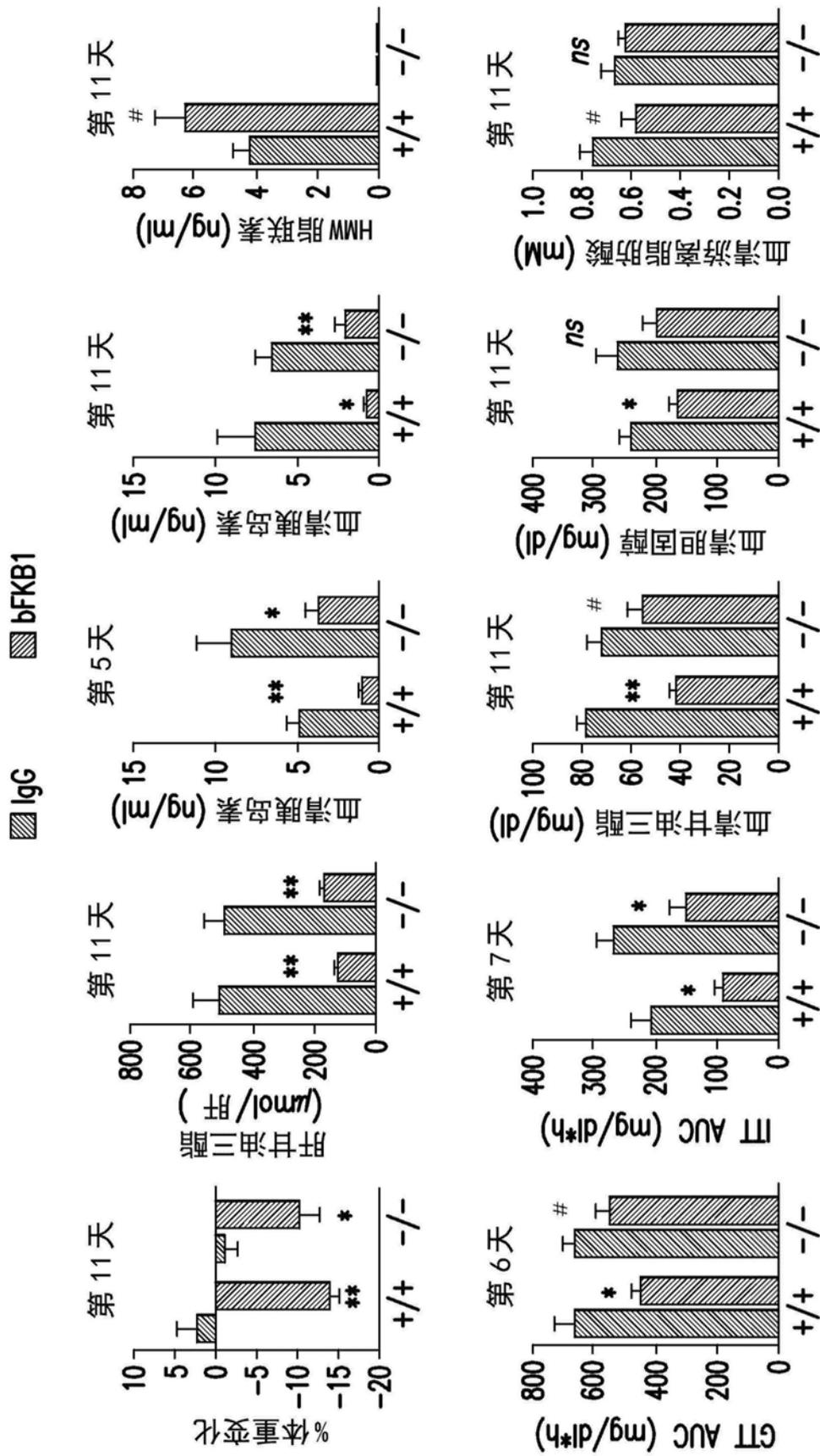


图24D

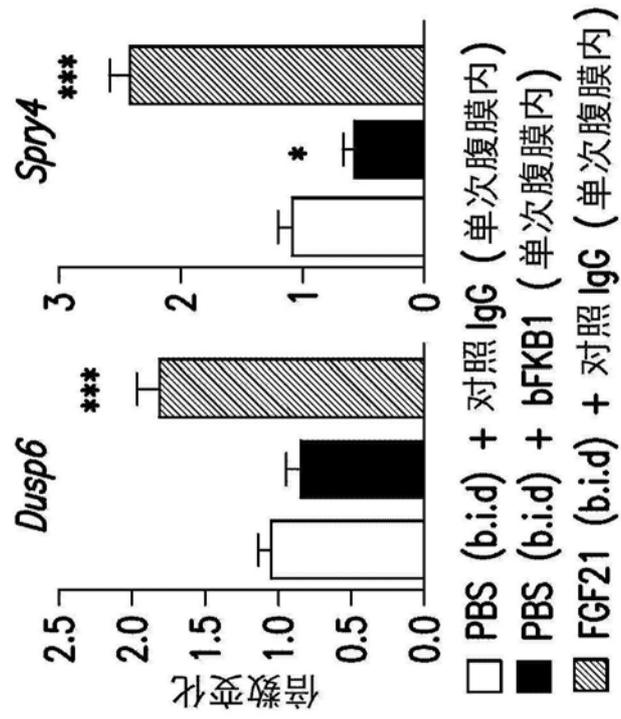


图25

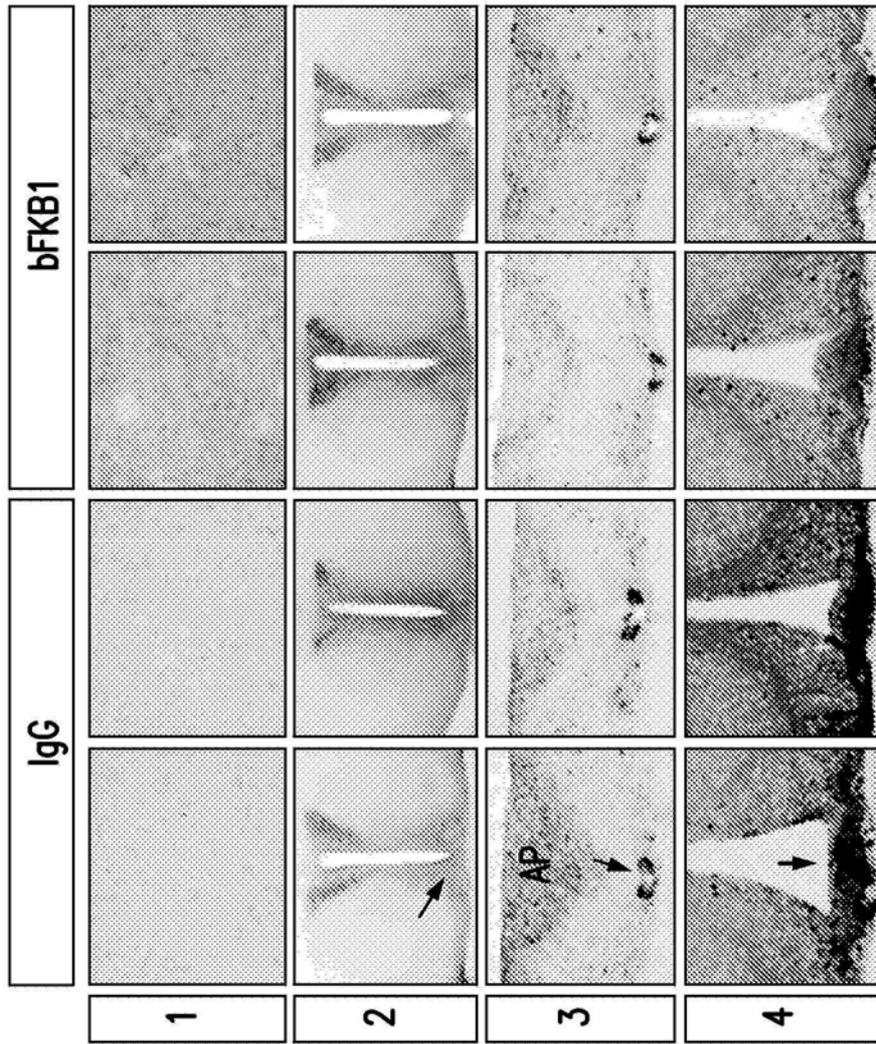


图26

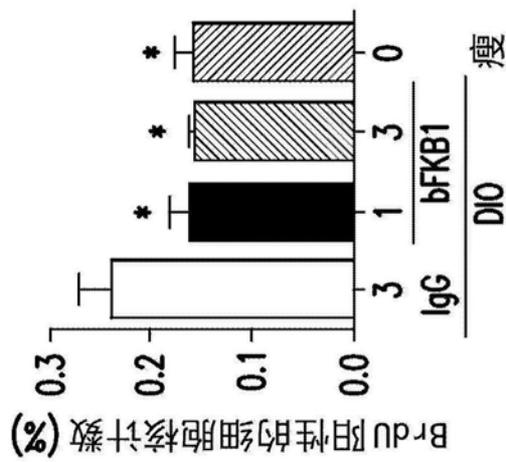


图27

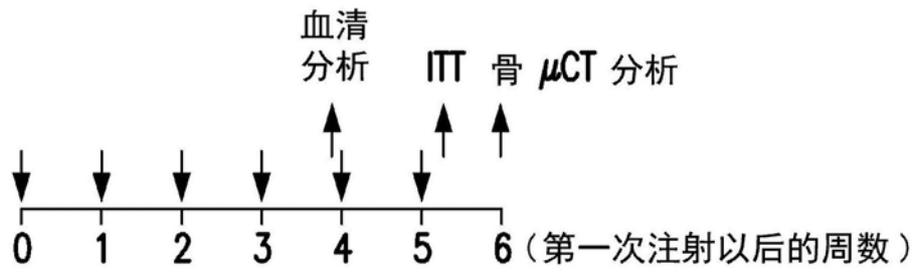


图28A

	对照 IgG	bFKB1 (1 mpk)	bFKB1 (3 mpk)	瘦对照
体重变化 (%)	112.8 ± 1.1	116.6 ± 1.1	102.3 ± 4.7 *	
ITT AUC (h*mg/kg)	226 ± 18	153 ± 15 *	156 ± 23 *	
血清分析				
胰岛素 (ng/ml)	3.87 ± 0.42	2.00 ± 0.54 *	1.37 ± 0.65 *	0.59 ± 0.60 ***
FGF21 (pg/ml)	824 ± 67	754 ± 65	696 ± 62 #	690 ± 60 *
瘦素 (pg/ml)	46.5 ± 2.3	45.6 ± 2.1	32.9 ± 1.9 *	3.20 ± 1.8 ***
