



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.09.29

(21) Номер заявки
201691321

(22) Дата подачи заявки
2014.12.23

(51) Int. Cl. **A61K 39/395** (2006.01)
C07K 14/71 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 61/920,396; 62/081,435

(32) 2013.12.23; 2014.11.18

(33) US

(43) 2017.02.28

(86) PCT/US2014/072245

(87) WO 2015/100366 2015.07.02

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ДЖЕНЕНТЕК ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
**Чэнь Юнмэй, Эрнст Джеймс, Ким Хок
Сеонь, Сонода Юничиро (US), Шписс
Кристоф (DE), Ставицки Скотт, У Янь
(US)**

(74) Представитель:
**Лыу Т.Н., Угрюмов В.М., Гизатуллина
Е.М., Глухарёва А.О., Дементьев
В.Н., Карпенко О.Ю., Клюкин В.А.,
Строкова О.В., Христофоров А.А.
(RU)**

(56) WO-A1-2012158704
WO-A1-2011071783
WO-A2-2011130417

RICHARD SMITH ET AL.: "FGF21 Can Be Mimicked In Vitro and In Vivo by a Novel Anti-FGFR1c/[beta]-Klotho Bispecific Protein", PLOS ONE, vol. 8, no. 4, 22 April 2013 (2013-04-22), page e61432, XP055107151, DOI: 10.1371/journal.pone.0061432, page 2, left-hand column, paragraph 4 - right-hand column, paragraph 3; figures 1, 2, page 4, left-hand column, paragraph 2 - right-hand column, paragraph 1, page 8, left-hand column, paragraph 3 - page 9, left-hand column,

paragraph 1, page 9, right-hand column, paragraph 2 - page 10, right-hand column, paragraph 1

FOLTZ IAN N. ET AL.: "Treating Diabetes and Obesity with an FGF21-Mimetic Antibody Activating the [beta] Klotho/FGFR1c, Receptor Complex", SCIENCE TRANSLATIONAL MEDICINE, US, vol. 4, no. 162 (162ra153), 28 November 2012 (2012-11-28), pages 1-10, XP009166047, ISSN: 1946-6242, DOI: 10.1126/SCITRANSLMED.3004690, abstract, page 1, left-hand column, paragraph 1 - page 2, left-hand column, paragraph 2; figure 1, page 4, left-hand column, paragraph 1 - page 6, left-hand column, paragraph 1

KATO YUKINARI ET AL.: "Establishment of the anti-Klotho monoclonal antibodies and detection of Klotho protein in kidneys", BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC., ORLANDO, FL, US, vol. 267, no. 2, 19 January 2000 (2000-01-19), pages 597-602, XP002572556, ISSN: 0006-291X, DOI:10.1006/BBRC.1999.2009, page 598, left-hand column, paragraphs 5, 6 page 599, right-hand column, paragraph 2 - page 601, left-hand column, paragraph 1

NENG-MING XIAO: "Klotho is a serum factor related to human aging", CHINESE MEDICAL JOURNAL, vol. 117, no. 5, 1 January 2004 (2004-01-01), pages 742-747, XP055177316, the whole document

ANONYMOUS: "Monoclonal Anti-human/mouse, Klotho beta Antibody", INTERNET CITATION, 6 February 2007 (2007-02-06), page 1, XP002624719, Retrieved from the Internet: URL:http://www.rndsystems.com/pdf/MAB3738.pdf [retrieved on 2011-02-21], the whole document

(57) Описаны антитела, которые связывают KLB и FGFR1, а также способы применения указанных антител. В некоторых вариантах воплощения антитело в соответствии с описанием включает биспецифическое антитело, которое связывает эпитоп, присутствующий на FGFR1, и связывает эпитоп, присутствующий на KLB.

Притязание на приоритет

Эта заявка испрашивает приоритет согласно предварительной патентной заявке США номер 61/920396, поданной 23 декабря 2013 г., и предварительной патентной заявке США номер 62/081435, поданной 18 ноября 2014, которые включены в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Перечень последовательностей

Настоящая заявка содержит перечень последовательностей, который был представлен в электронном виде в формате ASCII и включен в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте. Указанная копия ASCII, созданная 22 декабря 2014 года, имеет название 00B206.0170_SL.txt и размер 155,738 байт.

Область техники

Изобретение относится к антителам, которые связываются с бета-Клото (KLB), рецептором фактора роста фибробластов 1 (FGFR1) или с тем и другим, и способам их применения.

Уровень техники

Фактор роста фибробластов 21 (FGF21) и его ближайший гомолог FGF19 являются членами надсемейства FGF. Для осуществления сигналинга FGF21 необходимо присутствие изоформ FGF-рецептора (FGFR) и мембраносвязанного корецептора бета-Клото (KLB) (Ogawa et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104(18): 7432-37 (2007); US 2010/0184665). Также показано, что FGF19 осуществляет сигналинг через изоформы FGFR, находящиеся в комплексе с KLB (Wu et al. J. Biol. Chem. 282(40): 29069-29072 (2007)). Из 7 основных изоформ FGFR, присутствующих у млекопитающих (1b, 2b, 3b, 1c, 2c, 3c и 4), только три изоформы - FGFR1c, 2c и 3c - способны передавать сигнал и от FGF19, и от FGF21 в случае связывания с корецептором KLB, который преимущественно экспрессируется в печени, жировой ткани и поджелудочной железе (Goetz and Mohammadi, Nature reviews. Molecular Cell Biology 14, 166-180 (2013)). Из этих рецепторов FGFR1c, по-видимому, играет ведущую роль в опосредовании метаболического эффекта FGF21. Не желая быть связанными какой-либо теорией, авторы полагают, что FGF21 действует, вызывая гомодимеризацию изоформ FGFR в присутствии мембраносвязанного корецептора KLB. В отличие от других FGF-лигандов, FGF21 демонстрирует очень низкое сродство к любому из FGFR. Тем не менее, высокое сродство связывания с KLB через C-концевую область привлекает FGF21 к комплексу FGFR/KLB, позволяя FGF21 взаимодействовать с рецептором FGFR, несмотря на низкое сродство только к FGFR.

FGF21 был идентифицирован как сильнодействующий модифицирующий заболевания белковый агент, позволяющий лечить такие заболевания, как ожирение и диабет типа 2 в моделях заболеваний на животных (Kharitonov et al. J. Clin. Invest. 115(6): 1627-35 (2005)). Было показано, что рекомбинантный FGF21 приводил к снижению уровня липидов в печени, повышал чувствительность к инсулину и нормализовывал гликемический контроль у мышей, дефицитных по сигналингу лептина (ob/ob или db/db), или у мышей с диетой с высоким содержанием жиров (FIFD). Снижение уровня глюкозы в крови и улучшения в показателях различных факторов сердечно-сосудистого риска также наблюдались у страдающих ожирением и диабетом макаков-резусов, получавших ежедневно рекомбинантный FGF21. Было показано, что FGF21 и FGF19 активируют функцию термогенина в жировой ткани, положительной по разобщающему белку 1 (UCP1) (коричневая и бежевая жировые ткани; BAT) у грызунов, страдающих ожирением (Fu et al., Endocrinology 145, 2594-2603 (2004); Coskun et al., Endocrinology 149, 6018-6027 (2008); Fisher et al., Genes & Development 26, 271-281 (2012)).

Хотя клиническое применение рекомбинантных аналогов FGF21 или FGF19 в настоящее время находится на стадии испытаний для лечения метаболических заболеваний, их разработка для терапевтического вмешательства оказалось сложной задачей. Так, например, для приматов, не включающих человека, время полувыведения FGF21 в сыворотке крови составляет примерно 2 ч и является слишком коротким для практического клинического применения, а оставшийся в кровяном русле белок FGF21 может быстро инактивироваться путем протеолитического расщепления. Были предприняты попытки улучшить эти свойства с помощью белковой инженерии, но такие изменения могут усилить иммуногенность и другие побочные эффекты, характерные для модификации. Другой серьезной проблемой является возможное возникновение долгосрочных побочных эффектов от хронической терапии FGF21. Например, сообщалось, что FGF21 способен индуцировать резистентность печени к гормону роста путём индукции SOCS2, ингибитора сигналинга рецептора гормона роста (Inagaki et al., Cell Metab. 8: 77-83 (2008)). У человека резистентность к гормону роста или его недостаток ассоциированы с низкой костной массой у детей и взрослых, а трансенная сверхэкспрессия FGF21 или введение мышам в течение двух недель рекомбинантного FGF21 приводят к значительной потере минеральной плотности костной ткани. Еще не было показано, что связанные с костной тканью побочные эффекты FGF21 могут быть отделены от его полезных метаболических эффектов. Кроме того, трансенная сверхэкспрессия FGF19 может привести к гепатоцеллюлярному канцерогенезу через активацию рецептора FGF (FGFR) 4 (Fu et al., Endocrinology 145, 2594-2603 (2004); Tomlinson et al., Endocrinology 143, 1741-1747 (2002); French et al., PLoS One 7, e36713 (2012)).

Рекомбинантные моноклональные антитела (Ab) могут выступать в качестве мощного терапевтиче-

ского средства, так как могут обеспечить высокую селективность к мишени, превосходный фармакокинетический профиль и другие свойства, важные для фармацевтического агента (Chan and Carter, *Nature reviews, Immunology*, 10, 301-316 (2010)). Например, было показано, что антитело-антагонист, специфичное к FGFR1c, способно вызывать потерю веса у мышей и обезьян (WO 2005/037235), а опосредованная антителом-антагонистом селективная активация FGFR1c является достаточной для восстановления чувствительности к инсулину FGF21 у мышей с диабетом (WO 2012/158704; Wu et al. *Science Translational Med.*, 3(113): 1-10 (2011)). Антитела, которые связываются с комплексом KLB/FGFR1c, были предложены в качестве активаторов/терапевтических агентов (US 7537903; WO 2011/071783; WO 2012/158704). Другими авторами были предложены два альтернативных подхода для избирательной активации комплекса FGFR1c/KLB: с использованием анти-KLB антитела с высокой аффинностью mimAb1 (Foltz et al. *Sci. Transl. Med.* 4: 162ra153 (2012)) и биспецифического полипептида авимера C3201 против FGFR1/KLB, связанного с человеческим сывороточным альбумином (HSA) (US 8372952).

Поскольку FGF19 и FGF21 имеют значительное влияние на метаболизм глюкозы, то в данной области сохраняется потребность в разработке терапевтических молекул и способов модулирования опосредованной FGF19 или FGF21 активности.

Сущность изобретения

Изобретение относится к антителам, которые связываются с KLB, антителам, которые связываются с FGFR1, и биспецифическим антителам, которые связываются с KLB и FGFR1, и способам их применения. Настоящее изобретение основано, частично, на обнаружении биспецифических антител, которые связываются с KLB и FGFR1, избирательно активируют рецепторный комплекс FGFR1c/KLB и индуцируют полезные метаболические изменения, ожидаемые при FGF21-подобной активности, в том числе снижение веса и улучшение метаболизма глюкозы и липидов без существенного влияния на печень и без потери костной массы.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело представляет собой биспецифическое антитело. Для примера, а не в качестве ограничения, выделенное антитело по настоящему изобретению может связываться с бета-Клото (KLB) и рецептором фактора роста фибробластов 1 (FGFR1), причём антитело связывается с С-концевым доменом KLB. Для примера, но не в качестве ограничения, выделенное антитело по настоящему изобретению связывается с KLB и FGFR1c. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело связывается с фрагментом KLB, содержащим аминокислотную последовательность SSPTRLAVIPWGVKLLRWVRRNYGDMDIYTAS (SEQ ID NO: 142). В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело связывается с эпитопом внутри фрагмента FGFR1, включающим аминокислотную последовательность KLHAVPAAKTVKFKCP (SEQ ID NO: 143) или FKPDHRRIGGYKVRY (SEQ ID NO: 144).

В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению активирует комплекс KLB/FGFR1c. В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению снижает уровень глюкозы в крови *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело не оказывает существенного влияния на плотность костной ткани. В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению не оказывает существенного влияния на печень. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело индуцирует значительно более низкие уровни фосфорилирования ERK и MEK в печени по сравнению FGF21. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело связывается с KLB с Kd от 10^{-8} до 10^{-13} М. В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению может связываться с белком FGFR1 с Kd от 10^{-8} до 10^{-13} М. В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению может связываться с FGFR1c с Kd от 10^{-8} до 10^{-13} М. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело связывается с KLB с Kd < 10 нМ и с FGFR1c с Kd > 300 нМ. В некоторых вариантах осуществления изобретения биспецифическое антитело анти-KLB/анти-FGFR1 может включать плечо анти-FGFR1, которое имеет Kd приблизительно от 10 нМ до 10 мкМ.

В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению связывается с эпитопом, присутствующим в KLB. Для примера, а не в качестве ограничения, настоящее изобретение предусматривает анти-KLB антитело, которое связывает тот же эпитоп, что и антитело, показанное на фиг. 3А и В. В некоторых вариантах осуществления анти-KLB антитело по настоящему изобретению связывает тот же эпитоп, что и антитела 12A11 или 8C5. В некоторых вариантах осуществления анти-KLB антитело связывается с эпитопом в пределах С-концевого домена KLB. В некоторых вариантах осуществления анти-KLB антитело связывается с фрагментом KLB с аминокислотной последовательностью SSPTRLAVIPWGVKLLRWVRRNYGDMDIYTAS (SEQ ID NO: 142).

В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело анти-KLB/анти-FGFR1 по настоящему изобретению включает первое антитело или его антигенсвязывающую часть, которая включает переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, где переменная область тяжелой цепи включает последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности, представленной в SEQ ID NO: 128, и переменная область легкой цепи включает последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности, представленной в SEQ ID NO: 130. В некоторых вариантах осуществления второе антитело или его анти-

генсвязывающая часть включает вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, где вариабельная область тяжелой цепи включает последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности, представленной в SEQ ID NO: 132, и вариабельная область легкой цепи включает последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности, представленной в SEQ ID NO: 134.

В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело анти-KLB/анти-FGFR1 по настоящему изобретению включает первое антитело или его антигенсвязывающую часть, которая включает область тяжелой цепи и область легкой цепи, где область тяжелой цепи содержит последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности, представленной в SEQ ID NO: 129, и область легкой цепи включает последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности, представленной в SEQ ID NO: 131. В некоторых вариантах осуществления второе антитело или его антигенсвязывающая часть включает область тяжелой цепи и область легкой цепи, где область тяжелой цепи включает последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности, представленной в SEQ ID NO: 133, и область легкой цепи включает последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности, представленной в SEQ ID NO: 135.

Настоящее изобретение также относится к анти-KLB антителу, которое включает: (a) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы SEQ ID NO: 1-15, (b) HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы SEQ ID NO: 79-93, и (c) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы SEQ ID NO: 16-31.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения анти-KLB антитело включает (a) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы SEQ ID NO: 1-15, (b) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы SEQ ID NO: 16-31, и (c) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы SEQ ID NO: 32-47.

В некоторых вариантах осуществления анти-KLB антитело дополнительно содержит (a) HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы SEQ ID NO: 48-62, (b) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы SEQ ID NO: 63-78, и (c) HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы SEQ ID NO: 79-93.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения анти-KLB антитело включает (a) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, (b) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, (c) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44, (d) HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59, (e) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75, и (f) HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения анти-KLB антитело включает (a) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, (b) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, (c) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47, (d) HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62, (e) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 78, и (f) HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения анти-KLB антитело включает (a) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 128, и (b) вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 130. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит (a) тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 129, и (b) легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 131.

В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает анти-KLB антитело, включающее (a) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 95% идентичность аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 128; (b) вариабельную область легкой цепи, имеющую по меньшей мере 95% идентичность аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 130; и (c) вариабельную область тяжелой цепи, как описано в (a), и вариабельную область легкой цепи, как описано в (b).

Настоящее изобретение также относится к антителам, которые связываются с FGFR1, например, FGFR1c. Для примера, а не в качестве ограничения, антитело по настоящему изобретению содержит вариабельный домен, который связывается с FGFR1. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело связывается с фрагментом FGFR1, имеющим аминокислотную последовательность KLHAV-PAAKTVKFKCP (SEQ ID NO: 143) или FKPDHRIGGYKVRV (SEQ ID NO: 144). В некоторых вариантах осуществления антитело содержит (a) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 136, (b) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 137, (c) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 138, (d) HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 139, (e) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 140, и (f) HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 141. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит (a) вариабельную область тяже-

лой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 132, и (b) варибельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 134. В некоторых вариантах осуществления антитело включает (a) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133, и (b) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 135. В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению связывается с фрагментом FGFR1c, имеющим аминокислотную последовательность KLHAVPAAKTVKFKCP (SEQ ID NO: 143) или FKPDHRIGGYKVRY (SEQ ID NO: 144).

В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению представляет собой моноклональное антитело. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело представляет собой человеческое, гуманизированное или химерное антитело. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело имеет пониженную эффекторную функцию.

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, кодирующей антитело по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает способ получения антитела, включающий культивирование клетки-хозяина по настоящему изобретению, в результате чего образуется антитело. В некоторых вариантах осуществления этот способ дополнительно включает выделение антитела из клетки-хозяина.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической лекарственной форме, которая включает одно или несколько антител по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения фармацевтическая лекарственная форма содержит дополнительный терапевтический агент.

В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает антитело по изобретению для применения в качестве лекарственного средства. В некоторых вариантах осуществления антитело предназначается для применения в лечении метаболических нарушений, например синдрома поликистозных яичников (PCOS), метаболического синдрома (MET), ожирения, неалкогольного стеатогепатита (NASH), неалкогольной жировой болезни печени (NAFLD), гиперлипидемии, артериальной гипертензии, диабета 2 типа, диабета не 2 типа, диабета 1 типа, латентного аутоиммунного диабета (LAD) и диабета взрослого типа у молодых (MODY). В некоторых вариантах осуществления антитело предназначается для применения в лечении диабета 2 типа. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело предназначается для применения в лечении ожирения. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает антитело для применения в лечении синдрома Барде-Бидля, синдрома Прадера-Вилли, синдрома Альстрёма, синдрома Коэна, наследственной остеодистрофии Олбрайта (псевдогипопаратиреоидизма), синдрома Карпентера, синдрома МОМО, синдрома Рубинштейна-Тейби, синдрома ломкой Х-хромосомы и синдрома Бёресона-Форсмана-Лемана. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает антитело для использования в активации рецепторного комплекса KLB/FGFR1, например рецепторного комплекса KLB/FGFR1c.

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к применению антитела, раскрытого в настоящем описании, для получения лекарственного средства для лечения нарушений обмена веществ, например синдрома поликистозных яичников (PCOS), метаболического синдрома (MET), ожирения, неалкогольного стеатогепатита (NASH), неалкогольной жировой болезни печени (NAFLD), гиперлипидемии, артериальной гипертензии, диабета 2 типа, диабета не 2 типа, диабета 1 типа, латентного аутоиммунного диабета (LAD) и диабета взрослого типа у молодых (MODY), а также старения и связанных с ним заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и ALS. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения метаболическое нарушение является диабетом 2 типа. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения метаболическое нарушение является ожирением. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения получение лекарственного средства представляет собой получение лекарственного средства для активации рецепторного комплекса KLB/FGFR1c.

В другом своем аспекте настоящее изобретение предусматривает способ лечения индивидуума, имеющего заболевание, выбранное из группы, состоящей из синдрома поликистозных яичников (PCOS), метаболического синдрома (MET), ожирения, неалкогольного стеатогепатита (NASH), неалкогольной жировой болезни печени (NAFLD), гиперлипидемии, артериальной гипертензии, диабета 2 типа, диабета не 2 типа, диабета 1 типа, латентного аутоиммунного диабета (LAD) и диабета взрослого типа у молодых (MODY), а также старения и связанных с ним заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и ALS, где указанный способ включает введение индивидууму эффективного количества одного или более антител согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения заболевание является диабетом, например диабетом 2 типа. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения заболевание является ожирением. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предусматривается способ лечения индивидуума, имеющего заболевание и/или расстройство, выбранное из группы, состоящей из синдрома Барде-Бидля, синдрома Прадера-Вилли, синдрома Альстрёма, синдрома Коэна, наследственной остеодистрофии Олбрайта (псевдо-

гипопаратиреоидизма), синдрома Карпентера, синдрома МОМО, синдрома Рубинштейна-Тейби, синдрома ломкой X-хромосомы и синдрома Бёресона-Форсмана-Лемана. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение индивидууму дополнительного терапевтического средства. В некоторых вариантах осуществления способ с использованием одного или нескольких антител по настоящему изобретению не влияет на функцию печени у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает способ индуцирования потери веса, включающий введение индивидууму эффективного количества одного или более антител по настоящему изобретению.

В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает способ активации рецепторного комплекса KLB-FGFR1c у индивидуума, включающий введение индивидууму эффективного количества антитела по настоящему изобретению.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1A представлена агонистическая активность анти-FGFR1 антител и фрагментов таких антител;

на фиг. 1B - результаты экспериментов по конкурентному связыванию с использованием анти-FGFR1 антител;

на фиг. 1C - аминокислотные остатки FGFR1, важные для связывания анти-FGFR1 антител, представленных в настоящем описании. На фиг. 1C приведены SEQ ID NO: 159, 159, 143 и 144, соответственно, в порядке перечисления;

на фиг. 1D - результаты сайт-специфического мутагенеза для определения аминокислотных остатков, важных для связывания анти-FGFR1 антител, представленных в настоящем описании;

на фиг. 1E - результаты сайт-специфического мутагенеза для определения аминокислотных остатков, важных для связывания анти-FGFR1 антител, представленных в настоящем описании;

на фиг. 1F - важные для связывания остатки на пространственной модели FGFR1;

на фиг. 2A - значения аффинности двух анти-FGFR1 антител к FGFR1b и FGFR1c;

на фиг. 2B - связывание анти-FGFR1 антитела с различными FGFR;

на фиг. 2C - анти-FGFR1 антитело, которое выступает в качестве специфического агониста для FGFR1 в люциферазном анализе GAL-ELK1 (ETS-подобный фактор транскрипции 1) в клетках L6;

на фиг. 2D - анти-FGFR1 антитело, которое выступает в качестве специфического агониста для FGFR1 в люциферазном анализе GAL-ELK1 в клетках HEK293;

на фиг. 2E показано, что анти-FGFR1 антитело приводит к нормализации уровней глюкозы в крови при его введении мышам с диабетом ob/ob;

на фиг. 3A - последовательности вариабельной области легкой цепи для 17 анти-KLB антител. Последовательности CDR-L1 включают по порядку SEQ ID NO: 48-62; последовательности CDR L2 включают по порядку SEQ ID NO: 63-78; и последовательности CDH L3 включают по порядку SEQ ID NO: 79-93. Последовательности вариабельной области легкой цепи включают по порядку SEQ ID NO: 111-127;

на фиг. 3B - последовательности вариабельной области тяжелой цепи для 17 анти-KLB антител. Последовательности CDR-H1 для антител включают по порядку (11F1-8C5) SEQ ID NO: 1-15; последовательности CDR H2 включают по порядку SEQ ID NO: 16-31; последовательности CDR H3 включают по порядку SEQ ID NO: 32-47. Последовательности вариабельной области тяжелой цепи для антител включают по порядку SEQ ID NO: 94-110;

на фиг. 4 - медиана сдвига, наблюдаемого на диаграмме FACS при измерении степени связывания 0,8 мкг/мл различных анти-KLB антител с клетками 293, экспрессирующими hKLB;

на фиг. 5 - относительное связывание различных анти-KLB антител с белком hKLB-ECD-HIS;

на фиг. 6A - схема, изображающая антитела, представленные в настоящем описании, и модель образования комплекса биспецифического антитела с KLB/FGFR1c для активации сигнала;

на фиг. 6B - модель образования комплекса FGFR1c-KLB-FGF21, активирующего сигналинг;

на фиг. 6C - результаты люциферазного анализа GAL-ELK1 для FGF21 и биспецифического антитела (BsAb) 17 с использованием дефицитных по FGFR1 клеток HEK293. Клетки трансфицировали для экспрессии указанных рецепторов;

на фиг. 6D - вестерн-блот-анализ первичных человеческих адипоцитов, обработанных указанным белком (FGF21 (100 нМ) или IgG (33 нМ)) в течение 1 ч. Образцы были продублированы для каждой обработки;

на фиг. 7A - результаты индукции различными биспецифическими антителами с плечами анти-FGFR1 и анти-KLB в люциферазном анализе GAL-ELK1. Следует отметить, что биспецифические антитела с плечом R1MAb1 проявили значительную KLB-независимую активность предположительно из-за агонистической активности R1MAb1 Fab. Подобной активности не было выявлено в случае биспецифических антител с плечами R1MAb2 или R1MAb3;

на фиг. 7B показано, что индукция сигналинга с помощью различных биспецифических антител с плечами анти-FGFR1 и анти-KLB зависит от FGFR1c и KLB;

на фиг. 7C представлено биспецифическое антитело с плечами анти-FGFR1 и анти-KLB, которое индуцирует активность люциферазы в зависимости от дозы в клетках, экспрессирующих рекомбинантный hFGFR1c и hKLB, но не в клетках без экспрессии KLB;

фиг. 8А представляет собой схематическое изображение трех вариантов биспецифических анти-KLB/анти-FGFR1с антител. Синий - человеческая последовательность, красный - мышинная последовательность. Примерное положение олигосахаридной цепи при N297 в (1) обозначено как ^. Варианты, не являющиеся эффекторами ((2) и (3)), не имеют олигосахаридных цепей из-за мутации N297G. Звездочками в (2) указано примерное положение мутации D265A. Ориентация "выступ-во-впадину" также показана на фигуре. (1) представляет собой BsAb10; (2) представляет собой BsAb20; и (3) представляет собой BsAb17;

на фиг. 8В представлены результаты анализа MSD pERK в первичных человеческих адипоцитах, обработанных BsAb10 и его производными, контрольным IgG или FGF21 в течение 10 мин. Данные представляют собой средние значения $\pm$ SEM (N = 3). bFKB1 (1) представляет собой BsAb10; bFKB1 (2) представляет собой BsAb20; и bFKB1 (3) представляет собой BsAb17;

на фиг. 9А - люциферазный анализ GAL-ELK1 в миобластах крысы L6. Клетки котрансфицировали экспрессионным вектором для указанных рецепторов. Трансфицированные клетки инкубировали с различными концентрациями BsAb10 или положительным контролем, FGF21, FGF19 или R1MAb1 в течение 6 ч перед люциферазным анализом;

на фиг. 9В - результаты люциферазных анализов GAL-ELK1, аналогичных представленному на фиг. 9А. Трансфицированные клетки L6 обрабатывали комбинациями FGF21 и BsAb17, как указано на фигуре. N = 4;

на фиг. 9С - результаты люциферазных анализов GAL-ELK1, аналогичных представленным на фиг. 9А. Трансфицированные клетки L6 обрабатывали комбинациями FGF21 и BsAb17, как указано на фигуре. N = 4;

на фиг. 9D - связывание анти-FGFR1 антитела и биспецифических анти-KLB/анти-FGFR1 антител, BsAb9 и BsAb10 с клетками, экспрессирующими KLB, FGFR1с или оба белка;

на фиг. 10А - связывание биспецифического антитела с плечами анти-FGFR1 и анти-KLB и анти-FGFR1 антитела с клетками, экспрессирующими FGFR1с, KLB или оба белка;

на фиг. 10В - Kd связывание BsAb10 с клетками HEK293, экспрессирующими различные комбинации человеческого и мышинного KLB/FGFR1;

на фиг. 11 - анализ связывания BsAb10 или предварительно сформированных комплексов BsAb10/KLB в концентрации 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25 нМ со слитым белком FGFR1-ECD-Fc, который был иммобилизованным на чипе. Для создания предварительно сформированных комплексов BsAb10/KLB белок BsAb10 и рекомбинантный белок KLB-ECD предварительно инкубировали при соотношении 1:1. Следует отметить, что скорость диссоциации для комплекса BsAb10/KLB была ниже по сравнению со скоростью диссоциации только для BsAb10, но только в том случае, когда на чипе был связан FGFR1с, а не FGFR1b, что указывало на образование тройного комплекса;

на фиг. 12А - схема эксперимента TR-FRET;

на фиг. 12В - интенсивность TR-FRET клеток COS7, экспрессирующих SNAP-меченый белок FGFR1с совместно с немеченым KLB или без него, через 15 мин после добавления указанных лигандов. BsAb17, FGF21, FGF1 и FGF2 использовались в концентрации 67, 50, 62,5, 12 нМ соответственно. Данные - как отношение интенсивности сигнала FRET при 665 нм к интенсивности излучения донора при 620 нм (отношение FRET), и приведены средние значения $\pm$ SEM трех независимых экспериментов (N = 3). $p < 0,05$ (*), $< 0,01$ (**), $< 0,0001$ (***) по сравнению с контролем PBS;

на фиг. 13А приведены результаты экспериментов по определению того, какая часть KLB имеет важное значение для связывания двух анти-KLB антител. Схема структуры белка KLB показана в верхней части. Каждый из столбцов представляет человеческий KLB, человеческий KLA, кроличий KLB, крысиный KLB, мышинный KLB или химерные конструкции, что обозначено цветом. В правой части показано связывание на основе данных FACS KLBmAb1 и контрольного KLBmAb2 с клетками HEK293, временно экспрессирующими каждую из конструкций. Следует отметить, что KLBmAb1 не связывается с кроличьим KLB, но замена фрагмента из 34 аминокислот (аминокислоты 805-838) на соответствующую человеческую последовательность делает связывание возможным;

на фиг. 13В представлена аминокислотная последовательность сегмента человеческого белка KLB с сигнальной последовательностью, соответствующего положениям 857-890 (что соответствует положениям 805-838 аминокислотной последовательности белка KLB, который не включает сигнальную последовательность) и соответствующие последовательности у различных указанных видов. На фиг. 13В - SEQ ID NO: 160-164, соответственно, в порядке перечисления;

на фиг. 14А - связывание FGF21 и FGF19 с комплексом BsAb10/KLB по данным SPR. BsAb10 был связан с чипом, а белок KLB-ECD и белок FGF (0,2, 0,8 или 2 мкМ) вводили последовательно;

на фиг. 14В - результаты люциферазного анализа GAL-ELK1 в миобластах крысы L6. Клетки были котрансфицированы экспрессионными векторами, содержащими FGFR4 и KLB. Трансфицированные клетки инкубировали с различными концентрациями указанных белков в течение 6 ч перед началом люциферазного анализа;

на фиг. 14С - вестерн-блот, который был проведён для оценки фосфорилирования ERK в клетках ге-

патомы H4IIE. Следует отметить, что BsAb17 не блокировал способность FGF19 активировать комплекс FGFR4/KLB (фиг. 14B) или индуцировать фосфорилирование ERK в клетках гепатомы H4IIE (фиг. 14C);

на фиг. 15A - значения уровней глюкозы в крови (день 7), % изменения массы тела (день 7) и ежедневного потребления пищи (дни 0-3) у мышей C57BL/6 на диете с низким уровнем жира и мышей db/db ($n = 7$) после однократной внутрибрюшинной инъекции BsAb17 или контрольного IgG в дозе 3 мг/кг (мыши на диете с низким уровнем жира) или 5 мг/кг (мыши db/db);

на фиг. 15B - уровни массы тела и глюкозы в крови мышей с индуцированным диетой ожирением (DIO), которым вводили внутрибрюшинные инъекции указанного IgG (BsAb20) в дозе 3 мг/кг в дни 0 и 6 (стрелки). $N = 9$;

на фиг. 15C - результаты теста на толерантность к глюкозе с теми же мышами и антителами, данные по которым указаны на фиг. 15B, на 14-й день;

на фиг. 15D - уровень печеночных триглицеридов, а также маркеры в сыворотке животных, данные по которым указаны на фиг. 15B-C, на 17-й день;

на фиг. 15E - потребление глюкозы всем организмом, измеренное во время гиперинсулинемических-эугликемических фиксаций для мышей DIO через 5 дней после одной внутрибрюшинной инъекции указанного IgG (BsAb17) в количестве 10 мг/кг ($N = 12$). Горизонтальная ось отражает уровень инсулина в сыворотке крови. Стрелки указывают направление изменений от базального уровня к уровню после стимуляции инсулином, $p < 0,05$ (*), $< 0,005$ (**), $< 0,0001$ (***) по сравнению с контролем;

на фиг. 15F - эндогенная выработка глюкозы, измеренная во время гиперинсулинемических-эугликемических фиксаций у мышей DIO через 5 дней после одной внутрибрюшинной инъекции указанного IgG (BsAb17) в количестве 10 мг/кг ($N = 12$). Горизонтальная ось отражает уровень инсулина в сыворотке крови. Стрелки указывают направление изменений от базального уровня к уровню после стимуляции инсулином, $p < 0,05$ (*), $< 0,005$ (**), $< 0,0001$ (***) по сравнению с контролем;

на фиг. 15G - поглощение глюкозы в тканях после стимуляции инсулином, измеренное во время гиперинсулинемических-эугликемических фиксаций у мышей DIO через 5 дней после одной внутрибрюшинной инъекции указанного IgG (BsAb17) в количестве 10 мг/кг ($N = 12$). $p < 0,05$ (*), $< 0,005$ (**), $< 0,0001$ (***) по сравнению с контролем;

фиг. 16A - N-концевую аминокислотную последовательность мышинного KLB (SEQ ID NO: 165), а также соответствующую аминокислотную последовательность, кодируемую аллелем Klb у мышей KO (SEQ ID NO: 166). Миссенс-мутация в гене Klb приводит к сдвигу рамки считывания после второго аминокислотного остатка в аллеле KO, что показано красным шрифтом;

на фиг. 16B - экспрессия белка KLB в эпидидимальной белой жировой ткани мышей дикого типа (+/+) и нокаутных по Klb мышей (-/-);

фиг. 16C иллюстрирует важную роль KLB для влияния BsAb20 на метаболизм глюкозы. Тест на толерантность к глюкозе (GTT) у мышей DIO, которые получили четыре еженедельные инъекции BsAb20 или контрольного IgG в дозе 3 мг/кг. GTT был проведен на 23-й день, через три дня после последней инъекции. Мыши находились в условиях HFD в течение 20 недель до GTT. * $p < 0,05$;

на фиг. 16D - параметры сыворотки мышей DIO на 7-й день после внутрибрюшинной инъекции биспецифических анти-KLB/анти-FGFR1 антител или R1MAb1 в дозе 50 мг/кг, или носителя. $N = 6$;

на фиг. 17 - количество FGF23 и неорганического фосфора в сыворотке мышей DIO на 7-й день после внутрибрюшинной инъекции BsAb17 в дозе 50 мг/кг. $N = 6$. *** $p < 0,0005$;

на фиг. 18A - количество отклонений уровня глюкозы в артериальной крови в процессе эксперимента по фиксации. Мыши DIO получили BsAb17 или контроль IgG в дозе 10 мг/кг за 5 дней до проведения эксперимента по фиксации;

на фиг. 18B представлен вес тела в день проведения эксперимента по фиксации;

на фиг. 18C - скорость инфузии глюкозы во время эксперимента по фиксации, $p < 0,05$ (*), $< 0,001$ (**) по сравнению с контролем;

на фиг. 19A - потребление энергии (EE) (сверху) и дыхательный коэффициент (RQ) (снизу) у мышей DIO, получивших одну внутрибрюшинную инъекцию 10 мг/кг IgG в указанное время при 21-22°C. $N = 7$;

на фиг. 19B - EE (вверху) и RQ (внизу) у мышей на диете с низким уровнем жира, получивших одну внутрибрюшинную инъекцию 10 мг/кг IgG в указанное время. Мышей содержали при 21-22°C, после чего температура в клетках была изменена до термонеutralной (29-30°C) на 6-й день после инъекции IgG. $N = 6 \sim 7$;

на фиг. 19C - поглощение тканями фтордезоксиглюкозы (FDG) у мышей DIO через 40 ч после однократной внутрибрюшинной инъекции указанного IgG в дозе 10 мг/кг. $N = 8$. Мыши голодали в течение ночи перед измерением поглощения FDG;

на фиг. 19D - вестерн-блот-анализ ingWAT, собранных на 7-й день после одной внутрибрюшинной инъекции (BsAb17 или контрольного IgG при дозе 10 мг/кг) и хирургической имплантации осмотического насоса (CL316,243 (0,75 нмоль/ч) или носитель);

на фиг. 19E - экспрессия мРНК UCP1 в первичных подкожных адипоцитах человека, обработанных указанным белком в концентрации 30 нМ в течение 48 ч. $N = 3$;

на фиг. 19F - температура тела мышей DIO, получавших 10 мг/кг BsAb17 или контрольного IgG.

N = 7 ~ 8;

на фиг. 19G - профиль экспрессии генов в iBAT у мышей DIO, получивших однократно 10 мг/кг IgG и FGF21 два раза в день в дозе 2 мг/кг/сут или контрольный PBS в течение 5 дней. Представлены все гены, экспрессия которых значительно отличалась в образцах после обработки BsAb17 и контролем или FGF21 и контролем;

на фиг. 19H - EE (слева) и RQ (справа) у мышей на диете с низким уровнем жира, которые получили однократную внутрибрюшинную инъекцию биспецифических анти-KLB/анти-FGFR1 антител или контрольного IgG в дозе 10 мг/кг и которым хирургически имплантировали осмотический насос (CL-316,243 в количестве 0,5 нмоль/ч или носитель) в день 0. Показаны средние значения в течение указанных 24 ч;

на фиг. 20A - значения VO₂ (вверху), VCO₂ (посередине) и общая активность мышей DIO, описанных на фиг. 19A. Значения VO₂ и VCO₂ нормированы на значения веса тела, измеренные в моменты времени, указанные как #. Мышам DIO вводили 10 мг/кг BsAb17 или контрольного IgG;

на фиг. 20B - значения VO₂ (вверху), VCO₂ (посередине) и общая активность мышей DIO, описанных на фиг. 19B. Значения VO₂ и VCO₂ нормированы на значения веса тела, измеренные в моменты времени, указанные как #. Мышам DIO вводили 10 мг/кг BsAb17 или контрольного IgG;

на фиг. 21A - среднее значение EE по данным непрямой калориметрии. Величина среднего увеличения указана под графиками. DIO 21°C: среднее значение EE в течение D3-D6 после инъекции IgG в эксперименте, представленном на фиг. 19A. Мыши на диете с низким уровнем жира 21°C: среднее значение EE в течение D3-D6 после инъекции IgG в эксперименте, показанном на фиг. 19B. Мыши на диете с низким уровнем жира после повышения температуры до 30°C: средние значения EE в течение D6-D9 после инъекции IgG (т.е. 3 дня после изменения температуры) в эксперименте, показанном на фиг. 19B. DIO 30°C: среднее значение EE в течение D3-D6 после инъекции IgG у мышей DIO, акклиматизированных к термонеutralным условиям;

на фиг. 21B - изменения EE у мышей DIO в термонеutralных условиях. Мышей DIO акклиматизировали к термонеutralным условиям в течение 2 недель перед однократной внутрибрюшинной инъекцией (показано стрелкой) BsAb17 или контрольного IgG в дозе 10 мг/кг. N = 3 ~ 4;

на фиг. 21C - средние значения EE и RQ у мышей DIO при нормальной температуре лаборатории (21°C) в течение D3-5 после хирургической имплантации осмотического насоса и инъекции препарата. В DO мыши получили внутрибрюшинную инъекцию BsAb17 или контрольного IgG в дозе 10 мг/кг. Группа FGF21 также получила болюс 2 мг/кг FGF21 путём внутрибрюшинной инъекции в DO. Каждой мыши также подкожно имплантировали осмотический насос в DO для инфузии FGF21 при дозе 60 мкг/сут или контрольного PBS. N = 8~9. **P < 0,005;

на фиг. 22 - данные, показанные на фиг. 19F, и представленные в другом масштабе, чтобы показать соответствующую разницу в центральной температуре тела в течение исследования у мышей DIO, получавших 10 мг/кг BsAb17, и мышей DIO, получавших 10 мг/кг контрольного IgG. Черная линия представляет собой расчетную разницу, и синие линии являются 95%-ными точечными доверительными интервалами для разницы. IgG вводили на 13-й день (стрелка). N = 7 ~ 8;

на фиг. 23 показано, что FGF21 и BsAb20 индуцируют примерно одинаковый уровень фосфорилирования ERK и MEK в эпидидимальной жировой ткани, паховой жировой ткани (ingWAT), межлопаточной бурой жировой ткани (iBAT) и ткани поджелудочной железы. Ткани получали через 1 ч (печень, поджелудочная железа и эпидидимальная белая жировая ткань (eWAT)) или через 2 ч (iBAT или ingWAT) после внутрибрюшинной инъекции мышам C57BL/6 на диете с низким уровнем жира в количестве 10 мг/кг (BsAb20) или 1 мг/кг (FGF21). Тотальные ERK и MEK служат в качестве контроля количества нанесенного образца;

на фиг. 24A - изменения веса тела и уровни высокомолекулярного адипонектина в сыворотке крови мышей DIO (N = 6), которые получили однократную внутрибрюшинную инъекцию BsAb17 в указанной дозе (мг/кг);

на фиг. 24B показаны изменения веса тела и уровни высокомолекулярного адипонектина в сыворотке крови макак (N = 3), которые получили однократную внутрибрюшинную инъекцию BsAb17 в указанной дозе (мг/кг);

на фиг. 24C представлен EE мышей DIO (слева: дикий тип, справа: adipor KO), которые получили однократную внутрибрюшинную инъекцию указанного IgG (BsAb17) в дозе 10 мг/кг (стрелка). N = 5 ~ 6;

на фиг. 24D - различные метаболические параметры мышей дикого типа (+/+) и adipor KO (-/-) DIO, которые получили однократную внутрибрюшинную инъекцию указанного IgG (BsAb17) в дозе 10 мг/кг. N = 6. AUC: площадь под кривой в GTT или ITT (T = 0 ~ 2 ч). p < 0,1 (#), < 0,05 (*), < 0,005 (**) по сравнению с контролем;

на фиг. 25 - тотальная РНК, которую получили от мышей, описанных на фиг. 19G, с помощью qPCR;

на фиг. 26 - уровень фосфорилирования ERK под действием BsAb17 в мышечных тканях. Ткани получали через 1 ч после внутрибрюшинной инъекции мышам C57BL/6 на диете с низким уровнем жира BsAb17 или контрольного IgG в количестве 10 мг/кг, и обрабатывали иммуногистохимически с исполь-

зованием антител, специфических к фосфорилированному ERK. Репрезентативные изображения, полученные от 2 животных, показаны для каждой группы. (1) Поджелудочная железа, (2) корональный участок мозга, содержащий супрахиазматические ядра (стрелка), (3) корональный участок мозга, содержащий area postrema (треугольные скопления окрашенных клеток) и центральный канал (стрелка) и (4) корональный участок мозга, содержащий срединное возвышение (стрелка). Следует отметить, что индуцированный BsAb17 сигнал был ожидаем в ацинарных клетках поджелудочной железы, но не в любом из участков головного мозга;

на фиг. 27 - нормализация HFD-индуцированной пролиферации гепатоцитов под действием BsAb20. Поглощение BrdU печенью у мышей DIO, получавших BsAb20 (1 или 3 мг/кг/неделю) или контрольный IgG (3 мг/кг/неделю) в течение 8 недель или у контрольных мышей C57BL/6 на диете с низким уровнем жира. * $p < 0,05$ по сравнению с мышами DIO, получавшими IgG ($N = 5 \sim 8$);

на фиг. 28A - схема эксперимента, результаты которого показаны на фиг. 28B. Мыши DIO получали BsAb20 (1 или 3 мг/кг/неделю) или контрольный IgG (1 мг/кг/неделю) в течение 6 недель, как указано на фигуре. Контрольные мыши C57BL/6 на диете с низким уровнем жира оставались без обработки;

на фиг. 28B - костный фенотип после обработки BsAb20. Бедро и голень препарировали и подвергали анализу μ CT. ($N = 7 \sim 8$). Следует отметить, что не наблюдалось никаких отрицательных эффектов по различным параметрам костной ткани в трабекулярной и кортикальной кости, за исключением возможного утолщения кортикальной кости, которое показало тенденцию к снижению при обработке 3 мг/кг/нед BsAb20, хотя значения и не достигли статистической значимости. Так как было показано уменьшение толщины кортикальной кости в отсутствие влияния на плотность трабекулярной костной ткани у мышей на низкокалорийной диете (11), наблюдаемый эффект может быть связан с потерей веса, $p < 0,001$ (***), $< 0,01$ (**), $< 0,05$ (*), $< 0,1$ (#), $< 0,2$ (\$) по сравнению с мышами DIO, обработанными контрольным IgG. $N = 7 \sim 8$;

на фиг. 29 - уровни кортикостерона у мышей после обработки BsAb17. Уровни сывороточного кортикостерона были измерены при экспериментальном времени (ZT) = 3 после эвтаназии путем декапитации. Контрольные (CTRL) мыши на диете с низким уровнем жира не получали никакой обработки. Липополисахариды (LPS) вводили внутривенно мышам на диете с низким уровнем жира в дозе 1 мг/кг за 3 ч до эвтаназии (ZT = 0) в качестве положительного контроля (12). IgG вводили внутривенно мышам DIO в дозе 5 или 25 мг/кг за 5 дней до эвтаназии, как указано. Указанный статистический анализ был проведен без группы LPS. $N = 12$;

на фиг. 30 - связывание различных биспецифических антител с плечами анти-FGFR1 и анти-KLB с клетками, экспрессирующими FGFR1c или FGFR1c и KLB;

на фиг. 31 - связывание производных YW182.5 и YW182.5 с белками FGFR1, показанное методом ELISA.

Подробное описание изобретения

Для большей ясности, но не в качестве ограничения подробное описание раскрытого предмета разделено на следующие подразделы.

I. Определения.

II. Антитела.

III. Способы применения.

IV. Фармацевтические лекарственные формы.

V. Изделия.

I. Определения.

"Каркасная область человеческого акцептора" для целей настоящего изобретения представляет собой структуру, содержащую аминокислотную последовательность каркасной области переменного домена легкой цепи (VL) или каркасной области переменного домена тяжелой цепи (VH), полученных из каркасной области человеческого иммуноглобулина или каркасной области человеческой консенсусной последовательности, которые определены ниже. Каркасная область человеческого акцептора, "полученная из" каркасной области человеческого иммуноглобулина или каркасной области человеческой консенсусной последовательности, может содержать ту же аминокислотную последовательность, или она может содержать изменения аминокислотной последовательности. В некоторых вариантах осуществления количество аминокислотных изменений составляет 10 или менее, 9 или менее, 8 или менее, 7 или менее, 6 или менее, 5 или менее, 4 или менее, 3 или менее, 2, или менее. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения каркасная область человеческого акцептора VL идентична последовательности каркасной области VL человеческого иммуноглобулина или последовательности каркасной области человеческой консенсусной последовательности.

"Аффинность" относится к силе суммы всех нековалентных взаимодействий между одним участком связывания молекулы (например, антитела) и его партнером по связыванию (например, антигеном). Если не указано иное, в настоящем описании, "аффинность связывания" относится к внутренней аффинности связывания, которая отражает взаимодействие 1:1 между членами пары связывания (например, антителом и антигеном). Аффинность молекулы X к её партнеру Y в общем случае может быть представлено константой диссоциации (K_d). Аффинность может быть измерена обычными способами, известными в

данной области, в том числе теми, которые представлены в настоящем описании. Конкретные иллюстративные примеры вариантов осуществления измерения аффинности связывания описаны ниже.

Антитело со "зрелой аффинностью" относится к антителу с одним или несколькими изменениями в одной или нескольких гипервариабельных областях (HVR) по сравнению с исходным антителом, которое не обладает такими изменениями, приводящими к улучшению аффинности антитела к антигену.