HMW 脂联素 (ng/ml)	2802 ± 202	4174 ± 199	5667 ± 299 *	2745 ± 321 *
总胆固醇 (mg/dl)	240.6 ± 9.3	200.7 ± 9.4 **	177.4 ± 9.7 ***	74.6 ± 9.6 ***
甘油三酯 (mg/dl)	41.3 ± 2.7	44.8 ± 2.8	31.9 ± 2.9 §	57.69 ± 2.8 **
FFA (mM)	1.01 ± 0.04	1.04 ± 0.04	0.81 ± 0.04 **	0.77 ± 0.03 **
小梁骨 μ CT 分析				
BV/TV	0.107 ± 0.006	0.114 ± 0.006	0.117 ± 0.010	0.136 ± 0.004 *
骨密度 (mg HA/ccm)	1028 ± 3	1026 ± 6	1033 ± 3	975 ± 6 ***
骨体积 (mm ³)	0.286 ± 0.026	0.327 ± 0.025	0.330 ± 0.033	0.390 ± 0.017 *
总体积 (mm ³)	2.65 ± 0.09	2.86 ± 0.07	2.80 ± 0.10	2.87 ± 0.09
Tb.N (mm ⁻¹)	4.11 ± 0.04	4.08 ± 0.09	4.22 ± 0.13	4.73 ± 0.07 ***
Tb.Th (mm)	0.0517 ± 0.0009	0.0526 ± 0.0008	0.0528 ± 0.0014	0.0477 ± 0.0002 *