"Клото-бета", "KLB" и "бета-Клото", как они использованы в настоящем описании, относятся к любому нативному бета-Клото из любого позвоночного животного, включая млекопитающих, таких как приматы (например, человек) и грызуны (например, мыши и крысы), если не указано иное. Термин охватывает "полноразмерный", непротессированный KLB, а также любую форму KLB, которая является результатом процессинга в клетке. Термин также включает встречающиеся в природе варианты KLB, например варианты сплайсинга или аллельные варианты. Неограничивающий пример аминокислотной последовательности человеческого KLB, которая является мишенью антитела по настоящему изобретению, за исключением сигнальной последовательности, выглядит следующим образом:

FSGDGRAIWSKNPNFTPVNESQLFLYDTFPKNFFWGIGTGALQVEGSWKKGKGPSIW
DHFINTHLKNVSSSTNGSSDSYIFLEKDLSALDFIGVSFYQFSISWPRLFPDGIVTVANAK
GLQYYSTLLDALVLRNIEPIVTLYHWDLPALQEKYGGWKNDTIIDIFNDYATYCFQM
FGDRVKYWITIHPYLVAWHGYGTGMHAPGEKGNLAAVYTVGHNLIKAHRSKVWHN
YNTHFRPHQKGWLSITLGSWIEPNRSENTMDIFKCQSQSMVSVLGWFANPIHGDGDYP
EGMRKKLFSVLPIFSEAEKHEMRGTADFFAFSFGPNFKPLNTMAKMGQNVSLNLR
LNWIKLEYNNPRILIAENGWFTDSRVKTEDTTAIYMMKNFLSQVLQAIRLDEIRVFGYT
AWSLLDGFQWQDAYTIRRGFLFYVDFNSKQKERKPKSSAHYYKQIIRENGFSLKESTPD
VQGQFPCDFSWGVTESVLKPEVASSPQFSDPHLYVWNATGNRLLHRVEGVRLKTRP
AQCTDFVNIKKQLEMLARMKVTHYRFALDWASVLTGNLSAVNRQALRYRVCVSE
GLKLGISAMVTLYYPHTAHLGLPELLHADGWLNPSTAEAFQAYAGLCFQELGDLVK
LWITINEPNRLSDIYNRSGNDTYGAAHNLLVAHALAWRLYDRQFRPSQRGAVSLSLHA
DWAEPANPYADSHWRAAERFLQFEIAWFAEPLFKTGDYPAAMREYIASKHRRGLSSS
ALPRLTEAERRLLKGTVDFCALNHFTTRFVMHEQLAGSRYSDDRDIQFLQDITRLSSPT
RLAVIPWGVRLKLRWVRRNYGDMDIYITASGIDDQALEDDRLRKYYLGKYLQEV LKA
YLIDKVRIGKYYAFKLAEKSKPRFGFFTSDFAKSSIQFYNKVISSRGFPFENSSSRCSQ
TQENTECTVCLFLVQKKPLIFLGCCFFSTLVLLLSIAIFQRQRRKFWKAKNLQHIPLKK
GKRVVS (SEQ ID NO: 145).

В некоторых вариантах осуществления белок KLB может включать N-концевую сигнальную последовательность, имеющую аминокислотную последовательность

MKPGCAAGSPGNEWIFFSTDEITTRYNTMSNGGLQRSVILSALILLRAVTG (SEQ ID NO: 157).

Термин "С-концевой домен KLB" относится к карбокси-концевому гликозидаза-подобному домену KLB. Например, С-концевой домен примера белка KLB, представленный в последовательности SEQ ID NO: 145, содержит следующую аминокислотную последовательность:

FPCDFSWGVTESVLKPEVASSPQFSDPHLYVWNATGNRLLHRVEGVRLKTRPAQCTD
FVNIKKQLEMLARMKVTHYRFALDWASVLTGNLSAVNRQALRYRVCVSEGLKLG
ISAMVTLYYPHTAHLGLPELLHADGWLNPSTAEAFQAYAGLCFQELGDLVKLWITINE
PNRLSDIYNRSGNDTYGAAHNLLVAHALAWRLYDRQFRPSQRGAVSLSLHADWAEP
ANPYADSHWRAAERFLQFEIAWFAEPLFKTGDYPAAMREYIASKHRRGLSSSALPRLTE
AERRLLKGTVDFCALNHFTTRFVMHEQLAGSRYSDDRDIQFLQDITRLSSPTRLAVIPW
GVRLKLRWVRRNYGDMDIYITASGIDDQALEDDRLRKYYLGKYLQEV LKAYLIDKVR
IKGYYAFKLAEKSKPRFGFFTSDFAKSSIQFYNKVISSRGFPFENSSSR (SEQ ID NO:
155).

Термины "анти-KLB антитело" и "антитело, которое связывается с KLB" относятся к антителу, которое способно связываться с KLB с достаточной аффинностью таким образом, что антитело является полезным в качестве диагностического и/или терапевтического средства для целенаправленного воздействия на KLB. В одном варианте осуществления степень связывания анти-KLB антитела с неродственными, не относящимися к KLB белками составляет менее чем приблизительно 10% от связывания антитела с KLB, что измерено, например, с помощью радиоиммуноанализа (RIA). В некоторых вариантах

осуществления антитело, которое связывается с KLB, имеет константы диссоциации (K_d) ≤ 1 мкМ, ≤ 100 нМ, ≤ 10 нМ, ≤ 1 нМ, $\leq 0,1$ нМ, $\leq 0,01$ нМ или $\leq 0,001$ нМ (например, 10^{-8} М или менее, например от 10^{-8} до 10^{-13} М, например от 10^{-9} до 10^{-13} М). В некоторых вариантах осуществления анти-KLB антитело связывается с эпитопом KLB, который является консервативным для KLB из различных видов. В некоторых вариантах осуществления анти-KLB антитело связывается с эпитопом KLB, который находится в С-концевой части белка.

Термин "рецептор фактора роста фибробластов 1" или "FGFR1", используемый в настоящем описании, относится к любому нативному FGFR1 из любого позвоночного животного, включая млекопитающих, таких как приматы (например, человек) и грызуны (например, мыши и крысы), если не указано иное. Термин охватывает "полноразмерный", непротессированный FGFR1, а также любую форму FGFR1, которая является результатом процессинга в клетке. Термин также включает встречающиеся в природе варианты FGFR1, например варианты сплайсинга или аллельные варианты, в том числе FGFR1c. Не ограничивающий пример аминокислотной последовательности человеческого FGFR1c приведен ниже

MWSWKCLLFWAVLVTATLCTARPSPTLPEQAQPWGAPVEVESFLVHPGDLQLRCRL
RDDVQSQINWLRDGVQLAESNRTRITGEEVEVQDSVPADSGLYACVTSSPSGSDTTYFS
VNVSDALPSSSEDDDDDDSSSEKETDNTKPNPVAPYWTSPEKMEKKLHAVPAAKTV
KFKCPSSGTPNPTLRWLKNGKEFKPDHRIGGYKVRATWSIIMDSVVPSPDKGNYTCIV
ENEYGSINHTYQLDVVERSPHRPILQAGLPANKTVALGNSNVEFMCKVYSDPQPHIQWL
KHIEVNGSKIGPDNLPYVQILKTAGVNTTDKEMEVLHLRNVSFEDAGEYTCLAGNSIG
LSHNSAWLTVLEALEERPAVMTSPYLEIIYCTGAFLISCMVGSVIVYKMKSGTKKSD
FHSQMAVHKLAKSIPLRRQVTVSADSSASMNSGVLLVRPSRLSSSGTPMLAGVSEYEL
PEDPRWELPRDRLVLGKPLGEGCFGQVVLAEAGLDKDKPNRVTKVAVKMLKSDATE
KDLSDLISEMEMMKMIGKHKNNINLLGACTQDGPLYVIVEYASKGNLREYLQARRPPG
LEYCYNPSHNPEEQLSSKDLVSCAYQVARGMEYLAASKKCIHRDLAARNVLVTEDNVM
KIADFGLARDIHHIDYYKKTNGRLPVKWMapeALFDRIYTHQSDVWSFGVLLWEIFT
LGGSPYPGPVVEELFKLLKEGHRMDKPSNCTNELYMMMRDCWHA VPSQRPTFKQLV
EDLDRIVALTSNQEYLDLSMPLDQYSPSPDTRSSSTCSSGEDSVFSHEPLPEEPCLPRHP
AQLANGG LKRR (SEQ ID NO: 146).

Термин "анти-FGFR1c антитело" относится к антителу, которое способно связываться с FGFR1c достаточной аффинностью таким образом, что антитело является полезным в качестве диагностического и/или терапевтического средства для целенаправленного воздействия на FGFR1c. В одном варианте осуществления степень связывания анти-FGFR1 антитела с неродственным, не относящимся к FGFR1c белком составляет менее чем приблизительно 10% от связывания антитела с FGFR1c, что измерено, например, с помощью радиоиммуноанализа (RIA). В некоторых вариантах осуществления антитело, которое связывается с FGFR1c, имеет константы диссоциации (K_d) ≤ 1 М, ≤ 100 мМ, ≤ 10 мМ, ≤ 1 мМ, ≤ 100 мкМ, ≤ 10 мкМ, ≤ 1 мкМ, ≤ 100 нМ, ≤ 10 нМ, ≤ 1 нМ, $\leq 0,1$ нМ, $\leq 0,01$ нМ, или $\leq 0,001$ нМ. В некоторых вариантах осуществления K_d антитела, которое связывается с FGFR1c, описанным в настоящем описании, может быть 10^{-3} М или менее, или 10^{-8} М или менее, например от 10^{-8} до 10^{-13} М, например от 10^{-9} до 10^{-13} М. В некоторых вариантах осуществления анти-FGFR1 антитело связывается с эпитопом FGFR1c, который является консервативным среди FGFR1c из различных видов.

Термин "антитело" в настоящем описании используется в самом широком смысле и включает различные структуры антитела, включая, без ограничения, моноклональные антитела, поликлональные антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела) и фрагменты антител при условии, что они проявляют желаемую антигенсвязывающую активность.

"Фрагмент антитела" относится к молекуле, кроме интактного антитела, которое содержит часть интактного антитела, которая связывается с антигеном, с которым связывается интактное антитело. Примеры фрагментов антител включают, но не ограничиваются ими, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; диантитела; линейные антитела; молекулы одноцепочечных антител (например, scFv); и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

"Антитело, которое конкурирует за связывание" с контрольным антителом, относится к антителу, которое блокирует связывание контрольного антитела с его антигеном в конкурентном анализе на 50% или более, и, наоборот, референсное антитело блокирует связывание антитела с его антигеном в конкурентном анализе на 50% или более. Пример конкурентного анализа описан в разделе "Антитела", Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY).

Термин "химерные" антитела относится к антителам, в которых часть тяжелой и/или легкой цепи получена из одного источника или вида, в то время как остальная часть тяжелой и/или легкой цепи получена из другого источника или вида.

"Класс" антитела относится к типу константного домена или константной области, которым обладает его тяжелая цепь. Существует пять основных классов антител: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них могут быть дополнительно подразделены на подклассы (изотипы), например IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. Константные домены тяжелой цепи, которые соответствуют различным классам иммуноглобулинов, называются α , δ , ϵ , γ и μ соответственно.

Термин "цитотоксический агент", используемый в настоящем описании, относится к веществу, которое ингибирует или предотвращает клеточную функцию и/или вызывает гибель клеток или их разрушение. Цитотоксические агенты включают, без ограничения, радиоактивные изотопы (например, At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} и радиоактивные изотопы Lu); химиотерапевтические агенты или лекарственные средства (например, метотрексат, адриамицин, алкалоиды барвинка (винкристин, винбластин, этопозид), доксорубицин, мелфалан, митомицин С, хлорамбуцил, даунорубицин или другие интеркалирующие агенты); агенты, ингибирующие рост; ферменты и их фрагменты, такие как нуклеолитические ферменты; антибиотики; токсины, такие как низкомолекулярные токсины или ферментативно активные токсины бактериального, грибного, растительного или животного происхождения, включая их фрагменты и/или варианты; и различные противоопухолевые или противораковые средства, описанные ниже.

"Эффекторная функция" относится к таким видам биологической активности, относимых к Fc-области антитела, которые изменяются с изотипом антитела. Примеры эффекторных функций антитела включают связывание C1q и опосредованную комплементом цитотоксичность (CDC); связывание Fc-рецептора; антитело-зависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC); фагоцитоз; понижающую регуляцию рецепторов клеточной поверхности (например, B-клеточного рецептора); и активацию B-клеток.

"Эффективное количество" агента, например фармацевтической лекарственной формы, относится к количеству, эффективному при необходимых дозах и в течение необходимых периодов времени для достижения желаемого терапевтического или профилактического результата. Для примера, а не в качестве ограничения, "эффективное количество" может относиться к количеству антитела, раскрытого в настоящем описании, которое может облегчить, свести к минимуму и/или предотвратить симптомы заболевания и/или расстройства, продлить выживаемость и/или продлить период до рецидива заболевания и/или расстройства.

Термин "Fc-область" в настоящем описании используется для определения C-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина, которая содержит по меньшей мере часть константной области. Термин включает нативную последовательность Fc-областей и варианты Fc-областей. В некоторых вариантах осуществления Fc-область тяжелой цепи человеческого IgG располагается в пределах от Cys226 или от Pro230 до карбоксильного конца тяжелой цепи. Тем не менее, C-концевой лизин (Lys447) Fc-области может присутствовать или может не присутствовать. Если не указано иное, то нумерация аминокислотных остатков в Fc-области или константной области находится в соответствии с системой нумерации EU, также называемой EU-индексом, как это описано в Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

"Каркасная область" или "FR" относится к аминокислотным остаткам вариационного домена, отличным от аминокислотных остатков гипервариационной области (HVR). FR вариационного домена, как правило, состоит из четырех доменов FR: FR1, FR2, FR3 и FR4. Соответственно, последовательности HVR и FR обычно присутствуют в следующем порядке в VH (или VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

Термины "полноразмерное антитело", "интактное антитело" и "целое антитело" используются в настоящем описании взаимозаменяемо для обозначения антитела, имеющего структуру, по существу, подобную нативной структуре антитела, или имеющего тяжелые цепи, которые содержат Fc-область, как определено в настоящем описании.

Термины "клетка-хозяин", "линия клеток-хозяев" и "культура клеток-хозяев", которые используются в настоящем описании взаимозаменяемо, относятся к клеткам, в которые была введена экзогенная нуклеиновая кислота, в том числе к потомству таких клеток. Клетки-хозяева включают "трансформанты" и "трансформированные клетки", которые включают первичную трансформированную клетку и её потомков без учета числа пассажей. Потомки могут быть не полностью идентичными родительской клетке по содержащимся нуклеиновым кислотам, но могут содержать мутации. Мутантные потомки, которые имеют ту же функцию или биологическую активность, на которые был направлен скрининг или отбор первоначально трансформированных клеток, включены в настоящее описание.

"Человеческое антитело" является антителом, которое имеет аминокислотную последовательность, которая соответствует антителу, образуемому в организме человека или клетках человека или полученному из отличного от человека источника, который использует репертуары антител человека или другие кодирующие антитела человеческие последовательности. Это определение человеческого антитела специально исключает гуманизированное антитело, содержащее нечеловеческие антигенсвязывающие остатки.

"Каркасная область человеческой консенсусной последовательности" является каркасной областью,

которая представляет собой наиболее часто встречающиеся аминокислотные остатки при отборе последовательностей каркасных областей VL или VH человеческого иммуноглобулина. Как правило, отбор последовательностей VL или VH человеческого иммуноглобулина производится из подгруппы последовательностей вариабельных доменов. В общем случае, подгруппа последовательностей является такой подгруппой, которая указана в Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), Vols. 1-3. В некоторых вариантах осуществления для VL подгруппа является подгруппой каппа I, как это указано в Kabat et al. выше. В некоторых вариантах осуществления для VH подгруппа является подгруппой III, как это указано в Kabat et al. выше.

"Гуманизированное" антитело относится к химерному антителу, содержащему аминокислотные остатки из HVR, отличных от человеческих, и аминокислотные остатки из человеческих FR. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело будет содержать, по существу, все из по меньшей мере одного, а обычно двух вариабельных доменов, в которых все или по существу все HVR (например, CDR) соответствуют таковым из антитела, отличного от человеческого антитела, и все или по существу все FR соответствуют таковым в человеческом антителе. Гуманизированное антитело, необязательно, может содержать по меньшей мере часть константной области антитела, полученную из человеческого антитела. "Гуманизированная форма" антитела, например, отличного от человеческого антитела, относится к антителу, которое подверглось гуманизации.

Термин "гипервариабельная область" или "HVR", используемый в настоящем описании, относится к каждой из областей вариабельного домена антитела, которые являются гипервариабельными по последовательности ("определяющие комплементарность области" или "CDR") и/или образуют структурно определенные петли ("гипервариабельные петли"), и/или содержат контактирующие с антигеном остатки ("контакт с антигеном"). Если не указано иное, остатки HVR и другие остатки в вариабельном домене (например, остатки FR) пронумерованы в настоящем описании в соответствии с Kabat et al. выше. Как правило, антитела содержат шесть HVR: три в VH (H1, H2, H3) и три в VL (L1, L2, L3). Примеры HVR в настоящем описании, включают:

(a) гипервариабельные петли, соответствующие аминокислотным остаткам 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) и 96-101 (H3) (Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987));

(b) CDR, соответствующие аминокислотным остаткам 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35b (H1), 50-65 (H2) и 95-102 (H3) (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991));

(c) контакт с антигеном, соответствующий аминокислотным остаткам 27c-36 (L1), 46-55 (L2), 89-96 (L3), 30-35b (H1), 47-58 (H2) и 93-101 (H3) (MacCallum et al. *J. Mol. Biol.* 262: 732-745 (1996)); а также

(d) комбинации (a), (b) и/или (c), включая аминокислотные остатки HVR 46-56 (L2), 47-56 (L2), 48-56 (L2), 49-56 (L2), 26-35 (H1), 26-35b (H1), 49-65 (H2), 93-102 (H3), и 94-102 (H3).

В некоторых вариантах осуществления остатки HVR включают остатки, которые определены на фиг. 3A или 3B или в другом месте данного описания.

"Иммуноконъюгат" относится к антителам, конъюгированным с одной или несколькими гетерологичными молекулами, включая цитотоксический агент, но не ограничиваясь им.

Термины "индивидуум" или "субъект", используемые в настоящем описании взаимозаменяемо, относятся к млекопитающим. Млекопитающие включают, но не ограничиваются ими, одомашненных животных (например, коров, овец, кошек, собак, лошадей), приматов (например, людей и приматов, отличных от человека, таких, как обезьяны), кроликов и грызунов (например, мышей и крыс). В некоторых вариантах осуществления индивидуум или субъект является человеком.

"Выделенное" антитело представляет собой антитело, которое было отделено от компонентов его естественного окружения. В некоторых вариантах осуществления антитело очищают до более чем 95 или 99% чистоты, что определяется, например, электрофоретически (например, SDS-PAGE, изоэлектрическим фокусированием (IEF), капиллярным электрофорезом) или хроматографически (например, ионообменной HPLC или HPLC с обращенной фазой). Для обзора способов оценки чистоты антител см., например, Flatman et al., *J. Chromatogr. B* 848:79-87 (2007).

"Выделенная" нуклеиновая кислота относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая была отделена от компонентов её природного окружения. Выделенная нуклеиновая кислота включает молекулу нуклеиновой кислоты, содержащуюся в клетках, которые обычно содержат эту молекулу нуклеиновой кислоты, но молекула нуклеиновой кислоты присутствует экстрахромосомно или в хромосомной локализации, которая отличается от естественной локализации в хромосоме.

"Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело" (в том числе относящаяся к специфическим антителам, например, анти-KLB антителу) относится к одной или нескольким молекулам нуклеиновых кислот, кодирующим тяжелые и легкие цепи антитела (или их фрагменты), в том числе такой молекуле нуклеиновой кислоты (таким молекулам нуклеиновых кислот) в одном векторе или в отдельных векторах и такой молекуле нуклеиновой кислоты (таким молекулам нуклеиновых кислот), которая присутствует (которые присутствуют) в одном или нескольких местах в клетке-хозяине.

Термин "моноклональное антитело", используемый в настоящем описании, относится к антителу, полученному из популяции, по существу, гомогенных антител, т.е. отдельные антитела, составляющие

популяцию, являются идентичными и/или связывают один и тот же эпитоп, за исключением возможных вариантов антител, например содержащих естественные мутации или мутации, возникающие в процессе получения препарата моноклонального антитела; такие варианты обычно присутствуют в незначительных количествах. В отличие от препаратов поликлональных антител, которые обычно включают различные антитела, направленные против различных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело препарата моноклонального антитела направлено против одной детерминанты на антигене. Таким образом, термин "моноклональный" указывает на характер антитела, полученного из, по существу, гомогенной популяции антител, и не должен быть истолкован как требующий получения антитела каким-либо конкретным способом. Например, моноклональные антитела, которые должны использоваться в соответствии с раскрытым в настоящем описании изобретением, могут быть получены с помощью различных методов, включая, но не ограничиваясь методом гибридомы, методом рекомбинантных ДНК, методом фагового дисплея и методами, предусматривающими использование трансгенных животных, содержащих все или часть локусов человеческого иммуноглобулина, такие способы и другие примеры способов получения моноклональных антител приведены в настоящем описании.

"Голое антитело" относится к антителу, которое не конъюгировано с гетерологичным фрагментом (например, цитотоксическим остатком) или радиоактивной меткой. Голое антитело может присутствовать в фармацевтической лекарственной форме.

"Нативные антитела" относятся к встречающимся в природе молекулам иммуноглобулинов с различными структурами. Так, например, нативные антитела IgG представляют собой гетеротетрамерные гликопротеины размером около 150000 Да, состоящие из двух одинаковых легких цепей и двух одинаковых тяжелых цепей, которые связаны дисульфидными мостиками. От N- к C-концу каждая тяжелая цепь имеет переменную область (VH), которая также называется тяжелым переменным доменом или переменным доменом тяжелой цепи, а затем три константных домена (CH1, CH2 и CH3). Аналогичным образом, от N- к C-концу, каждая легкая цепь имеет переменную область (VL), называемую также легким переменным доменом или переменным доменом легкой цепи, за которым следует константный легкий (CL) домен. Легкая цепь антитела может быть отнесена к одному из двух типов, называемых каппа (κ) и лямбда (λ), согласно аминокислотной последовательности её константного домена.

Термин "вкладыш в упаковку", используемый в настоящем описании, относится к инструкциям, обычно включаемым в коммерческие упаковки терапевтических продуктов, которые содержат информацию о показаниях, применении, дозировке, введении, комбинированной терапии, противопоказаниях и/или предупреждениях, касающихся применения таких терапевтических продуктов.

"Процент (%) идентичности аминокислотной последовательности" по отношению к референсной последовательности полипептида определяется как процент аминокислотных остатков в последовательности-кандидате, которые идентичны аминокислотным остаткам в последовательности референсного полипептида, после выравнивания последовательностей и введения разрывов, если это необходимо, для достижения максимального процента идентичности последовательностей, и без учета любых консервативных замен как части идентичности последовательности. Выравнивания в целях определения процента идентичности аминокислотной последовательности можно достичь различными способами, которые известны специалистам в данной области, например, с использованием общедоступного программного обеспечения, такого как BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR). Специалисты в данной области могут определить соответствующие параметры для выравнивания последовательностей, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей. Для целей настоящего изобретения, однако, значения идентичности последовательности аминокислот в % были получены с использованием компьютерной программы для сравнения последовательностей ALIGN-2. Компьютерная программа для сравнения последовательностей ALIGN-2 разработана Genentech, Inc., и ее исходный код был зарегистрирован с пользовательской документацией в Бюро охраны авторских прав США, Вашингтон, округ Колумбия, 20559, где он зарегистрирован для охраны авторских прав США с регистрационным номером № TXU510087. Программа ALIGN-2 находится в открытом доступе от Genentech, Inc., Южный Сан Франциско, Калифорния, или может быть скомпилирована из исходного кода. Программа ALIGN-2 должна быть скомпилирована для использования в операционной системе UNIX, включая цифровой UNIX V4.0D. Все параметры сравнения последовательностей установлены программой ALIGN-2 и не меняются.

В тех ситуациях, где ALIGN-2 используется для сравнения аминокислотных последовательностей, % идентичности аминокислотной последовательности данной аминокислотной последовательности А по отношению к данной аминокислотной последовательности В, по сравнению с данной аминокислотной последовательностью В или против данной аминокислотной последовательности В (что в качестве альтернативы может быть сформулировано как данная аминокислотная последовательность А, которая имеет определенный % идентичности аминокислотной последовательности по отношению к данной аминокислотной последовательности В, по сравнению с данной аминокислотной последовательностью В или против данной аминокислотной последовательности В) рассчитывают следующим образом:

$$100 \cdot X/Y,$$

где X представляет собой количество аминокислотных остатков, оцененных программой выравнивания ALIGN-2 как идентичные совпадения при программном выравнивании A и B, и где Y представляет общее количество аминокислотных остатков в B. Следует понимать, что там, где длина аминокислотной последовательности A не равна длине аминокислотной последовательности B, % идентичности аминокислотной последовательности A по отношению к B, не будет равен % идентичности аминокислотной последовательности B по отношению к A. Если специально не указано иное, то все значения % идентичности аминокислотных последовательностей, используемые в настоящем описании, получают, как описано в предыдущем абзаце с использованием компьютерной программы ALIGN-2.

Термин "фармацевтическая лекарственная форма" относится к препарату, который находится в форме, способной обеспечить биологическую активность активного ингредиента, содержащегося в нем, для его эффективности, и который не содержит дополнительных компонентов, которые неприемлемо токсичны для субъекта, которому будут вводить лекарственную форму.

Термин "фармацевтически приемлемый носитель", используемый в настоящем описании, относится к ингредиенту в фармацевтической лекарственной форме, который отличается от активного ингредиента и который не токсичен для субъекта. Фармацевтически приемлемый носитель включает буфер, наполнитель, стабилизатор или консервант, но не ограничивается ими.

Используемый в настоящем описании термин "лечение" (и его грамматические варианты, такие как "лечить" или "терапия") относится к клиническому вмешательству в попытке изменить естественное течение состояния индивидуума, подвергаемого лечению, и которое может быть выполнено как с целью профилактики, так и при клинической патологии. Желательные эффекты лечения включают предотвращение возникновения или рецидива заболевания, ослабление симптомов, уменьшение каких-либо прямых или косвенных патологических последствий заболевания, предотвращение метастазирования, снижение скорости прогрессирования заболевания, улучшение или временное облегчение болезненного состояния, ремиссию или улучшение прогноза, но не ограничиваются ими. В некоторых вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению могут быть использованы для задержки развития заболевания или замедления прогрессирования заболевания.

Термин "вариабельная область" или "вариабельный домен" относится к домену тяжелой или легкой цепи антитела, который участвует в связывании антитела с антигеном. Вариабельные домены тяжелой цепи и легкой цепи (VH и VL, соответственно) нативного антитела, как правило, имеют аналогичные структуры, при этом каждый домен содержит четыре консервативные каркасные области (FR) и три гипервариабельные области (HVR). (См., например, Kindt et al. *Kuby Immunology*, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007).) Один домен VH или VL может быть достаточным для придания антигенсвязывающей специфичности. Кроме того, антитела, которые связываются с конкретным антигеном, могут быть выделены с использованием домена VH или VL из антитела, которое связывается с антигеном, для скрининга библиотеки комплементарных доменов VL или VH соответственно. См., например, Portolano et al., *J. Immunol.* 150:880-887 (1993); Clarkson et al., *Nature* 352:624-628 (1991).

Термин "вектор", как он используется в настоящем описании, относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной к переносу другой нуклеиновой кислоты, с которой он связан. Термин включает вектор как самореплицирующуюся структуру нуклеиновой кислоты, а также вектор, включенный в геном клетки-хозяина, в которую он внедрен. Некоторые векторы способны направлять экспрессию нуклеиновых кислот, с которыми они функционально связаны. Такие векторы в настоящем описании называются "экспрессионными векторами".

II. Антитела.

В одном из аспектов настоящее изобретение основано, частично, на обнаружении биспецифических антител, которые связываются с KLB и FGFR1c и избирательно активируют рецепторный комплекс FGFR1c/KLB и индуцируют полезные метаболические изменения, ожидаемые от FGF21-подобной активности, в том числе потерю веса и улучшение метаболизма глюкозы и липидов, без существенного влияния на печень и без потери костной массы.

В некоторых вариантах осуществления предусмотрены антитела, которые связываются с KLB. Настоящее изобретение также относится к анти-FGFR1 антителам, например анти-FGFR1c антителам. Настоящее изобретение также обеспечивает биспецифические антитела, которые связываются с KLB и FGFR1 (называемые в настоящем описании биспецифические анти-KLB/анти-FGFR1 антитела). В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело анти-KLB/анти-FGFR1 по настоящему изобретению связывается с KLB и FGFR1c. В некоторых вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению включают антитела, которые не блокируют связывание и/или взаимодействие FGF лигандов, например FGF19 и FGF21, с комплексом KLB/FGFR1c.

В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению не оказывает существенного влияния на печень, например на функции печени. Не желая быть связанными какой-либо конкретной теорией, авторы предполагают, что антитело по настоящему изобретению не приводит к активации рецепторного комплекса FGFR1c/KLB в печени. В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению не модулирует активность рецепторного комплекса FGFR/KLB в печени по сравнению с модуляцией рецепторного комплекса FGFR/KLB в печени белком FGF21. В некоторых ва-

риантах осуществления антитело по настоящему изобретению не приводит к ингибированию комплекса FGFR4/KLB и/или не приводит к превышению уровня ферментов печени, таких как ALT, AST, ALP и GLDH, но не ограничиваясь ими. В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению не функционирует как агонист комплекса FGFR2c/KLB и/или комплекса FGFR3c/KLB в печени, которые могут активировать сигналинг MAPK и/или изменять экспрессию Spry4 и Dusp6 в печени. В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению не приводит к активации сигналинга MAPK в печени по сравнению с активацией сигналинга MAPK с помощью белка FGF21. В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению не функционирует в качестве агониста комплекса FGFR4/KLB в печени.

В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению может быть гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению включает каркасную область человеческого акцептора, например каркасную область иммуноглобулина человека или структуру человеческой консенсусной последовательности.

В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению может представлять собой моноклональное антитело, в том числе химерное, гуманизированное или человеческое антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению может представлять собой фрагмент антитела, например Fv, Fab, Fab', scFv, диантитело или F(ab')₂. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело представляет собой полноразмерное антитело, например интактное антитело IgG1, или антитело другого класса или изотипа, как определено в настоящем описании. В определенных вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению может включать любой из признаков, по отдельности или в комбинации, как подробно описано ниже в разделах 1-7.

Антитела согласно настоящему изобретению могут быть использованы, например, для диагностики или лечения метаболических нарушений. Неограничивающие примеры метаболических расстройств включают синдром поликистозных яичников (PCOS), метаболический синдром (MetS), ожирение, неалкогольный стеатогепатит (NASH), неалкогольную жировую болезнь печени (NAFLD), гиперлипидемию, артериальную гипертензию, диабет 2 типа, диабет не 2 типа, диабет 1 типа, латентный аутоиммунный диабет (LAD), диабет взрослого типа у молодых (MODY), а также старение и связанные с ним заболевания, такие как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и ALS.

А. Примеры анти-KLB антител.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к выделенным антителам, которые связываются с белком KLB. В некоторых вариантах осуществления анти-KLB антитело по настоящему изобретению связывается с С-концевым доменом KLB. В некоторых вариантах осуществления анти-KLB антитело по настоящему изобретению связывается с фрагментом KLB, который включает аминокислотную последовательность, SSPTRLAVIPWGVKLLRWVRRNYGDMDIYITAS (SEQ ID NO: 142). В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело связывается с тем же эпитопом, что и анти-KLB антитело, например, 8C5, представленное в настоящем описании.

В некоторых вариантах осуществления анти-KLB антитело по настоящему изобретению содержит по меньшей мере одну, две, три, четыре, пять или шесть HVR, выбранных из: (a) HVR-H1, содержащей любую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 1-15, например 12 или 15; (b) HVR-H2, содержащей любую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 16-31, например 28 или 31; (c) HVR-H3, содержащей любую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 32-47, например 44 или 47; (d) HVR-L1, содержащей любую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 48-62, например, 49 или 62; (e) HVR-L2, содержащей любую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 63-78, например 75 или 78; и (f) HVR-L3, содержащей любую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 79-93, например 90 или 93.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает анти-KLB антитело, содержащее по меньшей мере одну, две, три, четыре, пять или шесть HVR, выбранных из: (a) HVR-H1, содержащей SEQ ID NO: 12; (b) HVR-H2, содержащей последовательность SEQ ID NO: 28; (c) HVR-H3, содержащей последовательность SEQ ID NO: 44; (d) HVR-L1, содержащей SEQ ID NO: 49; (e) HVR-L2, содержащей SEQ ID NO: 75; и (f) HVR-L3, содержащей SEQ ID NO: 90. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает анти-KLB антитело, содержащее по меньшей мере одну, две, три, четыре, пять или шесть HVR, выбранных из (a) HVR-H1, содержащей SEQ ID NO: 15; (b) HVR-H2, содержащей SEQ ID NO: 31; (c) HVR-H3, содержащей последовательность SEQ ID NO: 47; (d) HVR-L1, содержащей SEQ ID NO: 62; (e) HVR-L2, содержащей SEQ ID NO: 78; и (f) HVR-L3, содержащей SEQ ID NO: 93.

Настоящее изобретение также относится к анти-KLB антителу, которое содержит последовательность вариативного домена тяжелой цепи (VH), имеющую по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 128. В некоторых вариантах осуществления последовательность VH, имеющая по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности, содержит замены (например, консервативные замены, что раскрыто ниже), инсерции или делеции по отношению к референсной последовательности, но анти-KLB антитело, содержащее эту последовательность, сохраняет способность связываться с KLB. В неко-

торых вариантах осуществления в SEQ ID NO: 128 в общей сложности были замещены, вставлены и/или удалены от 1 до 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления замены, вставки или делеции возникают в областях вне HVR (т.е. в FR). В качестве альтернативы или дополнительно, анти-KLB антитело включает последовательность VH с SEQ ID NO: 128, включая посттрансляционные модификации этой последовательности, что описано ниже. В некоторых вариантах осуществления VH содержит одну, две или три HVR, выбранных из: (a) HVR-H1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, (b) HVR-H2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, и (c) HVR-H3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47.

В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает анти-KLB антитело, где антитело содержит переменный домен легкой цепи (VL), имеющий по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 130. В некоторых вариантах осуществления последовательность VL, имеющая по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности, содержит замены (например, консервативные замены) инсерции или делеции по отношению к референсной последовательности, но анти-KLB антитело, содержащее эту последовательность, сохраняет способность связывать KLB. В некоторых вариантах осуществления в SEQ ID NO: 130 в общей сложности были замещены, вставлены и/или удалены от 1 до 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления замены, вставки или делеции возникают в областях вне HVR (т.е. в FR). В качестве альтернативы или дополнительно, анти-KLB антитело содержит последовательность VL с SEQ ID NO: 130, включая посттрансляционные модификации этой последовательности. В некоторых вариантах осуществления VL содержит одну, две или три HVR, выбранные из (a) HVR-L1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62; (b) HVR-L2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 78; и (c) HVR-L3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93.

Настоящее изобретение также относится к анти-KLB антителу, где антитело содержит VH, как описано в любом из вариантов осуществления, приведенных выше, и VL, как описано в любом из вариантов осуществления, приведенных выше. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело содержит последовательности VH и VL с SEQ ID NO: 128 и SEQ ID NO: 130, соответственно, включая посттрансляционные модификации этих последовательностей.

В некоторых вариантах осуществления анти-KLB антитело связывается с фрагментом KLB, состоящим из аминокислотной последовательности SSPTRLAVIPWGVKLLRWVRRNYGDMDIYITAS (SEQ ID NO: 142).

В. Примеры анти-FGFR1 антител.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к выделенным антителам, которые связываются с белком FGFR1. В некоторых вариантах осуществления анти-FGFR1 антитело по настоящему изобретению связывается с FGFR1c. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает анти-FGFR1 антитело, содержащее по меньшей мере одну, две, три, четыре, пять или шесть HVR, выбранных из: (a) HVR-H1, содержащей SEQ ID NO: 136; (b) HVR-H2, содержащей SEQ ID NO: 137; (c) HVR-H3, содержащей SEQ ID NO: 138; (d) HVR-L1, содержащей SEQ ID NO: 139; (e) HVR-L2, содержащей SEQ ID NO: 140; и (f) HVR-L3, содержащей SEQ ID NO: 141.

В некоторых вариантах осуществления анти-FGFR1 антитело по настоящему изобретению содержит последовательность переменного домена тяжелой цепи (VH), имеющую по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 132. В некоторых вариантах осуществления последовательность VH, имеющая по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности, содержит замены (например, консервативные замены), инсерции или делеции по отношению к референсной последовательности, но анти-FGFR1 антитело, содержащее эту последовательность, сохраняет способность связываться с FGFR1. В некоторых вариантах осуществления в SEQ ID NO: 132 в общей сложности были замещены, вставлены и/или удалены от 1 до 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления замены, вставки или делеции возникают в областях вне HVR (т.е. в FR). В качестве альтернативы или дополнительно, анти-FGFR1 антитело включает последовательность VH с SEQ ID NO: 132, включая посттрансляционные модификации этой последовательности. В некоторых вариантах осуществления VH содержит одну, две или три HVR, выбранные из: (a) HVR-H1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 136, (b) HVR-H2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 137, и (c) HVR-H3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 138.

Настоящее изобретение также относится к антителу анти-FGFR1, где антитело содержит переменный домен легкой цепи (VL), имеющий по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 134. В некоторых вариантах осуществления последовательность VL, имеющая по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности, содержит замены (например, консервативные замены), инсерции или делеции по отношению к референсной последовательности, но анти-FGFR1 антитело, содержащее эту последовательность, сохраняет способность связываться с FGFR1. В некоторых вариантах осуществления в SEQ ID NO: 134 в общей сложности, были замещены, вставлены и/или удалены от 1 до 10 аминокислот. В неко-

торых вариантах осуществления замены, вставки или делеции присутствуют в областях вне HVR (т.е. в FR). В качестве альтернативы или дополнительно, анти-FGFR1 антитело содержит последовательность VL с SEQ ID NO: 134, включая посттрансляционные модификации этой последовательности. В конкретном варианте осуществления VL содержит одну, две или три HVR, выбранные из (a) HVR-L1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 139; (b) HVR-L2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 140; и (c) HVR-L3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 141.

В другом аспекте предусмотрено анти-FGFR1 антитело, которое содержит VH, как в любом из вариантов осуществления, приведенных выше, и VL, как в любом из вариантов осуществления, приведенных выше. В некоторых вариантах осуществления изобретения анти-FGFR1 антитело содержит последовательности VH и VL с SEQ ID NO: 132 и SEQ ID NO: 134, соответственно, включая посттрансляционные модификации этих последовательностей.

В некоторых вариантах осуществления антитело FGFR1 по настоящему изобретению связывается с фрагментом FGFR1c, имеющим аминокислотную последовательность KLHAVPAAKTVKFKCP (SEQ ID NO: 143) или FKPDHRIGGYKVRY (SEQ ID NO: 144).

С. Примеры биспецифических анти-KLB/анти-FGFR1 антител.

Настоящее изобретение также обеспечивает биспецифические антитела, которые связываются с KLB и FGFR1 (т.е. биспецифические анти-KLB/анти-FGFR1 антитела). Биспецифическое антитело имеет две различных специфичности связывания, см., например, патенты США № 5922845 и 5837243; Zeilder (1999) J. Immunol. 163:1246-1252; Somasundaram (1999) Hum. Antibodies 9:47-54; Keler (1997) Cancer Res. 57:4008-4014. Для примера, а не в качестве ограничения, в настоящем описании предусмотрены биспецифические антитела, имеющие один участок связывания (например, участок связывания антигена) для первого эпитопа, присутствующего на KLB, и второй участок связывания для второго эпитопа, присутствующего на FGFR1. Для примера, а не в качестве ограничения, настоящее изобретение относится к антителу, в котором одно плечо связывается с KLB и включает любую из последовательностей анти-KLB антител, представленных в настоящем описании, и второе плечо связывается с FGFR1 и включает любую из последовательностей анти-FGFR1 антител, представленных в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело анти-KLB/анти-FGFR1 по настоящему изобретению имеет один участок связывания первого эпитопа, присутствующий на KLB, и второй участок связывания второго эпитопа, присутствующего на FGFR1c.

В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело анти-KLB/анти-FGFR1, представленное в настоящем описании, относится к антителу, которое модулирует активность комплекса KLB/FGFR1c. Например, биспецифическое анти-KLB/анти-FGFR1 антитело может функционировать в качестве агониста и активировать комплекс KLB/FGFR1c. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело анти-KLB/анти-FGFR1 представляет собой антитело, которое увеличивает активность комплекса KLB/FGFR1c по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 99 или 99,9%. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело анти-KLB/анти-FGFR1 может представлять собой антитело, которое приводит к фосфорилированию последовательно активируемых мишеней комплекса KLB/FGFR1c, например MAPK и/или ERK.

В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело анти-KLB/анти-FGFR1, представленное в настоящем описании, относится к антителу, которое модулирует активность комплекса KLB/FGFR1c и не блокирует взаимодействие и/или связывание нативных лигандов FGF, например FGF19 и FGF21, с комплексом KLB/FGFR1c. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело анти-KLB/анти-FGFR1, представленное в настоящем описании, относится к антителу, которое не блокирует активность и/или связывание нативных лигандов FGF с рецептором FGF в отсутствие KLB. Для примера, а не в качестве ограничения, биспецифическое антитело анти-KLB/анти-FGFR1 по настоящему изобретению не блокирует взаимодействие нативных лигандов FGF с комплексом FGFR1/KLA и/или только FGFR1. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело анти-KLB/анти-FGFR1, представленное в настоящем описании, относится к антителу, которое не блокирует активность и/или связывание нативных лигандов FGF с KLB в отсутствие FGFR1. Для примера, а не в качестве ограничения, биспецифическое антитело анти-KLB/анти-FGFR1 по настоящему изобретению не блокирует взаимодействие нативных лигандов FGF с комплексом FGFR4/KLB, комплексом FGFR2c/KLB и/или комплексом FGFR3c/KLB.

В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело анти-KLB/анти-FGFR1, например биспецифическое антитело анти-KLB/анти-FGFR1c или его антигенсвязывающая часть, включает области тяжелой цепи и легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения полноразмерная тяжелая цепь включает аминокислоты, последовательность которых по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, представленной в SEQ ID NO: 129. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения полноразмерная легкая цепь включает аминокислоты, последовательность которых по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, представленной в SEQ ID NO: 131. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения полноразмерная тяжелая цепь содержит последовательность

аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 129. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения полноразмерная легкая цепь включает последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 131.

В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело анти-KLB/анти-FGFR1, например биспецифическое антитело анти-KLB/анти-FGFR1с или его антигенсвязывающая часть включает переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления переменная область тяжелой цепи включает аминокислоты, последовательность которых по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, представленной в SEQ ID NO: 128. В некоторых вариантах осуществления переменная область легкой цепи включает аминокислоты, последовательность которых по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, представленной в SEQ ID NO: 130. В некоторых вариантах осуществления переменная область тяжелой цепи содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 128. В некоторых вариантах осуществления переменная область легкой цепи включает последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 130.

В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело анти-KLB/анти-FGFR1 содержит по меньшей мере одну, две, три, четыре, пять или шесть HVR, выбранных из (a) HVR-H1, содержащей любую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-15, например, 12 или 15; (b) HVR-H2, содержащей любую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 16-31, например, 28 или 31; (c) HVR-H3, содержащей любую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 32-47, например 44 или 47; (d) HVR-L1, содержащей любую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 48-62, например 49 или 62; (e) HVR-L2, содержащей любую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 63-78, например 75 или 78; и (f) HVR-L3, содержащей любую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 79-93, например 90 или 93.

В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело анти-KLB/анти-FGFR1, например биспецифическое антитело анти-KLB/анти-FGFR1с, содержит по меньшей мере одну, две, три, четыре, пять или шесть HVR, выбранных из (a) HVR-H1, содержащей SEQ ID NO: 12; (b) HVR-H2, содержащей SEQ ID NO: 28; (c) HVR-H3, содержащей SEQ ID NO: 44; (d) HVR-L1, содержащей SEQ ID NO: 49; (e) HVR-L2, содержащей SEQ ID NO: 75; и (f) HVR-L3, содержащей SEQ ID NO: 90. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает анти-KLB антитело, содержащее по меньшей мере одну, две, три, четыре, пять или шесть HVR, выбранных из (a) HVR-H1, содержащей SEQ ID NO: 15; (b) HVR-H2, содержащей SEQ ID NO: 31; (c) HVR-H3, содержащей последовательность SEQ ID NO: 47; (d) HVR-L1, содержащей SEQ ID NO: 62; (e) HVR-L2, содержащей SEQ ID NO: 78; и (f) HVR-L3, содержащей SEQ ID NO: 93.

В некоторых вариантах осуществления биспецифическое анти-KLB/анти-FGFR1 антитело, например биспецифическое анти-KLB/анти-FGFR1 с антителом включает переменную область тяжелой цепи, которая содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3, и переменную область легкой цепи, которая содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3. В некоторых вариантах осуществления домен CDR1 переменной области тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1-15. В некоторых вариантах осуществления домен CDR2 переменной области тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16-31. В некоторых вариантах осуществления домен CDR3 переменной области тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности SEQ ID NO: 32-47. В некоторых вариантах осуществления домен CDR1 переменной области легкой цепи включает аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности SEQ ID NO: 48-62. В некоторых вариантах осуществления домен CDR2 переменной области легкой цепи включает аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности SEQ ID NO: 63-78. В некоторых вариантах осуществления домен CDR3 переменной области легкой цепи включает аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности SEQ ID NO: 79-93.

В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело анти-KLB/анти-FGFR1, например биспецифическое антитело анти-KLB/анти-FGFR1с, включает переменную область тяжелой цепи, которая содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3, и переменную область легкой цепи, которая содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3. В некоторых вариантах осуществления домен CDR1 переменной области тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1-15. В некоторых вариантах осуществления домен CDR2 переменной области тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16-31. В некоторых вариантах осуществления домен CDR3 переменной области тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 32-47. В некоторых вариантах осуществления домен CDR1 переменной области легкой цепи включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 48-62. В некоторых вариантах осуществления домен CDR2 переменной области легкой цепи включает

аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 63-78. В некоторых вариантах осуществления домен CDR3 варибельной области легкой цепи включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 79-93.

В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело анти-KLB/анти-FGFR1, например, биспецифическое антитело анти-KLB/анти-FGFR1c, включает домен CDR1 варибельной области тяжелой цепи, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15; домен CDR2 варибельной области тяжелой цепи, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 31; домен CDR3 варибельной области тяжелой цепи, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 47; домен CDR1 варибельной области легкой цепи, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 62; домен CDR2 варибельной области легкой цепи, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 78; и домен CDR3 варибельной области легкой цепи, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 93.

В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело анти-KLB/анти-FGFR1 включает первое антитело или его антигенсвязывающую часть, и включает второе антитело или его антигенсвязывающую часть, где первое антитело или его антигенсвязывающая часть связывается с эпитопом, присутствующим на KLB, а второе антитело или его антигенсвязывающая часть связывается с эпитопом, присутствующим на FGFR1, например на FGFR1c. Для примера, а не в качестве ограничения, первое антитело или его антигенсвязывающая часть может включать варибельную область тяжелой цепи и варибельную область легкой цепи; и второе антитело или его антигенсвязывающая часть может включать варибельную область тяжелой цепи и варибельную область легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления варибельная область тяжелой цепи первого антитела или его антигенсвязывающей части включает аминокислоты, последовательность которых по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, представленной в SEQ ID NO: 128. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения варибельная область легкой цепи первого антитела или его антигенсвязывающей части включает аминокислоты, последовательность которых по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, представленной в SEQ ID NO: 130. В некоторых вариантах осуществления варибельная область тяжелой цепи второго антитела или его антигенсвязывающей части включает аминокислоты, последовательность которых по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, представленной в SEQ ID NO: 132. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения варибельная область легкой цепи второго антитела или его антигенсвязывающей части включает аминокислоты, последовательность которых по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, представленной в SEQ ID NO: 134.

В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело анти-KLB/анти-FGFR1 связывается с тем же эпитопом, что и анти-KLB антитело, предусмотрено в настоящем описании. Например, в некоторых вариантах осуществления предусмотрено, что биспецифическое антитело анти-KLB/анти-FGFR1 связывается с тем же эпитопом, что и анти-KLB антитело, содержащее последовательность VH из SEQ ID NO: 128, и последовательность VL из SEQ ID NO: 130. В некоторых вариантах осуществления предусмотрено биспецифическое антитело анти-KLB/анти-FGFR1, которое связывается с фрагментом KLB, состоящим из аминокислотной последовательности SSPTRLAVIPWGVKLLRWVRRNYGD MDIYITAS (SEQ ID NO: 142).

В некоторых вариантах осуществления предусмотрено биспецифическое антитело анти-KLB/анти-FGFR1, которое связывается с фрагментом KLB с аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, представленной в SEQ ID NO: 142.

В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело анти-KLB/анти-FGFR1 связывается с тем же эпитопом, что и анти-KLB антитело, предусмотренное в настоящем описании. Например, в некоторых вариантах осуществления предусмотрено, что биспецифическое антитело анти-KLB/анти-FGFR1 связывается с тем же эпитопом, что и анти-KLB антитело, содержащее полную тяжелую цепь с последовательностью SEQ ID NO: 129 и полную легкую цепь с последовательностью SEQ ID NO: 131.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает биспецифическое антитело анти-KLB/анти-FGFR1, которое связывается с тем же эпитопом, что и анти-FGFR1 антитело, представленное в настоящем описании. Например, в некоторых вариантах осуществления, предусмотрено, что биспецифическое антитело анти-KLB/анти-FGFR1 связывается с тем же эпитопом, что и анти-FGFR1 антитело, содержащее последовательность VH из SEQ ID NO: 132 и последовательность VL из SEQ ID NO: 134. В некоторых вариантах осуществления предусмотрено, что биспецифическое антитело анти-KLB/анти-FGFR1 связывается с фрагментом последовательности FGFR1c, содержащим аминокислотную последовательность KLHAVPAAKTVKFKCP (SEQ ID NO: 143) или FKPDHRIGGYKVRY (SEQ ID NO: 144).