Tb.Sp (mm)	0.234 ± 0.003	0.235 ± 0.006	0.228 ± 0.008	0.202 ± 0.003 ***
骨表面积 (mm ²)	13.6 ± 1.0	15.5 ± 1.0	15.3 ± 1.2	19.5 ± 0.9 **
BS/BV(mm ⁻¹)	52.6 ± 1.7	51.3 ± 1.1	51.2 ± 2.1	53.5 ± 0.4
骨皮质 μ CT 分析				
BV/TV	0.404 ± 0.005	0.391 ± 0.005	0.391 ± 0.006	0.393 ± 0.007
骨密度 (mg HA/cm ³)	1236 ± 2	1239 ± 3	1240 ± 22	1243 ± 2 *
骨体积 (mm ³)	2.55 ± 0.06	2.57 ± 0.06	2.46 ± 0.07	2.56 ± 0.09
总体积 (mm ³)	6.33 ± 0.17	6.6 ± 0.23	6.33 ± 0.26	6.52 ± 0.26
骨厚度 (mm)	0.119 ± 0.001	0.116 ± 0.001	0.115 ± 0.001 §	0.115 ± 0.002
骨髓体积 (mm ³)	3.79 ± 0.12	4.05 ± 0.17	3.88 ± 0.22	3.98 ± 0.18