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает биспецифическое антитело анти-KLB/анти-FGFR1, которое связывается с тем же эпитопом, что и анти-FGFR1 антитело,

представленное в настоящем описании. Например, в некоторых вариантах осуществления, предусмотрено, что биспецифическое антитело анти-KLB/анти-FGFR1 связывается с тем же эпитопом, что и анти-FGFR1 антитело, содержащее последовательность тяжелой цепи из SEQ ID NO: 133 и последовательность легкой цепи из SEQ ID NO: 135.

В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело анти-KLB/анти-FGFR1 по настоящему изобретению связывается с фрагментом FGFR1c, имеющим аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, представленной в SEQ ID NO: 143.

В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело анти-KLB/анти-FGFR1 по настоящему изобретению связывается с фрагментом FGFR1c, имеющим аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, представленной в SEQ ID NO: 144.

В некоторых вариантах осуществления предусмотрено биспецифическое антитело анти-KLB/анти-FGFR1, которое связывается с фрагментом KLB, имеющим аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, представленной в SEQ ID NO: 142, и связывается с фрагментом FGFR1c, имеющим аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, представленной в SEQ ID NO: 143 или 144.

В некоторых вариантах осуществления предусмотрено биспецифическое антитело анти-KLB/анти-FGFR1, которое связывается с фрагментом KLB, имеющим аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 142, и связывается с фрагментом FGFR1c, имеющим аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 143 или 144.

1) Аффинность антитела.

В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению может иметь константу диссоциации (K_d) $\leq 1M, \leq 100\text{ mM}, \leq 10\text{ mM}, \leq 1\text{ mM}, \leq 100\text{ мкМ}, \leq 10\text{ мкМ}, \leq 1\text{ мкМ}, \leq 100\text{ нМ}, \leq 10\text{ нМ}, \leq 1\text{ нМ}, \leq 0,1\text{ нМ}, \leq 0,01\text{ нМ}$ или $\leq 0,001\text{ нМ}$. В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению может иметь K_d приблизительно 10^{-3} или менее, или 10^{-8} М или менее, например от 10^{-8} до 10^{-13} М, например от 10^{-9} до 10^{-13} М.

В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело анти-KLB/анти-FGFR1 может включать плечо анти-FGFR1, которое имеет K_d приблизительно от 10 нМ до 10 мкМ. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело анти-KLB/анти-FGFR1 с плечом FGFR1, которое имеет низкую аффинность, может снизить риск прочного связывания биспецифического анти-KLB/анти-FGFR1 антитела с FGFR1 в отсутствие KLB и риск предотвращения связывания и/или активации FGFR1 другими лигандами FGF, такими как FGF1, FGF2, FGF8 и FGF23, но не ограничиваясь ими. В некоторых вариантах осуществления плечо FGFR1 с низкой аффинностью делает возможным присутствие более высоких уровней примесей анти-FGFR1, включая, но не ограничиваясь ими, половина анти-FGFR1 антитела, несущая выступ, нековалентные димеры анти-FGFR1, ковалентные димеры анти-FGFR1 и высокомолекулярные варианты, которые не приводят к клинически значимым побочным эффектам. Например, в некоторых вариантах осуществления в препарате биспецифического анти-KLB/анти-FGFR1 антитела по настоящему изобретению могут присутствовать примерно 2% высокомолекулярных антител и 1,5% половина анти-FGFR1 антител, несущих выступ, не приводя к неблагоприятным биологическим эффектам.

В некоторых вариантах осуществления K_d может быть измерена с помощью анализа связывания радиоактивно меченого антигена (RIA). В некоторых вариантах осуществления RIA может быть выполнен с Fab-версией интересующего антитела, и его антигеном. Для примера, а не в качестве ограничения, определение аффинности связывания Fab с антигеном производят посредством уравнивания Fab с минимальной концентрацией (^{125}I)-меченого антигена в присутствии серийных разведений немеченого антигена с последующим захватом связанного антигена на планшете, покрытом анти-Fab антителом (см., например, Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881(1999)). Для создания условий анализа многолуночные планшеты MICROTITER® (Thermo Scientific) покрывали в течение ночи антителом захвата анти-Fab в концентрации 5 мкг/мл (Cappel Labs) в 50 mM растворе карбоната натрия (pH 9,6), а затем блокировали 2% (вес./об.) раствором бычьего сывороточного альбумина в PBS в течение двух-пяти часов при комнатной температуре (приблизительно 23°C). В неадсорбирующей планшете (Nunc # 269620) смешивали 100 или 26 пМ [^{125}I]-антигена с серийными разведениями интересующего Fab (например, в соответствии с оценкой для анти-VEGF антитела, Fab-12, в Presta et al., Cancer Res. 57:4593-4599 (1997)). Интересующий Fab затем инкубировали в течение ночи; тем не менее, инкубирование можно продолжать в течение более длительного периода (например, около 65 ч), чтобы гарантировать достижение состояния равновесия. После этого смеси переносили на планшет захвата для инкубации при комнатной температуре (например, в течение одного часа). Затем раствор удаляли, и планшет промывали восемь раз 0,1% полисорбатом 20 (TWEEN-20®) в PBS. После высыхания планшетов в каждую лунку вносили по 150 мкл сцинтиллятора (MICROSCINT-20™ Packard), и анализировали планшеты на гамма-счетчике TOPCOUNT™ (Packard) в течение десяти минут. Концентрации каждого Fab, которые давали 20% от максимального

связывания или менее, были отобраны для анализа конкурентного связывания.

В некоторых вариантах осуществления K_d может быть измерена с помощью анализа поверхностного плазмонного резонансного BIACORE®. Для примера, а не в качестве ограничения, анализ использованием BIACORE®-2000 или BIACORE®-3000 (Biacore, Inc., Piscataway, NJ) проводят при температуре 25°C на чипах с иммобилизованным антигеном CM5 при ~ 10 единицах отклика (RU). В некоторых вариантах осуществления карбоксиметилированные декстрановые биосенсорные чипы (CM5, Biacore, Inc.) активируют N-этил-N'(3-диметиламинопропил) карбодиимидом (EDC) и N-гидроксисукцинимидом (NHS) в соответствии с инструкциями производителя. Антиген разбавляют 10 mM раствором ацетата натрия, pH 4,8, до концентрации 5 мкг/мл (~ 0,2 мкМ) перед инъекцией при скорости потока 5 мкл/мин до достижения приблизительно 10 единиц отклика (RU) связанного белка. После инъекции для блокирования непрореагировавших групп антигена инъецируют 1M этаноламин. Для измерений кинетики двукратные серийные разведения Fab (от 0,78 до 500 нМ) инъецируют в PBS с 0,05% поверхностно-активного вещества полисорбата 20 (TWEEN-20™) (PBST) при 25°C со скоростью потока приблизительно 25 мкл/мин. Скорости ассоциации (k_{on}) и скорости диссоциации (k_{off}) вычисляют с помощью простой модели связывания Ленгмюра один к одному (BIACORE® Evaluation Software version 3.2) путём одновременной аппроксимации сенсограмм ассоциации и диссоциации. Равновесная константа диссоциации (K_d) может быть вычислена как отношение k_{off}/k_{on} . См., например, Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999). Если по данным поверхностного плазмонного резонансного скорость ассоциации превышает $10 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, то скорость ассоциации может быть определена с помощью метода тушения флуоресценции, который измеряет увеличение или уменьшение интенсивности излучения флуоресценции (возбуждение = 295 нм; эмиссия = 340 нм, полоса пропускания 16 нм) при 25°C от 20 нМ анти-антиген антитела (форма Fab) в PBS, pH 7,2, в присутствии возрастающих концентраций антигена, которые измеряют на спектрометре, таком как спектрометр остановленного потока (Aviv Instruments) или спектрофотометр SLM-AMINCO™ 8000 серии (ThermoSpectronic) с перемешиваемой кюветой.

2) Фрагменты антител.

В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению представляет собой фрагмент антитела. Фрагменты антител включают, без ограничения, фрагменты Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv и scFv, а также другие фрагменты, описанные ниже. Для обзора некоторых фрагментов антител см. Hudson et al. Nat. Med. 9:129-134 (2003). Для обзора фрагментов scFv см., например Pluckthün, in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York), pp. 269-315 (1994); см. также WO 93/16185; и патенты США № 5571894 и 5587458. Для обзора Fab и F(ab')₂-фрагментов, содержащих остаточный эпитоп связывания рецептора и увеличенное время полувыведения in vivo, см. патент США № 5869046.

В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению может быть диантителом. Диантитела являются фрагментами антител с двумя антигенсвязывающими участками, которые могут быть бивалентными или биспецифическими. См., EP 404097; WO 1993/01161; Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003); и Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993). Триантитела и тетраантитела также описаны в Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003).

В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению может представлять собой однодоменное антитело. Однодоменные антитела являются фрагментами антител, которые содержат полный вариабельный домен тяжелой цепи, или его часть, или полный вариабельный домен легкой цепи антитела, или его часть. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело является человеческим однодоменным антителом (Domantis, Inc., Waltham, MA; см., например, патент США № 6248516 B1).

Фрагменты антител могут быть получены различными методами, включая протеолитическое расщепление интактного антитела, а также получение из рекомбинантных клеток-хозяев (например, E.coli или фага), как раскрыто в настоящем описании, но не ограничиваясь этим.

3) Химерные и гуманизированные антитела.

В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению представляет собой химерное антитело. Определенные химерные антитела описаны, например, в патенте США № 4816567; и Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)). В некоторых вариантах осуществления химерное антитело по настоящему изобретению содержит вариабельную область, отличную от человеческой (например, вариабельную область, полученную от мыши, крысы, хомяка, кролика или примата, не являющегося человеком, такого как обезьяна), и человеческую константную область. В еще одном примере химерное антитело может быть антителом "переключенного класса", в котором класс или подкласс был изменен по сравнению с исходным антителом. Химерные антитела включают их антигенсвязывающие фрагменты.

В некоторых вариантах осуществления химерное антитело по настоящему изобретению может представлять собой гуманизированное антитело. Как правило, антитело, отличное от человеческого, гуманизируют для снижения иммуногенности для человека, сохраняя при этом специфичность и аффинность исходного, отличного от человеческого антитела. Как правило, гуманизированное антитело содер-

жит один или несколько переменных доменов, в которых HVR, например CDR (или их части), получены из отличного от человеческого антитела, и FR (или их части) получены из последовательностей человеческого антитела. Гуманизированное антитело необязательно также будет содержать по меньшей мере часть человеческой константной области. В некоторых вариантах осуществления некоторые остатки FR гуманизированного антитела замещены соответствующими остатками из отличного от человеческого антитела (например, антитела, из которого получены остатки HVR), например, для восстановления или улучшения специфичности или аффинности антитела.

Гуманизированные антитела и способы их получения рассматриваются, например, в Almagro and Fransson, *Front. Biosci.*, 13:1619-1633 (2008), и далее описаны, например, в Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988); Queen et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86:10029-10033 (1989); патенты США № 5821337, 7527791, 6982321 и 7087409; Kashmiri et al., *Methods*, 36:25-34 (2005) (описание перестановки определяющих специфичность областей (SDR)); Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489-498 (1991) (описание "замены поверхности"); Dall'Acqua et al., *Methods* 36:43-60 (2005) (описание "перестановки FR"); и Osbourn et al., *Methods* 36:61-68 (2005) и Klimka et al., *Br. J. Cancer*, 83:252-260 (2000) (описание подхода "направленной селекции" при перестановке FR).

Человеческие каркасные области, которые могут быть использованы для гуманизации, включают, без ограничения, каркасные области, выбранные методом "наилучшего соответствия" (см., например, Sims et al. *J. Immunol.*, 151:2296 (1993)); каркасные области, полученные из консенсусной последовательности человеческих антител определенной подгруппы переменных областей легкой или тяжелой цепей (см., например, Carter et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); и Presta et al. *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)); зрелые человеческие (соматически мутированные) каркасные области или человеческие каркасные области зародышевой линии (см., например, Almagro and Fransson, *Front. Biosci.*, 13:1619-1633 (2008)); и каркасные области получены путём скрининга библиотек FR (см., например, Baca et al., *J. Biol. Chem.*, 272:10678-10684 (1997) и Rosok et al., *J. Biol. Chem.*, 271:22611-22618 (1996)).

4) Человеческие антитела.

В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению может представлять собой человеческое антитело. Человеческие антитела могут быть получены с использованием различных способов, известных в данной области техники. Человеческие антитела в целом описаны van Dijk and van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 5: 368-74 (2001) и Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.*, 20:450-459 (2008).

Человеческие антитела могут быть получены путем введения иммуногена трансгенному животному, который был модифицирован для получения интактных человеческих антител или интактных антител с человеческими переменными областями в ответ на введение антигена. Такие животные, как правило, содержат весь локус человеческого иммуноглобулина, или его часть, которые заменяют эндогенные локусы иммуноглобулинов, или которые присутствуют экстрахромосомно или интегрированы случайным образом в хромосомы животного. У таких трансгенных мышей эндогенные локусы иммуноглобулинов, как правило, инактивируются. Для обзора способов получения человеческих антител из трансгенных животных см. Lonberg, *Nat. Biotech.*, 23:1117-1125 (2005). См. также, например, патенты США № 6075181 и 6150584, описывающие технологию XENOMOUSE™; патент США № 5770429, описывающий технологию HUMAB®; патент США № 7041870, описывающий технологию K-M MOUSE®, и опубликованную патентную заявку США № US 2007/0061900, описывающую технологию VELOCIMOUSE™. Человеческие переменные области интактных антител, полученные от таких животных, могут быть дополнительно модифицированы, например, путем объединения с другой человеческой константной областью.

Человеческие антитела также могут быть получены методами гибридом. Были описаны клеточные линии миеломы человека и гетеромиеломы мыши-человека для получения моноклональных человеческих антител. (См., например, Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); и Boerner et al., *J. Immunol.*, 147: 86 (1991).) Человеческие антитела, полученные методом гибридомы В-клеток человека, также описаны в Li et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006). Дополнительные способы включают способы, описанные, например, в патенте США № 7189826 (описание получения моноклональных человеческих антител IgM из гибридомных клеточных линий) и в Ni, Xiandai Mianyixue, 26(4):265-268 (2006) (описание гибридом человека-человека). Технология человеческой гибридомы (триомная технология) также описана в Vollmers and Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005) и Vollmers and Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3): 185-91 (2005).

Человеческие антитела также могут быть получены путем выделения клонов последовательности Fv переменного домена, выбранных из библиотек фагового дисплея человеческого происхождения. Такие последовательности переменного домена можно затем объединить с желаемой человеческой константной областью.

Способы отбора человеческих антител из библиотек антител описаны ниже.

5) Антитела, полученные из библиотек.

Антитела согласно настоящему изобретению могут быть выделены путем скрининга комбинатор-

ных библиотек для отбора антител с желаемой активностью или активностями. Например, в данной области известны различные способы получения библиотек фагового дисплея и скрининга таких библиотек на наличие антител, обладающих желательными характеристиками связывания. Такие способы рассмотрены, например, в Hoogenboom et al. в *Methods in Molecular Biology*, 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) и дополнительно раскрыты, например, в McCafferty et al., *Nature* 348:552-554; Clackson et al., *Nature* 352: 624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1992); Marks and Bradbury, *Methods in Molecular Biology*, 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.*, 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.*, 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(34): 12467-12472 (2004); и Lee et al., *J. Immunol. Methods*, 284(1-2): 119-132 (2004).

В некоторых способах фагового дисплея репертуары генов VH и VL клонируют отдельно с помощью полимеразной цепной реакции (PCR) и рекомбинируют случайным образом в фаговых библиотеках, которые затем могут быть подвергнуты скринингу на антигенсвязывающий фаг, как описано в Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Фаг обычно содержит фрагменты антител в виде одноцепочечных Fv (scFv) фрагментов или в виде Fab-фрагментов. Библиотеки из иммунизированных источников позволяют получить антитела с высокой аффинностью к иммуногену без необходимости создания гибридом. В качестве альтернативы, можно клонировать наивный репертуар (например, человека), чтобы обеспечить единый источник антител к широкому спектру чужеродных, а также собственных антигенов без какой-либо иммунизации, как описано в Griffiths et al., *EMBO J.*, 12: 725-734 (1993). В некоторых вариантах осуществления наивные библиотеки могут также быть сделаны синтетически путём клонирования сегментов перестроенных V-генов из стволовых клеток, а также с использованием праймеров для PCR, содержащих случайную последовательность для кодирования высоковариабельных областей CDR3 и осуществления перегруппировки *in vitro*, как описано Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992). Патентные публикации, описывающие фаговые библиотеки человеческих антител, включают, например, патент США № 5750373 и патентные публикации США № 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936 и 2009/0002360.

Антитела или фрагменты антител, выделенные из библиотек человеческих антител, считаются человеческими антителами или фрагментами человеческих антител в настоящем описании.

6) Мультиспецифические антитела.

В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению может представлять собой мультиспецифическое антитело, например биспецифическое антитело. Мультиспецифические антитела представляют собой моноклональные антитела, которые обладают специфичностью связывания в отношении по меньшей мере двух различных эпитопов. В некоторых вариантах осуществления одной из специфичностей связывания является эпитоп, присутствующий на KLB, а другой - эпитоп на любом другом антигене. В некоторых вариантах осуществления одной из специфичностей связывания является эпитоп, присутствующий на FGFR1, а другой - эпитоп на любом другом антигене. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело по настоящему изобретению может связываться с эпитопом KLB и может связываться с эпитопом FGFR1. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело по настоящему изобретению может связываться с эпитопом KLB и может связываться с эпитопом FGFR1c. Биспецифические антитела могут быть получены в виде полноразмерных антител или фрагментов антител.

Способы получения мультиспецифических антител включают, без ограничения, рекомбинантную коэкспрессию двух пар тяжелой цепи и легкой цепи иммуноглобулина, имеющих различные специфичности (см. Milstein and Cuellar, *Nature* 305: 537 (1983)), WO 93/08829, и Traunecker et al., *EMBO J.*, 10: 3655 (1991), и конструирование "выступ-во-впадину" (см., например, патент США № 5731168). Мультиспецифические антитела могут быть также получены путём создания электростатических направляющих эффектов для получения Fc-гетеродимерных молекул антител (WO 2009/089004 A1); сшивания двух или более антител или их фрагментов (см., например, патент США № 4676980 и Brennan et al., *Science*, 229: 81 (1985)); с использованием лейциновых молний для получения биспецифических антител (см., например, Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148(5): 1547-1553 (1992)); с помощью технологии "диантител" для получения фрагментов биспецифических антител (см., например, Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)); и с использованием одноцепочечных димеров Fv (sFv) (см., например, Gruber et al., *J. Immunol.*, 152:5368 (1994)); и получения триспецифических антител, как это описано, например, в Tutt et al. *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

Сконструированные антитела с тремя или более функциональными антигенсвязывающими участками, включая антитела-"осьминоги", также включены в описание (см., например, US 2006/0025576 A1).

7) Варианты антител.

Настоящее описание дополнительно предусматривает варианты аминокислотных последовательностей раскрытых антител. Например, может быть желательным улучшение аффинности связывания и/или других биологических свойств антитела. Варианты аминокислотных последовательностей антитела могут быть получены путем внесения соответствующих модификаций в нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело, или путем пептидного синтеза. Такие модификации включают делеции, и/или вставки, и/или замены остатков в аминокислотных последовательностях антитела, но не ограничиваются

ими. Для получения конечной конструкции может быть произведена любая комбинация делеций, вставок и замен, при условии, что конечное антитело, т.е. модифицированное антитело, обладает требуемыми характеристиками, например, в отношении связывания антигена.

а) Варианты, содержащие замену, вставку и делецию.

В некоторых вариантах осуществления варианты антител могут иметь одну или несколько аминокислотных замен. Участки, представляющие интерес для мутагенеза путем введения замен, включают HVR и FR. Неограничивающие примеры консервативных замен показаны в табл. 1 под заголовком "предпочтительные замены". Неограничивающие примеры более существенных изменений представлены в табл. 1 под заголовком "примеры замен", и, как дополнительно описано ниже, замены разделены в соответствии с классом боковой цепи аминокислоты. Аминокислотные замены могут быть введены в интересующее антитело, и продукты могут быть подвергнуты скринингу на желательную активность, например сохранившееся/усиленное связывание антигена, снижение иммуногенности или улучшение комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC) или антитело-зависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC).

Таблица 1

Исходный остаток	Примеры замен	Предпочтительные замены
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; Норлейцин	Leu
Leu (L)	Норлейцин; 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; Норлейцин	Leu

Аминокислоты могут быть сгруппированы в соответствии с общими свойствами боковой цепи:

- (1) гидрофобные: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) кислотные: Asp, Glu;
- (4) основные: His, Lys, Arg;
- (5) остатки, которые влияют на ориентацию цепи: Gly, Pro;
- (6) ароматические: Trp, Tyr, Phe.

В некоторых вариантах осуществления неконсервативные замены означают замену представителя одного из этих классов на представителя из другого класса.

В некоторых вариантах осуществления один из вариантов введения замен включает замещение одного или нескольких остатков гипервариабельной области исходного антитела, например гуманизированного или человеческого антитела. Как правило, полученный вариант (полученные варианты), который

отбирают для дальнейшего исследования, характеризуется измененными, например улучшенными, определенными биологическими свойствами, такими как, например, повышенная аффинность, сниженная иммуногенность по сравнению с исходным антителом, и/или, по существу, сохраняют некоторые биологические свойства исходного антитела. Неограничивающим примером варианта с заменой является антитело со зрелой аффинностью, которое удобно получать, например, с использованием способов созревания аффинности на основе фагового дисплея, таких как способы, которые представлены в настоящем описании. Коротко, один или несколько остатков HVR мутируют и варианты антитела подвергают скринингу с использованием фагового дисплея для обнаружения конкретной биологической активности (например, аффинности связывания).

В некоторых вариантах осуществления изменения (например, замены) могут быть введены в HVR, например, для улучшения аффинности антитела. Такие изменения могут быть введены в "горячие точки" HVR, т.е. по аминокислотным остаткам, кодируемым кодонами, которые подвергаются мутациям с высокой частотой в ходе процесса соматического созревания (см., например, Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)), и/или остаткам, которые контактируют с антигеном, и полученные варианты VH или VL могут быть проанализированы на аффинность связывания. Созревание аффинности путем конструирования и повторного отбора из вторичных библиотек описано, например, в Hoogenboom et al. in *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001)). В некоторых вариантах созревания аффинности множество вариантов последовательности разных генов, выбранных для созревания, может быть получено с помощью любого из множества способов (например, ПНР с ошибками, перетасовки участков цепи или олигонуклеотид-направленного мутагенеза). Затем создается вторичная библиотека. Далее эту библиотеку скринируют для идентификации любых вариантов антител с желаемой аффинностью. Другой способ получения множества вариантов последовательности включает HVR-направленные подходы, в которых рандомизируют несколько остатков HVR (например, 4-6 остатков за один раз). Остатки HVR, вовлеченные в связывание с антигеном, могут быть идентифицированы, например, с использованием аланин-сканирующего мутагенеза или моделирования. CDR-H3 и CDR-L3, в частности, часто становятся мишенью мутагенеза.

В некоторых вариантах осуществления замены, вставки или делеции могут быть введены в один или несколько HVR при условии, что изменения не приведут к существенному снижению способности антитела связывать антиген. Например, в HVR могут быть введены консервативные изменения (например, консервативные замены, как это предусмотрено в настоящем описании), которые существенно не снижают аффинность связывания. Такие изменения, например, могут быть введены вне контактирующих с антигеном остатков в HVR. В некоторых вариантах последовательностей VH и VL, указанных выше, каждая HVR либо остаётся неизменной, либо содержит не более одной, двух или трех аминокислотных замен.

Полезный способ идентификации остатков или областей антитела, которые могут быть использованы для мутагенеза, называется "аланин-сканирующий мутагенез", как описано в Cunningham and Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085. В этом способе остаток или группу остатков-мишеней (например, заряженные остатки, такие как Arg, Asp, His, Lys и Glu) идентифицируют и заменяют нейтральной или отрицательно заряженной аминокислотой (например, аланином или полиаланином), чтобы определить, влияет ли остаток или группа остатков на взаимодействие антитела с антигеном. В места расположения аминокислот, проявляющих функциональную чувствительность к начальным заменам, могут быть введены дополнительные замены. В качестве альтернативы или дополнительно, кристаллическая структура комплекса антиген-антитело может быть использована для идентификации точек контакта между антителом и антигеном. Такие контактные остатки и соседние остатки могут быть выбраны для мутагенеза или исключены из кандидатов на проведение мутагенеза. Варианты могут быть подвергнуты скринингу, чтобы определить, обладают ли они желаемыми свойствами.

Вставки аминокислотных последовательностей включают слитые с амино- и/или карбокси-концом полипептиды длиной от одного остатка до ста или более остатков, а также вставки внутрь последовательности одного или множества аминокислотных остатков. Примеры концевых вставок включают антитело с N-концевым остатком метионина. Другие инсерционные варианты молекулы антитела включают слияние N-или C-конца антитела с ферментом (например, для антитело-направленной ферментативной пролекарственной терапии (ADEPT)) или полипептидом, который увеличивает время полувыведения антитела в сыворотке.

б) Варианты гликозилирования.

В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению может быть изменено для увеличения или уменьшения степени его гликозилирования. Добавление или удаление участков гликозилирования к антителу может быть легко достигнуто путем изменения аминокислотной последовательности таким образом, чтобы ввести или удалить один или несколько участков гликозилирования.

В некоторых вариантах осуществления, где антитело содержит Fc-область, может быть изменен присоединенный к нему углеводный фрагмент. Нативные антитела, продуцируемые клетками млекопитающих, обычно содержат разветвленный, двуветвистый олигосахарид, который, как правило, прикреплен через N-связь к Asn297 в CH2-домине Fc-области. См., например, Wright et al. *TIBTECH* 15:26-32 (1997). Олигосахарид может включать различные углеводы, например маннозу, N-ацетил-глюкозамин

(GlcNAc), галактозу и сиаловую кислоту, а также фукозу, прикрепленную к GlcNAc в "основании" двуветвистой структуры олигосахарида. В некоторых вариантах осуществления модификации олигосахаридов антитела по настоящему изобретению могут быть осуществлены для создания вариантов антител с определенными улучшенными свойствами.

В некоторых вариантах осуществления предусмотрены варианты антител с углеводной структурой, в которой отсутствует прикрепленная к области Fc фукоза (прямо или косвенно). Например, количество фукозы в таких антителах может составлять от примерно 1% до примерно 80%, от примерно 1% до примерно 65%, от примерно 5% до примерно 65% или от примерно 20% до примерно 40%, включая промежуточные значения.

В некоторых вариантах осуществления количество фукозы может быть определено путем вычисления среднего количества фукозы в углеводной цепи при Asn297 по отношению к сумме всех углеводных структур, прикрепленных к Asn 297 (например, сложные, гибридные структуры и структуры с высоким содержанием маннозы), что определяется методом масс-спектрометрии MALDI-TOF, как, например, описано в публикации WO 2008/077546. Asn297 относится к остатку аспарагина, расположенному примерно в положении 297 в области Fc (Eu нумерация остатков области Fc); тем не менее, Asn297 также может быть расположен на расстоянии ± 3 аминокислот до или после положения 297, т.е. между позициями 294 и 300, из-за незначительных вариаций последовательности антител. Такие варианты фукозирования могут иметь улучшенную функцию ADCC. См., например, патентные публикации США US 2003/0157108 (Presta L.); 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.). Примеры публикаций, относящихся к "дефукозифицированным" или "фукоза-дефицитным" вариантам антител, включают 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; WO 2005/053742; WO 2002/031140; Okazaki et al. *J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.*, 87: 614 (2004).

Дефукозифицированные антитела могут быть получены в любой клеточной линии, которая является дефицитной по белку фукозирования. Не ограничивающие примеры клеточных линий включают клетки Lec13 CHO, дефицитные по белку фукозирования (Ripka et al. *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); заявка США US 2003/0157108 A1, Presta L; и WO 2004/056312 A1, Adams et al., особенно пример 11) и нокаутные клеточные линии, такие как клетки CHO с нокаутом гена альфа-1,6-фукозилтрансферазы, FUT8 (см., например, Yamane-Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004); Kanda Y. et al., *Bio-technol. Bioeng.*, 94(4):680-688 (2006); и WO 2003/085107).

Также предусмотрены варианты антител с двуветвистыми олигосахаридами, например, в которых двуветвистый олигосахарид, присоединенный к области Fc антитела, делится на две части посредством GlcNAc. Такие варианты антител могут иметь пониженное фукозирование и/или улучшенную функцию ADCC. Неограничивающие примеры таких вариантов антител описаны, например, в заявке WO 2003/011878 (Jean-Mairet et al.); патенте США 6602684 (Umana et al.); и US 2005/0123546 (Umana et al.). Также предусмотрены варианты антител по меньшей мере с одним остатком галактозы в олигосахариде, прикрепленном к Fc-области. Такие варианты антител могут иметь улучшенную функцию CDC. Такие варианты антител описаны, например, в WO 1997/30087 (Patel et al.); WO 1998/58964 (Raju S.); и WO 1999/22764 (Raju S.).

с) Варианты области Fc.

В некоторых вариантах осуществления в область Fc антитела, представленного в настоящем описании, могут быть введены одна или несколько модификаций аминокислот, что ведёт к созданию варианта области Fc. Вариант области Fc может содержать человеческую последовательность области Fc (например, человеческих областей Fc IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4), содержащую аминокислотную модификацию (например, замену) в одном или нескольких положениях аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает вариант антитела, который обладает некоторыми, но не всеми эффекторными функциями, что делает его желательным кандидатом для тех применений, где период полувыведения антитела *in vivo* является важным, но некоторые эффекторные функции (такие как комплемент и ADCC) не являются нужными или полезными. Для подтверждения уменьшения/устранения активности CDC и/или ADCC может быть проведен анализ цитотоксичности *in vitro* и/или *in vivo*. Например, чтобы гарантировать, что антитело не имеет связывания FcγR (следовательно, скорее всего, не имеет активности ADCC), но при этом сохраняет активность связывания FcRn, может быть проведен анализ связывания рецептора Fc (FcR). Первичные клетки для опосредования ADCC, NK-клетки, экспрессируют только FcγRIII, тогда как моноциты экспрессируют FcγRI, FcγRII и FcγRIII. Экспрессия FcR в гемопоэтических клетках приведена в табл. 3 на стр. 464 в Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991). Неограничивающие примеры анализов *in vitro* для оценки активности ADCC представляющей интерес молекулы описаны в патенте США № 5500362 (см., например, Hellstrom, I. et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci., USA* 83:7059-7063 (1986)) и Hellstrom I. et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82:1499-1502 (1985); 5821337 (см. Bruggemann M. et al., *J. Exp. Med.* 166:1351-1361 (1987)). В качестве альтернативы, могут быть использованы нерадиоактивные методы анализа (см., на-

пример, нерадиоактивный анализ цитотоксичности АСТИ™ для проточной цитометрии (Cell Technology, Inc. Mountain View, Калифорния); и нерадиоактивный анализ цитотоксичности CYTOTOX 96® (Promega, Madison, Висконсин). Подходящие эффекторные клетки для таких анализов включают мононуклеарные клетки периферической крови (ПБМК) и натуральные киллеры (NK). В качестве альтернативы или дополнительно, активность ADCC представляющей интерес молекулы может быть оценена *in vivo*, например, в модели на животных, такой как модель, описанная в Clynes et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 95:652-656 (1998). Для подтверждения отсутствия способности антитела связывать C1q и, следовательно, отсутствия активности CDC также могут быть выполнены анализы связывания C1q. См., например, анализ связывания C1q и C3с методом ELISA в WO 2006/029879 и WO 2005/100402. Для оценки активации комплемента может быть выполнен контроль CDC (см., например, Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996); Cragg M.S. et al., *Blood*, 101:1045-1052 (2003); и Cragg M.S. and M.J. Glennie, *Blood*, 103:2738-2743 (2004)). Анализ связывания FcRn и определение клиренса/полувыведения *in vivo* также могут быть выполнены с использованием способов, известных в данной области (см., например Petkova S.B. et al., *Int'l. Immunol.*, 18(12): 1759-1769 (2006)). В некоторых вариантах осуществления в Fc-область могут быть введены изменения, которые приводят к изменению (т.е. либо усилению, либо ослаблению) связывания C1q и/или комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC), например, как описано в патенте США № 6194551, WO 99/51642, и Idusogie et al. *J. Immunol.*, 164: 4178-4184 (2000).

Антитела с пониженной эффекторной функцией включают антитела с заменой одного или нескольких остатков, выбранных из остатков 238, 265, 269, 270, 297, 327 и 329 в области Fc (патент США № 6737056). Такие Fc-мутанты включают Fc-мутанты с заменами в двух или более аминокислотных положениях, выбранных из 265, 269, 270, 297 и 327, в том числе так называемый "DANA" Fc-мутант с заменой остатков 265 и 297 на аланин (патент США № 7332581).

Описаны некоторые варианты антител с усиленным или ослабленным связыванием с FcR. См., например, патент США № 6737056; WO 2004/056312 и Shields et al., *J. Biol. Chem.*, 9(2): 6591-6604 (2001).

В некоторых вариантах осуществления вариант антитела по настоящему изобретению включает область Fc с одной или несколькими аминокислотными заменами, которые улучшают ADCC, например, заменами в положениях 298, 333 и/или 334 в области Fc (нумерация остатков EU).

В некоторых вариантах осуществления изменение, внесенное в область Fc антитела, например биспецифического антитела, представленного в настоящем описании, может произвести вариант антитела с увеличенным периодом полувыведения и улучшенным связыванием с неонатальным рецептором Fc (FcRn), который отвечает за перенос материнских IgG к плоду (Guyer et al., *J. Immunol.*, 117:587 (1976) и Kim et al., *J. Immunol.*, 24:249 (1994)), как описано в US 2005/0014934 A1 (Hinton et al.). Эти антитела содержат область Fc с одной или несколькими заменами, которые улучшают связывание области Fc с FcRn. Такие варианты Fc включают замены по одному или нескольким из остатков области Fc, выбранным из остатков 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 или 434, например замену остатка 434 в области Fc (патент США № 7371826).

См. также Duncan & Winter, *Nature* 322:738-40 (1988); патент США № 5648260; патент США № 5624821; и WO 94/29351, касающиеся других примеров вариантов области Fc.

d) Варианты антител с введенным остатком цистеина.

В некоторых вариантах осуществления может быть желательно создать варианты антител с введенным цистеином, например "thioMAb", в которых один или несколько остатков антитела замещены остатками цистеина. В конкретных вариантах осуществления замещенные остатки встречаются в доступных участках антитела. При замене этих остатков цистеином активные тиольные группы, таким образом, оказываются расположенными в доступных местах антитела и могут быть использованы для конъюгации антитела с другими группами, такими как молекулы лекарственного средства или линкерные участки лекарственного средства, для создания иммуоноконъюгата, как описано далее в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления один или несколько из следующих остатков могут быть заменены цистеином: V205 (нумерация Kabat) легкой цепи; A118 (нумерация EU) тяжелой цепи; и S400 (нумерация EU) тяжелой цепи области Fc. Антитела с введенным цистеином могут быть получены, как описано, например, в патенте США № 7521541.

e) Производные антител.

В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению может быть дополнительно модифицировано для включения в него дополнительных небелковых фрагментов, которые известны в данной области и легкодоступны. Фрагменты, подходящие для получения производных антитела, включают водорастворимые полимеры, но не ограничиваются ими. Неограничивающие примеры водорастворимых полимеров включают полиэтиленгликоль (PEG), сополимеры этиленгликоля/пропиленгликоля, карбоксиметилцеллюлозу, декстран, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон, поли-1,3-диоксолан, поликристаллический 1,3,6-триоксан, этилен/малеиновый ангидрид, полиаминокислоты (либо гомополимеры, либо статистические сополимеры), декстран или поли(N-винилпирролидон)полиэтиленгликоль, гомополимеры пропиленгликоля, сополимеры пропиленоксида/этиленоксида, полиоксипропилированные полиолы (например, глицерин), поливиниловый спирт и их смеси, но не ограничиваются

вышеперечисленными. Полиэтиленгликольпропиональдегид может иметь преимущества в производстве из-за его стабильности в воде. Полимер может быть любой молекулярной массы и может быть разветвленным или неразветвленным. Количество полимеров, присоединенных к антителу, может варьировать, и, если присоединено более одного полимера, то они могут быть одинаковыми или разными молекулами. В целом, количество и/или тип полимеров, используемых для получения производных, могут быть определены на основе соображений, включающих, без ограничения, конкретные свойства или функции антитела, которые будут улучшены, возможность применения производного антитела в терапии при определенных условиях и т.д.

В некоторых вариантах осуществления предусмотрены конъюгаты антитела и небелкового фрагмента, которые могут быть селективно нагреты при воздействии излучения. В одном варианте осуществления небелковый фрагмент представляет собой углеродную нанотрубку (Kam et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 11600-11605 (2005)). В некоторых вариантах осуществления излучение может быть любой длины волны и включает, без ограничения, длины волн, которые не повреждают обычные клетки, но которые нагревают небелковый фрагмент до температуры, при которой ближайшие к антителу небелковому фрагменту клетки гибнут.

D. Способы получения антител.

Антитела, представленные в настоящем описании, могут быть получены с использованием любого подхода, доступного или известного в данной области техники. В качестве примера, но не в качестве ограничения, антитела могут быть получены с использованием рекомбинантных способов и композиций, например, как описано в патенте США № 4816567. Процедуры получения антител подробно описаны в приведенных ниже примерах.

В настоящем описании дополнительно предусмотрена выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело, раскрытое в настоящем описании. Например, выделенная нуклеиновая кислота может кодировать аминокислотную последовательность, которая включает VL, и/или аминокислотную последовательность, которая включает VH антитела, например легкие и/или тяжелые цепи антитела. В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота может включать нуклеотидную последовательность, которая кодирует последовательность аминокислот вариационной области тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 128, и/или нуклеотидную последовательность, которая кодирует последовательность аминокислот вариационной области легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 130.

В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота может присутствовать в одном или более векторах, например в экспрессионных векторах. Используемый в настоящем описании термин "вектор" относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной транспортировать другую нуклеиновую кислоту, с которой она связана. Одним из типов векторов является "плазмида", которая относится к кольцевой двухцепочечной петле ДНК, в которую могут быть лигированы дополнительные сегменты ДНК. Другим типом вектора является вирусный вектор, в котором дополнительные сегменты ДНК могут быть лигированы в вирусный геном. Некоторые векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они введены (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальный сайт инициации репликации, и эпизомальные векторы млекопитающих). Другие векторы (например, неэпизомальные векторы млекопитающих) интегрируются в геном клетки-хозяина при введении в клетку-хозяина, и таким образом реплицируются вместе с геномом хозяина. Более того, некоторые векторы, экспрессионные векторы, способны регулировать экспрессию генов, с которыми они функционально связаны. В общем случае, экспрессионные векторы, используемые в методах рекомбинантных ДНК, часто находятся в виде плазмид (векторов). Тем не менее, раскрытый предмет изобретения предназначен для включения и других форм экспрессионных векторов, таких как вирусные векторы (например, дефектные по репликации ретровирусы, аденовирусы и адено-ассоциированные вирусы), которые выполняют эквивалентные функции.

В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая антитело по настоящему изобретению, и/или один или несколько векторов, включающих нуклеиновые кислоты, могут быть введены в клетку-хозяина. В некоторых вариантах осуществления введение нуклеиновой кислоты в клетку может быть осуществлено любым способом, известным в данной области, включая, но не ограничиваясь трансфекцией, электропорацией, микроинъекцией, инфекцией вирусным вектором или вектором бактериофага, содержащим последовательности нуклеиновых кислот, слиянием клеток, хромосома-опосредованным переносом генов, опосредованным микроклетками переносом генов, слиянием сферопластов и т.д. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин может включать, например, быть трансформированной: (1) вектором, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую аминокислотную последовательность, содержащую VL антитела, и аминокислотную последовательность, содержащую VH антитела, или (2) первым вектором, содержащим нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность, содержащую VL антитела, и вторым вектором, содержащим нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность, содержащую VH антитела. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин является эукариотической клеткой, например клеткой яйчника китайского хомячка (CHO) или лимфоидной клеткой (например, клетки Y0, NS0, SP20).

В некоторых вариантах осуществления способы получения анти-KLB или анти-FGFR1с антитела могут включать культивирование клетки-хозяина, в которую была введена нуклеиновая кислота, кодирующая антитело, в условиях, подходящих для экспрессии антитела, и, необязательно, выделение антитела из клетки-хозяина и/или из среды для культивирования клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело извлекают из клетки-хозяина с помощью хроматографических способов.

Для получения рекомбинантного антитела по настоящему изобретению нуклеиновая кислота, кодирующая антитело, например, как это описано выше, может быть выделена и вставлена в один или несколько векторов для дальнейшего клонирования и/или экспрессии в клетке-хозяине. Такая нуклеиновая кислота может быть легко выделена и отсекарована с использованием общепринятых способов (например, с использованием олигонуклеотидных зондов, которые способны специфически связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи антитела).

Подходящие клетки-хозяева для клонирования или экспрессии векторов, кодирующих антитело, включают прокариотические или эукариотические клетки, представленные в настоящем описании. Например, антитела могут быть получены в бактериях, в частности, когда гликозилирование и эффектор-ные функции Fc не являются нужными. Для экспрессии фрагментов антител и полипептидов в бактериях см., например, патенты США № 5648237, 5789199 и 5840523. (См. также Charlton, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254, описывающие экспрессию фрагментов антител в *E.coli*.) После экспрессии антитело может быть выделено из клеточной бактериальной массы в растворимой фракции и может быть дополнительно очищено.

Кроме прокариот подходящими клонирующими или экспрессирующими хозяевами для кодирующих антитело векторов являются эукариотические микроорганизмы, такие как нитчатые грибы или дрожжи, в том числе грибы и штаммы дрожжей, у которых пути гликозилирования были "гуманизированы", что позволяет получать антитела с частично или полностью человеческим характером гликозилирования. См. Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004) и Li et al., *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006). Подходящие клетки-хозяева для экспрессии гликозилированного антитела могут быть также получены из многоклеточных организмов (беспозвоночных и позвоночных). Примеры клеток беспозвоночных включают клетки растений и насекомых. Было идентифицировано множество бакуловирусных штаммов, которые могут быть использованы в сочетании с клетками насекомых, в частности для трансфекции клеток *Spo-doptera frugiperda*.

Подходящие клетки-хозяева для экспрессии гликозилированного антитела также получают из многоклеточных организмов (беспозвоночных и позвоночных). Примеры клеток беспозвоночных включают клетки растений и насекомых. Было идентифицировано множество бакуловирусных штаммов, которые могут быть использованы в сочетании с клетками насекомых, в частности для трансфекции клеток *Spo-doptera frugiperda*.

В некоторых вариантах осуществления в качестве клеток-хозяев могут быть использованы культуры растительных клеток. См., например, патенты США № 5959177, 6040498, 6420548, 7125978 и 6417429 (описание технологии PLANTIBODIES™ для получения антител в трансгенных растениях).

В некоторых вариантах осуществления в качестве хозяев также могут быть использованы клетки позвоночных. Для примера, а не в качестве ограничения, могут быть использованы клеточные линии млекопитающих, которые адаптированы к росту в суспензии. Неограничивающие примеры используемых линий клеток-хозяев млекопитающих включают линии клеток почки обезьяны CV1, трансформированные SV40 (COS-7); клетки эмбриональной почки человека (293 или клетки 293, как описано, например, в Graham et al., *J. Gen Virol.*, 36:59 (1977); клетки почки детёныша хомяка (BHK); клетки Сертоли мыши (клетки TM4, как описано, например, в Mather, *Biol. Reprod.*, 23:243-251 (1980)); клетки почек обезьяны (CV1); клетки почки африканской зеленой обезьяны (VERO-76); клетки карциномы шейки матки человека (HELA); клетки почки собаки (MDCK); клетки крысы линии Buffalo (BRL 3A); клетки легких человека (W138); клетки печени человека (Hep G2); клетки опухоли молочной железы мыши (MMT 060562); клетки TRI, описанные, например, в Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982); клетки MRC5, а также клетки FS4. Другие полезные линии клеток-хозяев млекопитающих включают линии клеток яичника китайского хомячка (CHO), включая клетки DHFR CHO, см. Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); и клеточные линии миеломы, такие как Y0, NS0 и Sp2/0. Для обзора некоторых линий клеток-хозяев млекопитающих, пригодных для продуцирования антител, см., например, Yazaki and Wu, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003).

В некоторых вариантах осуществления способы получения биспецифических и/или мультиспецифических антител включают рекомбинантную коэкспрессию двух пар тяжелой цепи-легкой цепи иммуноглобулина, имеющих различные специфичности (см. Milstein and Cuello, *Nature* 305: 537 (1983), патентную заявку PCT WO 93/08829 и Traunecker др, *EMBO J.* 10: 3655 (1991)), и инженерии методом "выступ-во-впадину" (см., например, патент США № 5731168), но не ограничиваются ими. Биспецифические антитела также могут быть получены путём создания направляющих электростатических эффектов для создания Fc-гетеродимерных молекул антител (WO 2009/089004 A1); сшивания двух или более антител или их фрагментов (см., например, патент США № 4676980, и Brennan et al., *Science*, 229: 81 (1985)); с использованием лейциновой молнии для получения биспецифических антител (см., например, Kostelny

et al., J. Immunol., 148(5): 1547-1553 (1992)); с помощью технологии "диантитела" для получения фрагментов биспецифических антител (см., например, Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)); и с использованием димеров одноцепочечных Fv (sFv) (см., например, Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994)); также могут быть получены триспецифичные антитела, как это описано, например, в Tutt et al. J. Immunol. 147: 60 (1991).

Биспецифические и мультиспецифические молекулы настоящего изобретения также могут быть получены с использованием химических методов (см., например, Kranz (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:5807), с помощью технологии "полидомы" (см., например, патент США 4474893), или рекомбинантных ДНК. Биспецифические и мультиспецифические молекулы, раскрытые в настоящем описании, также могут быть получены путем конъюгации составляющих специфичности связывания, например, специфичности связывания первого эпитопа и второго эпитопа, с использованием способов, которые известны в данной области и представлены в настоящем описании. Для примера, а не в качестве ограничения, каждая специфичность связывания биспецифической и мультиспецифической молекулы может быть получена по отдельности и затем конъюгирована с другой. Если специфичность связывания опосредована белком или пептидом, то могут быть использованы разнообразные агенты для сочетания или сшивающие агенты для ковалентной конъюгации. Неограничивающие примеры сшивающих агентов включают белок А, карбодиимид, N-сукцинимидил-S-ацетил-тиоацетат (SATA), N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдигидро)пропионат (SPDP) и сульфосукцинимидил 4-(N-малеимидометил) циклогексан-1-карбоновую кислоту (сульфо-SMCC) (см., например, Karpovsky (1984) J. Exp. Med. 160:1686; Liu (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8648). Другие способы включают способы, которые описаны Paulus (Behring Ins. Mitt. (1985) No. 78, 118-132; Brennan (1985) Science 229:81-83), Glennie (1987) J. Immunol. 139: 2367-2375). Если специфичности связывания опосредованы антителами (например, двумя гуманизированными антителами), они могут быть конъюгированы через сульфгидрильную связь между С-концевыми шарнирными областями двух тяжелых цепей. В некоторых вариантах осуществления изобретения шарнирная область может быть модифицирована, чтобы содержать нечетное число сульфгидрильных остатков, например, по одному сульфгидрильному остатку, до конъюгирования.

В некоторых вариантах осуществления обе специфичности связывания биспецифического антитела могут быть закодированы в одном векторе и экспрессированы и собраны в одной клетке-хозяине. Этот способ особенно удобен в использовании, когда биспецифическая и мультиспецифическая молекула является слитым белком MAb×MAb, MAb×Fab, Fab×F(ab')₂ или лиганд×Fab. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело по настоящему изобретению может быть одноцепочечной молекулой, такой как одноцепочечное биспецифическое антитело, одноцепочечной биспецифической молекулой, содержащей одну цепь антитела и детерминанту связывания, или одноцепочечной биспецифической молекулой, содержащей две детерминанты связывания. Биспецифические и мультиспецифические молекулы могут быть также одноцепочечными молекулами или могут содержать по меньшей мере две отдельные цепи в молекуле. Способы получения би- и мультиспецифических молекул описаны, например, в патенте США № 5260203; патенте США № 5455030; патенте США № 4881175; патенте США № 5132405; патенте США № 5091513; патенте США № 5476786; патенте США № 5013653; патенте США № 5258498; и в патенте США № 5482858. Искусственно созданные антитела с тремя или более функциональными антигенсвязывающими участками (например, участками связывания эпитопа), включая антитела-"осьминоги", также включены в настоящее описание (см., например, US 2006/0025576 A1).

Настоящее изобретение также предусматривает триспецифические, например трифункциональные, антитела. Для примера, а не в качестве ограничения, триспецифическое антитело по настоящему изобретению может связываться и/или взаимодействовать с эпитопом, присутствующим на KLB, эпитопом, присутствующим на FGFR1, и эпитопом или антигеном, присутствующим на третьем белке, включая, но не ограничиваясь ими, PCSK9, GCGR, AdipoR, ZnT8, ApoL1, MSTN, InsR или FABP4.