图28B

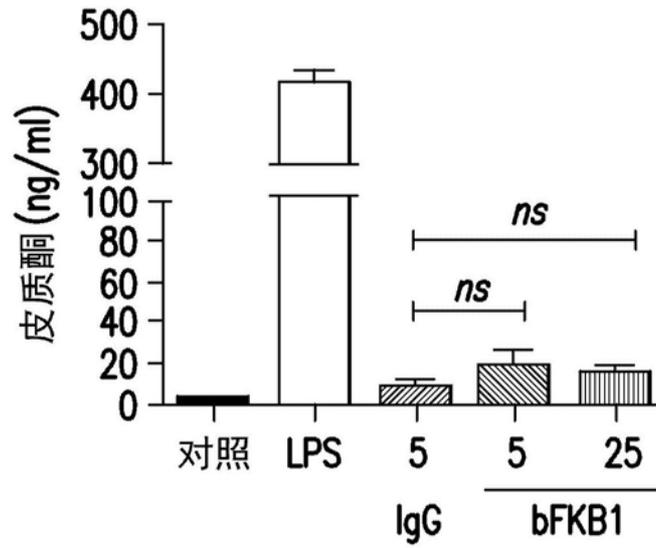


图29

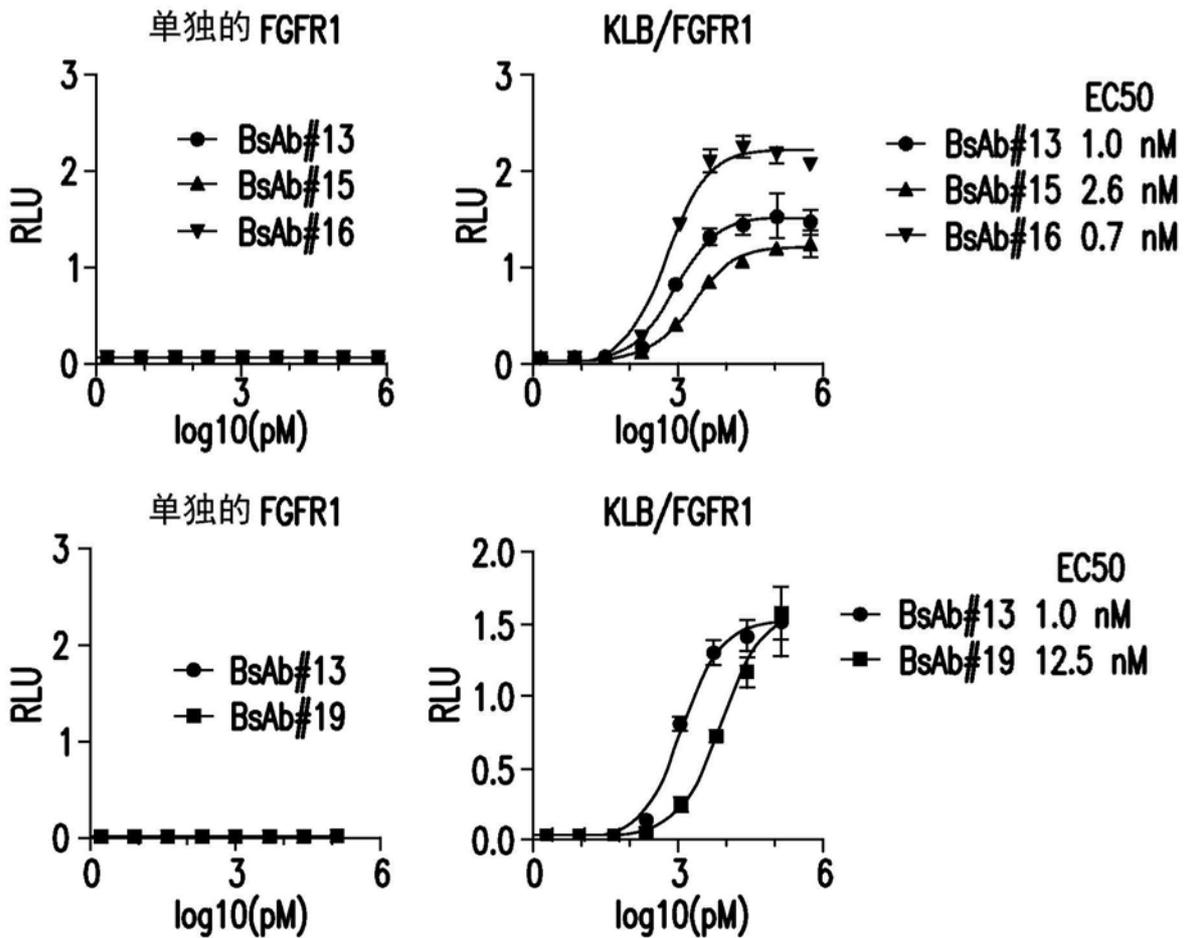


图30

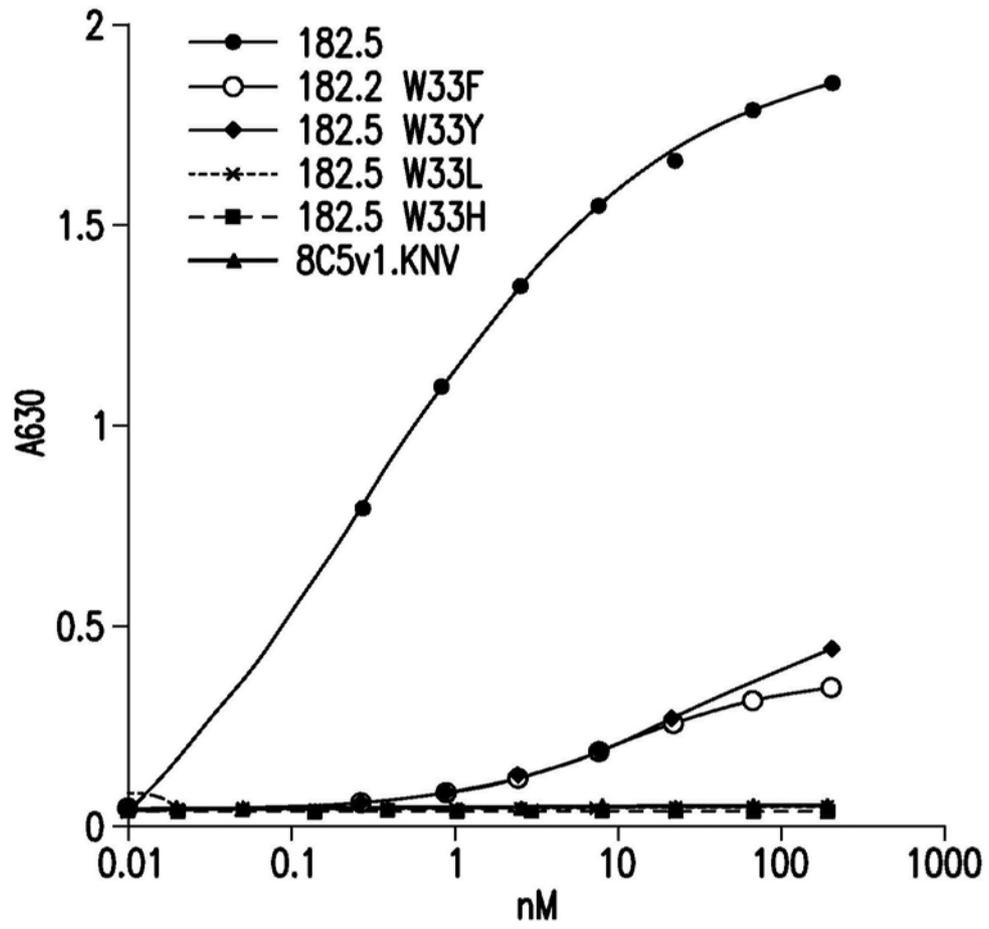


图31