В некоторых вариантах осуществления для получения антитела по настоящему изобретению может быть использована система, в которой применяются животные. Одна такая система, в которой для получения гибридом применяются животные, является мышинной системой. Получение гибридом в мыши является очень хорошо отработанной процедурой. Протоколы иммунизации и способы выделения иммунизированных спленоцитов для слияния известны в данной области. Партнеры для слияния (например, клетки мышинной миеломы) и процедуры слияния также известны (см., например, Harlow and Lane (1988), Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor New York).

Е. Анализы.

Антитела согласно настоящему изобретению, представленному в настоящем описании, могут быть идентифицированы, проскринированы или охарактеризованы по их физическим/химическим свойствам и/или биологической активности с помощью различных анализов, известных в данной области техники и приведенных в настоящем описании.

1) Анализы связывания и другие анализы.

В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению можно тестировать на его активность связывания антигена известными способами, такими как твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммуноанализ (RIA) или вестерн-блот-анализ. Каждый из этих анализов,

как правило, обнаруживает присутствие интересующих комплексов белок-антитело путём использования меченого реагента (например, антитела), специфичного для комплекса, представляющего интерес. Например, комплексы антитело-KLB могут быть обнаружены, например, с использованием сшитого с ферментом антитела или фрагмента антитела, которые распознают и специфически связываются с комплексом антитело-KLB. В качестве альтернативы, комплексы могут быть обнаружены с помощью любого из множества других иммунологических анализов. Например, антитело может быть радиоактивно помечено и использовано в радиоиммуноанализе (RIA) (см., например, Weintraub B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March, 1986, где документ включен посредством ссылки в настоящее описание). Радиоактивный изотоп может быть обнаружен с помощью таких средств, как счетчик Гейгера или сцинтилляционный счетчик или с помощью автордиографии.

В некоторых вариантах осуществления для идентификации антитела, которое конкурирует с антителом анти-KLB по настоящему изобретению, например 12A11 или 8C5, за связывание с KLB, могут быть использованы конкурентные анализы. В некоторых вариантах осуществления такое конкурирующее антитело связывается с тем же эпитопом (например, линейным или конформационным эпитопом), который связывает 12A11 или 8C5. Подробные примеры способов выявления эпитопа, с которым связывается антитело, представлены в Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols," in Methods in Molecular Biology vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ).

В неограничивающем примере конкурентного анализа иммобилизованный KLB можно инкубировать в растворе, содержащем первое меченое антитело, которое связывается с KLB (например, 12A11 или 8C5), и второе не меченое антитело, которое подвергается проверке на его способность конкурировать с первым антителом за связывание с KLB. Второе антитело может присутствовать в супернатанте гибридомы. В качестве контроля иммобилизованный KLB инкубируют в растворе, содержащем первое меченое антитело, но не второе не меченое антитело. После инкубации в условиях, делающих возможным связывание первого антитела с KLB, избыток несвязанного антитела удаляют и измеряют количество метки, связанной с иммобилизованным KLB. Если количество метки, соответствующей иммобилизованному KLB, существенно снижается в тестируемом образце по сравнению с контрольным образцом, то это указывает на то, что второе антитело конкурирует с первым антителом за связывание с KLB. См. Hallow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

2) Анализы активности.

Настоящее изобретение предусматривает анализы для выявления анти-KLB антител, обладающих биологической активностью. Биологическая активность может включать, например, активацию рецепторного комплекса KLB/FGFR1c. Также предусмотрены антитела, имеющие такую биологическую активность *in vivo* и/или *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения анализы могут включать связывание антител по настоящему изобретению с клетками, например клетками 293T, экспрессирующими KLB, и анализ активности и/или состояния фосфорилирования одной или нескольких последующих мишеней рецепторного комплекса KLB-FGFR1c, например ERK. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения анализ может включать введение антитела по настоящему изобретению субъекту, например, отличному от человека животному, и анализ влияния антитела на уровень глюкозы у субъекта.

Г. Иммуноконъюгаты.

В настоящем описании дополнительно предусмотрены иммуноконъюгаты, содержащие антитело, раскрытое в настоящем описании, конъюгированное с одним или несколькими цитотоксическими агентами, такими как химиотерапевтические средства или лекарственные средства, ингибирующие рост агенты, токсины (например, белковые токсины, ферментативно активные токсины бактериального, грибного, растительного или животного происхождения или их фрагменты), или радиоактивные изотопы. Например, антитело или его антигенсвязывающий участок согласно настоящему изобретению могут быть функционально связаны (например, путем химического связывания, генетического слияния, нековалентной ассоциации или иным образом) с одним или несколькими другими связывающими молекулами, такими как другое антитело, фрагмент антитела, пептид или миметик связывания.

В некоторых вариантах осуществления иммуноконъюгат представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC), в котором антитело конъюгируют с одним или несколькими лекарственными средствами, включая, но не ограничиваясь ими, мейтансиноид (см. патенты США № 5208020, 5416064 и европейский патент EP 0425235); ауристатин, такой как фрагменты монометилауристатина DE и DF (ММАЕ и ММАФ) (см. патенты США № 5635483, 5780588 и 7498298); доластатин; калихеамицин или его производные (см. патенты США № 5712374, 5714586, 5739116, 5767285, 5770701, 5770710, 5773001 и 5877296; Hinman et al., Cancer Res. 53:3336-3342 (1993); и Lode et al., Cancer Res. 58:2925-2928 (1998)); антрациклин, такой как дауномицин или доксорубин (см. Kratz et al., Current Med. Chem. 13:477-523 (2006); Jeffrey et al., Bioorganic & Med. Chem. Letters 16:358-362 (2006); Torgov et al., Bioconj. Chem. 16:717-721 (2005); Nagy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:829-834 (2000); Dubowchik et al., Bioorg. & Med. Chem. Letters 12:1529-1532 (2002); King et al., J. Med. Chem. 45:4336-4343 (2002); и патент

США 6630579); метотрексат; виндезин; таксан, такой как доцетаксел, паклитаксел, лоротаксел, тесетаксел и ортатаксел; трихотен и CC1065.

В некоторых вариантах осуществления иммуноконъюгат содержит антитело, представленное в настоящем описании, конъюгированное с ферментативно активным токсином или его фрагментом, включая, но не ограничиваясь ими, цепь А дифтерийного токсина, несвязывающиеся активные фрагменты дифтерийного токсина, цепь А экзотоксина (из синегнойной палочки), цепь А рицина, цепь А абрина, цепь модекцина, альфа-сарцин, белки *Aleurites fordii*, белки диантины, белки *Phytolacca Americana* (PAPI, PAPII и PAP-S), ингибитор из *Momordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор из *Saponaia officinalis*, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин, эномицин и трикотецены.

В некоторых вариантах осуществления иммуноконъюгат содержит антитело, представленное в настоящем описании, конъюгированное с радиоактивным атомом с образованием радиоактивного конъюгата. Множество радиоактивных изотопов доступны для получения радиоактивных конъюгатов. Неограничивающие примеры включают At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} и радиоактивные изотопы Lu. Если для обнаружения используется радиоактивный конъюгат, он может включать радиоактивный атом для сцинтиграфических исследований, например Tc^{99m} или I^{123} или спиновую метку для ядерно-магнитной резонансной томографии (NMR) (также известной как магнитно-резонансная томография, MRI), такие как йод-123, йод-131, индий-111, фтор-19, углерод-13, азот-15, кислород-17, гадолиний, марганец или железо.

Конъюгаты антитела и цитотоксического агента могут быть получены с использованием множества бифункциональных связывающих белки агентов, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP), сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), иминотиолан (IT), бифункциональные производные имидоэфиров (например, диметиладипимидат HCl), активные сложные эфиры (такие как дисукцинимидилсуберат), альдегиды (такие как глутаровый альдегид), бис-азидо-соединения (такие как бис(п-азидобензоил)гександиамин), производные бис-дiazония (такие как бис(п-дiazонийбензоил)этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуол-2,6-диизоцианат) и бис-активные фторированные соединения (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол).

Например, иммунотоксин рицина может быть получен, как описано в Vitetta et al., Science 238:1098 (1987). Меченная углеродом-14 1-изотиоцианатобензил-3-метилдиэтилентриаминопентаацетиновая кислота (MX-DTPA) является примером хелатирующего агента для конъюгации радионуклида с антителом. См. WO 94/11026. Линкер может представлять собой "расщепляемый линкер", облегчающий высвобождение цитотоксического лекарственного средства в клетке. Например, могут быть использованы кислото-чувствительный линкер, чувствительный к пептидазе линкер, фотолabile линкер, диметиловый линкер или дисульфид-содержащий линкер (Chari et al., Cancer Res. 52:127-131 (1992); патент США № 5208020).

В настоящем описании иммуноконъюгаты или ADC специально включают, но не ограничиваются конъюгатами, полученными с использованием поперечно-сшивающих реагентов, включающих, без ограничения, BMP, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, сульфо-EMCS, сульфо-GMBS, сульфо-KMUS, сульфо-MBS, сульфо-SIAB, сульфо-SMCC, а также сульфо-SMPB и SVSB (сукцинимидил-(4-винилсульфон)бензоат), которые являются коммерчески доступными (например, от Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., США).

III. Способы применения.

Описание также относится к способам применения описанных антител, например биспецифического анти-KLB/анти-FGFR1 антителас. В некоторых вариантах осуществления способы направлены на терапевтическое применение раскрытых в настоящем описании антител. В некоторых вариантах осуществления способы направлены на применение описанных антител в способах диагностики.

A. Способы диагностики и детекции.

В некоторых вариантах осуществления любое антитело, раскрытое в настоящем описании, которое имеет специфичность к KLB, например анти-KLB антитело и/или биспецифическое анти-KLB/анти-FGFR1 антитело, раскрытые выше, может быть полезно для обнаружения KLB в биологическом образце. В другом своем аспекте настоящее описание относится к способам диагностики и/или детекции заболевания с применением анти-KLB антитела или биспецифического анти-KLB/анти-FGFR1 антитела, раскрытых в настоящем описании. Термин "детекция" в настоящем описании включает количественную и/или качественную детекцию.

В некоторых неограничивающих вариантах осуществления биологический образец включает клинический образец, одну или несколько клеток, клетки в культуре, клеточные супернатанты, клеточные лизаты и образцы ткани, но не ограничивается ими. Источником образца может быть твердая ткань (например, из свежего, замороженного и/или консервированного органа, образца ткани, биоптата или аспирата) или клетки индивидуума. В некоторых вариантах осуществления биологический образец может включать одну или несколько клеток и/или ткань печени, например из печени субъекта.

В некоторых вариантах осуществления предусмотрено анти-KLB антитело для применения в способе диагностики или детекции. В еще одном аспекте предусмотрен способ детекции присутствия KLB в биологическом образце. В некоторых вариантах осуществления способ диагностики или детекции включает контактирование биологического образца с антителом, которое связывает эпитоп, присутствующий

на KLB, как раскрыто в настоящем описании, в условиях, допускающих связывание антитела с KLB, и детекцию образующегося комплекса антитела и KLB. Такой способ может представлять собой способ *in vitro* или *in vivo*, например иммунофлуоресцентный анализ или вестерн-блоттинг. В некоторых вариантах осуществления анти-KLB антитело используют для отбора субъектов, которым может быть показана терапия анти-KLB антителом, например, где KLB является биомаркером для отбора пациентов.

В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению, например биспецифическое анти-KLB/анти-FGFR1 антитело, используемое в описанных способах, не оказывает существенного влияния на печень, например на функции печени. В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению не модулирует активность рецепторного комплекса FGFR/KLB в печени по сравнению с модуляцией рецепторного комплекса FGFR/KLB в печени белком FGF21. В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению не приводит к ингибированию комплекса FGFR4/KLB и/или не приводит к повышению уровней печеночных ферментов, включая ALT, AST, ALP и GLDH, но не ограничиваясь ими. В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению не функционирует как агонист комплекса FGFR2c/KLB и/или комплекса FGFR3c/KLB в печени, что может привести к активации сигналинга MAPK и/или измененной экспрессии Spry4 и Dusp6 в печени. В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению не приводит к активации сигналинга MAPK в печени по сравнению с активацией сигналинга MAPK белком FGF21. В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению не функционирует в качестве агониста комплекса FGFR4/KLB в печени.

В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению, например биспецифическое анти-KLB/анти-FGFR1 антитело для применения в раскрытых способах включает антитела, которые не блокируют связывание и/или взаимодействие лигандов FGF, например, FGF19 и FGF21, с комплексом KLB/FGFR1c. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое анти-KLB/анти-FGFR1 антитело, раскрытое в настоящем описании, относится к антителу, которое модулирует активность комплекса KLB/FGFR1c и не блокирует взаимодействие и/или связывание нативных лигандов FGF, например FGF19 и FGF21, с комплексом KLB/FGFR1c. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое анти-KLB/анти-FGFR1 антитело, раскрытое в настоящем описании, относится к антителу, которое не блокирует активность и/или связывание нативных лигандов FGF с рецептором FGF в отсутствие KLB. Для примера, а не в качестве ограничения, биспецифическое анти-KLB/анти-FGFR1 антитело по настоящему изобретению не блокирует взаимодействие нативных лигандов FGF с комплексом FGFR1/KLA или только с FGFR1. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое анти-KLB/анти-FGFR1 антитело, раскрытое в настоящем описании, относится к антителу, которое не блокирует активность и/или связывание нативных лигандов FGF с белком KLB в отсутствие FGFR1. Для примера, а не в качестве ограничения, биспецифическое анти-KLB/анти-FGFR1 антитело по настоящему изобретению не блокирует взаимодействие нативных лигандов FGF с комплексом FGFR4/KLB, комплексом FGFR2c/KLB и/или комплексом FGFR3c/KLB.

В некоторых вариантах осуществления анти-KLB антитела, анти-FGFR1c антитела и/или биспецифические анти-KLB/анти-FGFR1 антитела, например анти-KLB/анти-FGFR1c, используемые в описанных способах, могут быть помечены. Метки включают, без ограничения, метки или фрагменты, которые детектируются непосредственно, например флуоресцентные, хромофорные, электронно-плотные, хемилюминесцентные и радиоактивные метки, а также фрагменты, такие как ферменты или лиганды, которые детектируются косвенно, например, посредством ферментативной реакции или молекулярного взаимодействия. Не ограничивающие примеры меток включают радиоизотопы ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H , и ^{131}I , флуорофоры, такие как хелаты редкоземельных металлов или флуоресцеин и его производные, родамин и его производные, дансил, умбеллиферон, люциферазы, например, люциферазу светлячка и бактериальную люциферазу (см. патент США 4737456), люциферин, 2,3-дигидрофалазиндионы, пероксидазу хрена (FIRP), щелочную фосфатазу, бета-галактозидазу, глюкоамилазу, лизоцим, оксидазы сахаров, например глюкозооксидазу, галактозооксидазу и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу, оксидазы гетероциклов, такие как уриказы и ксантиноксидаза, в сочетании с ферментом, который использует пероксид водорода для окисления предшественника красителя, такой как HRP, лактопероксидаза или микропероксидаза, биотин/авидин, спинные метки, бактериофаговые метки, стабильные свободные радикалы, а также подобные им метки.

В. Способы лечения.

В некоторых вариантах осуществления одно или несколько антител, раскрытых в настоящем описании, могут быть использованы для лечения заболевания и/или расстройства у субъекта. В качестве примера, а не ограничения, болезнь может являться нарушением обмена веществ. Неограничивающие примеры метаболических расстройств включают синдром поликистозных яичников (PCOS), метаболический синдром (MetS), ожирение, неалкогольный стеатогепатит (NASH), неалкогольную жировую болезнь печени (NAFLD), гиперлипидемию, артериальную гипертензию, диабет 2 типа, диабет не 2 типа, диабет 1 типа, латентный аутоиммунный диабет (LAD) и диабет взрослого типа у молодых (MODY). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения метаболическим нарушением является диабет 2 типа. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения метаболическим наруше-

нием является ожирение.

В некоторых вариантах осуществления одно или несколько антител, раскрытых в настоящем описании, могут быть использованы для лечения синдрома Барде-Бидля, синдрома Прадера-Вилли, синдрома Альстрёма, синдрома Коэна, наследственной остеоодистрофии Олбрайта (псевдогипопаратиреозидизм), синдрома Карпентера, синдрома МОМО, синдрома Рубинштейна-Тейби, синдрома ломкой X-хромосомы и синдрома Бёресона-Форсмана-Лемана. В некоторых вариантах осуществления одно или несколько антител, раскрытых в настоящем описании, могут быть использованы для лечения старения и связанных с ним заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и ALS.

В некоторых вариантах осуществления одно или несколько антител, раскрытых в настоящем описании, могут быть использованы для лечения болезни сердца, инсульта, сердечных приступов, гиперинсулинемии, высокого кровяного давления, заболевания коронарных сосудов сердца, мигрени или головных болей, непосредственно связанных с ожирением или черепной гипертензией, застойной сердечной недостаточности, новообразований, дислипидемии, анемии, болезни желчного пузыря, остеоартрита, дегенеративного артрита, остеохондроза, дегенеративного заболевания суставов, при замене суставов, для лечения ускоренного дегенеративного заболевания суставов, астмы, рецидивирующей пневмонии, рецидивирующего плеврита, рецидивирующего бронхита, рестриктивного легочного заболевания, гастроэзофагеального рефлюкса (ГЭРБ), избытка волос на лице и теле (гирсутизма), высыпаний, хронических кожных инфекций, избыточной потливости, частых грибковых инфекций, стрессового недержания мочи, нерегулярных менструаций, гормональных нарушений, поликистоза яичников, бесплодия, рака (например, рака молочной железы, толстой кишки и матки), апноэ во сне, идиопатической внутричерепной гипертензии, депрессии, психологической/сексуальной дисфункции, социальной дискриминации и преждевременной смерти.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает антитело для применения в способе лечения. Для примера, а не в качестве ограничения, настоящее изобретение обеспечивает антитело, например биспецифическое анти-KLB/анти-FGFR1 антитело, для применения в способе лечения субъекта, имеющего нарушение обмена веществ, например PCOS, MetS, ожирение, NASH, NAFLD, гиперлипидемию, артериальную гипертензию, диабет 2 типа, диабета не 2 типа, диабет 1 типа, латентный LAD, MODY, а также находящегося в состоянии старения и страдающего связанными с ним заболеваниями, такими как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и ALS, которое включает введение индивидууму эффективного количества антитела, раскрытого в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает антитело, например биспецифическое анти-KLB/анти-FGFR1 антитело, для применения в способе лечения субъекта, страдающего заболеванием или расстройством, описанным выше, которое включает введение индивидууму эффективного количества указанного антитела.

В некоторых вариантах осуществления способ может дополнительно включать введение субъекту эффективного количества по меньшей мере одного дополнительного терапевтического агента. Неограничивающие примеры дополнительных терапевтических агентов, например второго терапевтического агента, описаны ниже.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение дополнительно относится к способу индукции потери веса, включающему введение индивидууму эффективного количества одного или более антител, предлагаемых в настоящем изобретении, например, биспецифического анти-KLB/анти-FGFR1 антитела.

Термины "индивидуум", "пациент" или "субъект", используемые в настоящем описании взаимозаменяемо, относятся к млекопитающему. Млекопитающие включают, но не ограничиваются ими, одомашненных животных (например, коров, овец, кошек, собак, лошадей), приматов (например, людей и приматов, отличных от человека, таких как обезьяны), кроликов и грызунов (например, мышей и крыс). В некоторых вариантах осуществления индивидуум или субъект является человеком.

Настоящее описание дополнительно предусматривает антитело, например биспецифическое анти-KLB/анти-FGFR1 антитело, для применения в активации корцепторного комплекса KLB/FGFR1c, например, у субъекта. Для примера, а не в качестве ограничения, биспецифическое анти-KLB/анти-FGFR1 антитело может быть биспецифическим анти-KLB/анти-FGFR1c антителом. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает антитело, например биспецифическое анти-KLB/анти-FGFR1 антитело, для применения в способе активации корцепторного комплекса KLB/FGFR1c у субъекта. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения способ включает введение субъекту эффективного количества антитела для активации рецепторного комплекса KLB/FGFR1c.

Антитела согласно настоящему изобретению могут быть применены в терапии либо отдельно, либо в комбинации с другими агентами. Для примера, а не в качестве ограничения, антитело по настоящему изобретению может быть введено совместно, по меньшей мере с одним дополнительным терапевтическим агентом. В некоторых вариантах осуществления второй/дополнительный терапевтический агент может включать антидиабетический агент, предотвращающий ожирение агент или лекарственное средство для метаболических заболеваний, включая, но не ограничиваясь ими, антигипертензивные лекарст-

ва и статины. Не ограничивающие примеры второго/дополнительного терапевтического агента включают метформин, пиоглитазон, DPP4i, аналоги GLP1, сульфонилмочевины, инсулин, аналоги лептина и лорказерин (например, BELVIQ®).

Настоящее изобретение также относится к применению антитела, например биспецифического анти-KLB/анти-FGFR1 антитела, для производства или получения лекарственного средства. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения лекарственный препарат предназначен для лечения нарушений обмена веществ, как описано выше. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к применению антитела для производства лекарственного средства для лечения ожирения. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к применению антитела для производства лекарственного средства для лечения диабета 2 типа. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение индивидууму эффективного количества по меньшей мере одного дополнительного терапевтического агента, например, как раскрыто в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения лекарственный препарат предназначен для активации корцепторного комплекса KLB/FGFR1c. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения лекарственный препарат может быть использован в способе активации корцепторного комплекса KLB/FGFR1c у индивидуума, включающем введение индивидууму количества лекарственного средства, эффективного для активации рецепторного комплекса KLB/FGFR1c.

В некоторых вариантах осуществления антитело для применения в описанных способах лечения может присутствовать в фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция может включать фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция может включать одно или несколько антител по настоящему изобретению.

Дополнительно или альтернативно, фармацевтическая композиция может включать второй терапевтический агент. Когда одно или несколько из описанных антител вводят с другим терапевтическим агентом, одно или несколько антител и другой терапевтический агент можно вводить в любом порядке или одновременно. Такие комбинированные терапии, упомянутые выше, охватывают комбинированное введение (где два или несколько терапевтических агентов включены в одну и ту же или в отдельные лекарственные формы), а также раздельное введение, и в этом случае введение антитела по настоящему изобретению может происходить до, одновременно и/или после введения дополнительного терапевтического агента или агентов. В одном варианте осуществления время между введением антитела по настоящему изобретению и введением дополнительного терапевтического агента составляет примерно один месяц, или примерно одну, две или три недели, или примерно один, два, три, четыре, пять или шесть дней.

Антитело по настоящему изобретению (и любой дополнительный терапевтический агент) можно вводить любыми подходящими способами, включая парентеральный, внутрилегочный и назальный, и, если антитело желательно применять для местного лечения, можно использовать внутриочаговое введение. Парентеральные инфузии включают внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное или подкожное введение. Дозирование может быть осуществлено любым подходящим способом, например с помощью инъекций, таких как внутривенные или подкожные инъекции, что частично зависит от того, является ли введение кратковременным или хроническим. В настоящем описании предусмотрены различные схемы дозирования, включая, без ограничения, одно или несколько введений в различных временных точках, болюсное введение и импульсную инфузию.

Антитела согласно настоящему изобретению будут введены в фармацевтическую композицию, дозированы и введены в соответствии с хорошей медицинской практикой. Факторы, подлежащие рассмотрению в этом контексте, включают конкретное расстройство, которое подлежит лечению, конкретное млекопитающее, которое подвергается лечению, клиническое состояние отдельного пациента, причину расстройства, место доставки агента, способ введения, схему введения и другие факторы, известные практикующим врачам. Антитело необязательно может быть введено в фармацевтическую композицию с одним или несколькими агентами, используемыми в настоящее время для предотвращения или лечения рассматриваемого расстройства. Эффективное количество таких других агентов зависит от количества антитела, присутствующего в лекарственной форме, типа расстройства или лечения и других факторов, описанных выше. Другие агенты, как правило, используют в тех же дозах и вводят теми же путями, как раскрыто в настоящем описании, или в дозах, составляющих приблизительно от 1 до 99% от доз, раскрытых в настоящем описании, или в любой дозировке и любым способом, которые были эмпирически/клинически определены как подходящие.

Для профилактики или лечения заболевания соответствующая дозировка антитела по настоящему изобретению (при применении отдельно или в комбинации с одним или несколькими другими дополнительными терапевтическими агентами) будет зависеть от типа заболевания, подлежащего лечению, типа антител, тяжести и течения заболевания, от того, вводят антитело в профилактических или терапевтических целях, от предшествующей терапии, истории болезни пациента и реакции на антитело, а также мнения лечащего врача. В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению можно вводить по мере необходимости. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело может быть введено пациенту один раз или несколько раз. В качестве примера, но не в качестве ограничения

антитело и/или фармацевтическая лекарственная форма, которая содержит антитело, раскрытое в настоящем описании, можно вводить субъекту два раза в день, один раз в день, один раз в два дня, один раз в три дня, один раз в четыре дня, один раз в пять дней, один раз в шесть дней, один раз в неделю, раз в две недели, один раз в три недели, один раз в месяц, раз в два месяца, один раз в три месяца, раз в полгода или раз в год.

В некоторых вариантах осуществления в зависимости от типа и тяжести заболевания начальная предполагаемая доза для введения пациенту, например, с помощью одного или нескольких отдельных введений или путем непрерывной инфузии может составлять примерно от 1 мкг/кг до 15 мг/кг антитела (например, 0,1-10 мг/кг). Одна типичная суточная доза может варьировать от приблизительно 1 мкг/кг до 100 мг/кг или более в зависимости от указанных выше факторов. В некоторых вариантах осуществления изобретения, суточная доза может быть больше, чем примерно 100 мг/кг.

В некоторых вариантах осуществления доза может быть отрегулирована для достижения концентрации антитела в плазме 1-1000 мкг/мл и в некоторых способах для достижения концентрации 25-300 мкг/мл.

В случае повторного введения в течение нескольких дней или более в зависимости от состояния лечение обычно может быть продолжено до желаемого подавления симптомов заболевания. Пример одной дозы антитела будет находиться в диапазоне от приблизительно 0,05 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления пациенту могут быть введены одна или несколько доз, составляющих приблизительно 0,5, 2,0, 4,0 или 10 мг/кг (или любой их комбинации). В качестве альтернативы, антитело можно вводить в виде лекарственной формы с замедленным высвобождением, которую требуется вводить реже. Дозировка и частота может изменяться в зависимости от времени полувыведения антитела в организме пациента. В некоторых вариантах осуществления такие дозы можно вводить периодически, например каждую неделю или один раз в три недели (например, таким образом, что пациент получает от двух до двадцати, или, например, приблизительно шесть доз антитела). Может быть введена начальная более высокая нагрузочная доза, за которой следует одна или несколько более низких доз.

В некоторых вариантах осуществления способ может дополнительно включать мониторинг субъекта и определение эффективности лечения. Например, ход терапии можно легко контролировать с помощью традиционных способов и анализов.

IV. Фармацевтические лекарственные формы.

В настоящем описании дополнительно предусмотрены фармацевтические лекарственные формы, содержащие одно или несколько антител, как раскрыто в настоящем описании, с фармацевтически приемлемым носителем. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции могут включать комбинацию нескольких (например, двух или более) антител и/или их антигенсвязывающих частей, раскрытых в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может включать одно или несколько биспецифических антител анти-KLB/анти-FGFR1.

В некоторых вариантах осуществления раскрытые фармацевтические лекарственные формы могут быть получены путем объединения антитела, имеющего желаемую степень чистоты, с одним или несколькими необязательными фармацевтически приемлемыми носителями (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), в форме лиофилизированных лекарственных форм или водных растворов. В качестве примера, но не в качестве ограничения, лиофилизированные лекарственные формы антител описаны в патенте США № 6267958. В некоторых вариантах осуществления водные лекарственные формы антител могут включать лекарственные формы, которые описаны в патенте США № 6171586 и WO 2006/044908, где последние лекарственные формы включают гистидин-ацетатный буфер. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело может иметь чистоту более чем примерно 80%, более чем примерно 90%, более чем примерно 91%, более чем примерно 92%, более чем примерно 93%, более чем примерно 94%, более чем примерно 95%, более чем примерно 96%, более чем примерно 97%, более чем примерно 98%, более чем примерно 99% более чем примерно 99,1%, более чем примерно 99,2%, более чем примерно 99,3%, более чем примерно 99,4% более чем примерно 99,5%, более чем примерно 99,6%, более чем примерно 99,7%, более чем примерно 99,8% или более чем примерно 99,9%.

Фармацевтически приемлемые носители, как правило, являются нетоксичными для реципиентов в используемых дозах и концентрациях и включают, без ограничения, буферы, такие как фосфатный, цитратный буфер и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония; хлорид бензетония; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол и м-крезол); низкомолекулярные (приблизительно менее 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как EDTA; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, Zn-белковые комплексы); и/или неионные поверхностно-активные вещества.

ва, такие как полиэтиленгликоль (PEG). Примеры фармацевтически приемлемых носителей в настоящем описании дополнительно включают агенты для диспергирования лекарственных средств в интерстициальной ткани, такие как растворимые активные в нейтральной среде гликопротеины гиалуронидазы (sHASEGP), например, растворимые гликопротеины гиалуронидазы PH-20 человека, такие как gHuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.). Некоторые примеры sHASEGP и способы их применения, включая gHuPH20, описаны в опубликованных патентных заявках США № 2005/0260186 и 2006/0104968. В одном из аспектов sHASEGP объединяют с одним или несколькими дополнительными гликозаминогликанами, такими как хондроитиназы.

Носитель может быть пригоден для внутривенного, внутримышечного, подкожного, парентерального, спинального или эпидермального введения (например, путем инъекции или инфузии). В зависимости от способа введения активное соединение, т.е. биспецифическое анти-KLB/анти-FGFR1 антитело, может быть покрыто материалом для защиты соединения от действия кислот и других естественных условий, которые могут инактивировать соединение.

Фармацевтические композиции по изобретению также можно вводить в комбинированной терапии, т.е. в сочетании с другими агентами. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, раскрытые в настоящем описании, могут также содержать более чем один активный ингредиент, если это необходимо для конкретного назначения, подлежащего лечению, например, ингредиенты с комплементарной активностью, которые не оказывают отрицательного влияния друг на друга. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения фармацевтическая лекарственная форма может включать второй активный ингредиент для лечения того же заболевания, для которого используется первый терапевтический агент. Такие активные ингредиенты предпочтительно присутствуют в комбинации в количествах, которые эффективны для предназначенной цели. Для примера, а не в качестве ограничения, лекарственная форма по настоящему изобретению может также содержать более чем один активный ингредиент, если это необходимо для конкретного назначения, подлежащего лечению, предпочтительно активные ингредиенты с комплементарной активностью, которые не оказывают отрицательного влияния друг на друга. Например, может быть желательно дополнительно обеспечить второй терапевтический агент, полезный для лечения того же заболевания. Такие активные ингредиенты предпочтительно присутствуют в комбинации в количествах, которые эффективны для предназначенной цели.

Композиция по настоящему изобретению может быть введена различными способами, известными в данной области техники. Путь и/или способ введения изменяются в зависимости от желаемых результатов. Активные соединения могут быть объединены с носителями, которые защищают соединение от быстрого высвобождения, например, в виде лекарственных форм с контролируемым высвобождением, включая имплантаты, трансдермальные пластыри и микроинкапсулированные системы доставки. Могут быть использованы биоразлагаемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфир и полимолочная кислота. Множество способов получения таких лекарственных форм описано, например, в Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции изготовлены в соответствии со стандартом Надлежащей производственной практики (GMP) Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов.

Могут быть получены препараты с замедленным высвобождением, содержащие антитело, раскрытое в настоящем описании. Подходящие примеры препаратов с замедленным высвобождением включают полупроницаемые матрицы из твердых гидрофобных полимеров, содержащие антитело, где матрицы находятся в виде формованных изделий, например пленок или микрокапсул. В некоторых вариантах осуществления активные ингредиенты могут быть заключены в микрокапсулы, полученные, например, способами коацервации или путем межфазной полимеризации, например, в гидроксиметилцеллюлозные или желатиновые микрокапсулы и поли(метилметакрилат)ные микрокапсулы, соответственно, в коллоидные системы доставки лекарственных средств (например, липосомы, микросферы альбумина, микроэмульсии, наночастицы и микрокапсулы) или в макроэмульсии. Такие способы описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).

Для введения антитела по настоящему изобретению с помощью определенных способов введения может быть необходимо покрыть соединение материалом для предотвращения его инактивации или ввести соединение совместно с материалом для предотвращения его инактивации. Например, соединение может быть введено субъекту в соответствующем носителе, например, в липосомах или в разбавителе. Фармацевтически приемлемые разбавители включают физиологический раствор и водные буферные растворы. Липосомы включают эмульсии вода-в-масле-в-воде CGF, а также обычные липосомы (Strejan et al., (1984) J. Neuroimmunol., 7:27).

Фармацевтически приемлемые носители включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для экстенпорального получения стерильных инъекционных растворов или дисперсий. Использование таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ известно в данной области. За исключением тех случаев, когда обычная среда или агент несовместимы с активным соединением, предусмотрено их применение в фармацевтических композициях по настоящему изобретению. В

композиции также могут быть включены дополнительные активные соединения.

Терапевтические композиции, как правило, должны быть стерильными, по существу, изотоническими и стабильными в условиях производства и хранения. Композиция может быть получена в виде раствора, микроэмульсии, липосомы или другой упорядоченной структуры, подходящей для высокой концентрации лекарственного средства. Носитель может быть растворителем или дисперсионной средой, содержащей, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.п.) и их подходящие смеси. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, за счет использования покрытия, такого как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и за счет использования поверхностно-активных веществ. Во многих случаях в композицию предпочтительно включать изотонические агенты, например сахара, многоатомные спирты, такие как маннит, сорбит, или хлорид натрия. Пролонгированная абсорбция инъекционных композиций может быть достигнута путем включения в композицию агента, который задерживает абсорбцию, например, солей моностеарата и желатина.

Стерильные инъекционные растворы могут быть получены путем включения одного или нескольких предусмотренных антител в необходимом количестве в соответствующий растворитель с добавлением, в случае необходимости, одного или комбинации ингредиентов, перечисленных выше, с последующей стерилизацией путём микрофльтрации, например путем фльтрации через стерильные фильтрующие мембраны. Как правило, дисперсии получают путем введения активного соединения в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и требуемые другие ингредиенты из тех, которые перечислены выше. В случае стерильных порошков для получения стерильных инъекционных растворов предпочтительными способами получения являются вакуумная сушка и сублимационная сушка (лиофилизация), которые обеспечивают получение порошка активного ингредиента с любым дополнительным желательным ингредиентом из предварительно стерилизованного фильтрованием раствора.

Терапевтические композиции могут быть также введены с использованием медицинских устройств, известных в данной области. Например, терапевтическую композицию по настоящему изобретению можно вводить с помощью безыгольного инъекционного устройства для подкожных инъекций, такого как устройство, описанное, например, в патентах США № 5399163, 5383851, 5312335, 5064413, 4941880, 4790824 или 4596556. Примеры имплантатов и модулей, используемых в настоящем изобретении, включают устройства, описанные в патенте США № 4487603, который раскрывает имплантируемый микроинфузионный насос для дозирования препарата с контролируемой скоростью; патенте США № 4486194, в котором описано терапевтическое устройство для введения препаратов через кожу; патенте США № 4447233, в котором представлен инфузионный насос для доставки препарата с точной скоростью инфузии; патенте США № 4447224, в котором описано имплантируемое инфузионное устройство с переменным потоком для непрерывной доставки лекарственного средства; патенте США № 4439196, в котором описана многокамерная осмотическая система доставки лекарственного средства; и в патенте США № 4475196, в котором описана осмотическая система доставки лекарственного средства. Известны многие другие подобные имплантаты, системы доставки и модули.

Для терапевтических композиций лекарственные формы по настоящему изобретению включают такие лекарственные формы, которые пригодны для перорального, назального, местного (в том числе трансбуккального и подязычного), ректального, вагинального и/или парентерального введения. Лекарственные формы могут быть удобно представлены в виде стандартной лекарственной формы и могут быть получены любыми способами, известными в области фармации. Количество антитела, которое может быть объединено с материалом-носителем для получения лекарственной формы для однократного введения, варьирует в зависимости от субъекта, подлежащего лечению, и конкретного способа введения. Количество антитела, которое может быть объединено с материалом-носителем для получения лекарственной формы для однократного введения, как правило, представляет собой количество композиции, которое дает терапевтический эффект. Как правило, из 100%, это количество составляет от примерно 0,01% до примерно 99% активного ингредиента, от примерно 0,1 % до примерно 70% или от примерно 1% до примерно 30% активного ингредиента.

Лекарственные формы для местного или трансдермального введения композиций по настоящему изобретению включают порошки, спреи, мази, пасты, кремы, лосьоны, гели, растворы, пластыри и ингаляторы. Активное соединение может быть смешано в стерильных условиях с фармацевтически приемлемым носителем, и, необязательно, с любыми требуемыми консервантами, буферами или пропеллентами.

Фразы "парентеральное введение" и "введенный парентерально" означают способы введения, отличные от энтерального и местного введения, обычно путем инъекции, и включают внутривенные, внутримышечные, внутриартериальные, интратекальные, внутрикапсульные, интраорбитальные, внутрисердечные, внутрикожные, внутрибрюшинные, транстрахеальные, подкожные, подэпидермисные, внутрисуставные, субкапсулярные, субарахноидальные, интраспинальные, эпидуральные и надчревные инъекции и инфузии, не ограничиваются ими.

Эти фармацевтические композиции могут также содержать адъюванты, такие как консерванты, смачивающие агенты, эмульгаторы и диспергирующие агенты. Предотвращение присутствия микроорганизмов может быть обеспечено как за счет процедур стерилизации, описанных выше, так и включени-

ем различных антибактериальных и противогрибковых агентов, например парабен, хлорбутанола, фенола, сорбиновой кислоты и подобных им агентов. Кроме того, может быть желательно включать в композиции изотонические агенты, такие как сахара, хлорид натрия и подобные вещества. Кроме того, пролонгированная абсорбция инъекционной фармацевтической формы может быть достигнута включением агентов, которые задерживают абсорбцию, таких как моностеарат алюминия и желатин.

В некоторых вариантах осуществления, когда антитела по настоящему изобретению вводят в виде фармацевтических препаратов человеку и животным, они могут быть введены отдельно или в виде фармацевтической композиции, содержащей, например, от примерно 0,01% до примерно 99,5% (или от примерно 0,1 до примерно 90%) антитела, раскрытого в настоящем описании, в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем.

V. Изделия.

Настоящее описание дополнительно относится к изделиям, содержащим материалы, пригодные для лечения, профилактики и/или диагностики расстройств, описанных выше.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения изделие включает контейнер и этикетку или вкладыш, закрепленные на контейнере или связанные с контейнером. Неограничивающие примеры подходящих контейнеров включают бутылки, флаконы, шприцы, мешки для вводимых внутривенно растворов и т.п. Контейнеры могут быть изготовлены из различных материалов, таких как стекло или пластик. Контейнер может содержать композицию, которая сама по себе или в сочетании с другой композицией является эффективной для лечения, профилактики и/или диагностики состояния, и может иметь стерильное входное отверстие (например, контейнер может представлять собой пакет для внутривенного раствора или флакон, имеющий поддающуюся прокалыванию иглой для подкожных инъекций пробку).

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один активный агент в композиции представляет собой антитело, раскрытое в настоящем описании. На этикетке или вкладыше в упаковку может быть указано, что композицию используют для лечения определённого состояния.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения изделие может содержать (а) первый контейнер с содержащейся в нём композицией, где композиция содержит антитело по настоящему изобретению; и (б) второй контейнер с содержащейся в нём композицией, где композиция содержит дополнительный цитотоксический или иной терапевтический агент. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения изделие может дополнительно содержать вкладыш в упаковку, указывающий, что эти композиции могут быть использованы для лечения конкретного состояния.

В качестве альтернативы или дополнительно, изделие может дополнительно включать дополнительный контейнер, например второй или третий контейнер, включающий фармацевтически приемлемый буфер, такой как бактериостатическую воду для инъекций (BWI), забуференный фосфатом физиологический раствор, раствор Рингера и раствор декстрозы, но не ограничиваясь ими. Изделие может включать другие материалы, желательные с коммерческой и потребительской точки зрения, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы и шприцы.

Приведенные ниже примеры лишь иллюстрируют настоящее описание и не должны рассматриваться в качестве какого-либо ограничения.

Примеры

Пример 1. Характеристика агонистических анти-FGFR1 антител.

Три полученных методом фагового дисплея анти-FGFR1 антитела, YW182.2 (также называемое в настоящем описании "R1MAb1"), YW182.3 (также называемое в настоящем описании "R1MAb2") и YW182.5 (также называемое в настоящем описании "R1MAb3") были описаны ранее (WO 2012/158704, включена в настоящее описание посредством ссылки). Каждое из трех антител действует как мощный FGFR1-селективный агонист и проявляет инсулин-сенситизирующие свойства у мышей.

Для более глубокого понимания этой агонистической активности была проверена способность фрагментов Fab этих антител действовать в качестве агониста FGFR1c. Клетки HEK293 культивировали в модифицированной по методу Дульбекко среде Игла (DMEM) + 10% фетальной телячьей сыворотки (FBS) и временно трансфицировали экспрессионными векторами, кодирующими люциферазу Renilla (pRL-SV40, Promega), FGFR1c, транскрипционный активатор (pFA2-E1k1 или pFA2-CREB, Stratagene) и репортерную люциферазу светлячка под контролем сайтов связывания GAL4 (pFR-Luc, Stratagene), используя трансфекционный реагент FUGENE® FID (Roche). На следующий день трансфицированные клетки культивировали в течение еще 6-8 ч в бессывороточной среде и на них тестировали IgG и каждое из YW182.2, YW182.3 и YW182.5 при возрастающих концентрациях. Активность люциферазы в клетках определяли с использованием системы люциферазного анализа DUAL-GLO® (Promega) и сканера ENVISION® MultiLabel (PerkinElmer). Активность люциферазы светлячка нормализовали по активности ко-экспрессируемой люциферазы Renilla. Неожиданно оказалось, что YW182.2 Fab, но не YW182.3 Fab или YW182.5 Fab, проявил агонистическую активность (фиг. 1A).

Фиг. 1B представляет эксперименты по конкурентному связыванию, которые были выполнены для изучения причин различий в активации FGFR1 под действием YW182.2 Fab и YW182.3 Fab. YW182.2

дополнительно характеризовали по сравнению с YW182.3, который имеет высокую аффинность, а также по сравнению с более низкоаффинным анти-FGFR1 антителом, YW182.5. Оба антитела YW182.2 и YW182.3 конкурировали с YW182.5 за связывание с внеклеточным доменом FGFR1 (ECD), и это говорит о том, что все 3 антитела распознают перекрывающиеся области FGFR1. Тем не менее, как показано на фиг. 1B, относительная аффинность YW182.5 была значительно ниже ($IC_{50} > 30$ раз), чем у YW182.2 и YW182.3.

Фиг. 2A показывает аффинности связывания анти-FGFR1 антител, YW182.2 и YW182.3, с FGFR1b и FGFR1c. Аффинность анти-FGFR1 антител оценивали для определения того, объясняют ли различия в аффинности анти-FGFR1 антител различия, наблюдаемые для их агонистической активности. Анализ аффинности связывания Fab с FGFR1b или FGFR1c проводили с использованием прибора BIAcore® T100, как описано в Liang и др. *J. Mol. Biol.* 366(3): 815-29 (2007), со следующими изменениями. Мышиное антитело к человеческому антителу Fc было нанесено первым на карбоксиметилированный декстрановый чип CM5 BIAcore с использованием процедуры непосредственного связывания со свободными аминокислотными группами, описанной производителем. YW182.2 или YW182.3 были захвачены на чипе CM5 биосенсора до достижения приблизительно 200 единиц отклика (RU). Измерения связывания проводили с использованием рабочего буфера, состоящего из 10 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,005% поверхностно-активного вещества P20 (HBS-P-буфера). Серии 2-кратных разведений белка FGFR1c ECD-His вводили в диапазоне концентраций 1,5-50 нМ в HBS-P-буфере при скорости потока 30 мкл/мин при 25°C. Скорости ассоциации (K_{on} , моль/с) и скорости диссоциации (K_{off} , с) были рассчитаны с использованием простой модели связывания Ленгмюра один к одному (BIAcore® Evaluation Software version 3.2). Равновесную константу диссоциации (K_d , моль) рассчитывали как отношение K_{off}/K_{on} . Как показано на фиг. 2A, наблюдаемые аффинности YW182.2 и YW182.3 были очень похожими, что свидетельствует о том, что аффинность не может объяснить разницу в агонистической активности двух антител.

Фиг. 2B показывает способность YW182.5 (R1MAb3) специфически взаимодействовать с FGFR1. Как и YW182.2 и YW182.3, YW182.5 показало специфическое связывание с FGFR1 в анализе ELISA (фиг. 2B).

Фиг. 2C показывает агонистическую активность YW182.5 для различных FGFR в клетках L6 в люциферазном анализе с использованием GAL-ELK1 (ETS-подобный фактор транскрипции 1). Для проведения люциферазного анализа клетки HEK293T или крысы L6 трансфицировали экспрессионными векторами, кодирующими соответствующие рецепторы под контролем CMV-промотора, люциферазу Renilla (PRL-SV40, Promega), слитый белок транскрипционного активатора GAL-ELK1 (pFA2-ELK1, компании Agilent) и репортерную люциферазу светлячка под контролем сайтов связывания GAL4 (PFR-Luc, Agilent), с использованием трансфекционного реагента FuGene HD (Promega). На следующий день трансфицированные клетки культивировали в течение еще 6-8 ч в бессывороточной среде DMEM, содержащей соответствующие белковые лиганды в различных концентрациях. Активность люциферазы в клетках определяли с использованием системы люциферазного анализа Dual-Glo (Promega) и сканера Envision MultiLabel (PerkinElmer). Активность люциферазы светлячка нормализована к активности совместно экспрессируемой люциферазы Renilla, и показана как среднее значение $\pm$ SEM. Подобно YW182.2 и YW182.3, YW182.5 выступал в качестве специфического агониста для FGFR1 в клетках L6 (фиг. 2C).

Агонистическая активность YW182.5 дополнительно протестирована в клетках HEK293 с помощью люциферазного анализа GAL-ELK1, описанного выше. Как показано на фиг. 2D, YW182.5 также выступал в качестве специфического агониста для FGFR1c в люциферазном анализе GAL-ELK1 в клетках HEK293.

Фиг. 2E показывает влияние YW182.5 на уровень глюкозы в крови в модели диабета на мышах. Для определения уровня глюкозы в крови мыши были приобретены у Jackson Laboratory и содержались в стерильном виварии при температуре 21°C по стандарту 12 ч свет/12 ч темноты с доступом к пище (LAB-DIET® 5010) и воде в неограниченном количестве. Мыши db/db линии C57BLKS/J были самками, а другие мыши были самцами. Для кормления согласно диете с высоким содержанием жиров была использована диета с высоким содержанием жиров и высоким содержанием углеводов (Harlan Teklad TD.03584, 58,4% калорий из жира). Уровни неорганического фосфора и кальция в сыворотке определяли с помощью биохимического анализатора COBAS INTEGRA® 400 (Roche). Уровни FGF23 в сыворотке определяли с помощью ELISA (Immutopics). Уровни глюкозы в крови определяли с помощью глюкометра CONTOUR® (Bayer). Для анализа липидов в печени использовали набор для количественного определения триглицеридов (MBL International). Общие холестерин, триглицериды, β -гидроксибутират (Termo DMA) и свободные жирные кислоты (Roche) в сыворотке определяли с помощью колориметрического анализа. Для определения уровней сывороточного инсулина (Crystal Chem), сывороточного FGF23 (Immutopics), сывороточного высокомолекулярного мышинового адипонектина (Alpco) и сывороточного высокомолекулярного адипонектина обезьян (R&D Systems) использовали ELISA. Кортикостерон измеряли с помощью радиоиммуноанализа (Vanderbilt Hormone Assay & Analytical Services Core). Все мыши, используемые для инъекций, имели возраст около 2-4 месяцев, за исключением KLB-дефицитных мышей, которые бы-

ли использованы в некоторых опытах в возрасте 7-8 месяцев. Подобно введению YW182.2 и YW182.3, введение YW182.5 нормализует уровень глюкозы в крови у диабетических мышей db/db (фиг. 2D).

Пример 2. Картирование эпитопов анти-FGFR1 антител.

ECD FGFR1 состоит из трех Ig-подобных доменов, называемых D1-D3. Как показано на фиг. 1C, два непересекающихся пептида P26: KLHAVPAAKTVKFKCP (SEQ ID NO: 143) и P28: FKPDHRIG-GYKVRVY (SEQ ID NO: 144), присутствующих в домене D2 FGFR1, были предварительно идентифицированы как связывающиеся с двумя антителами YW182.2 и YW182.3 (WO 2012/158704, включена в настоящее описание посредством ссылки).

Чтобы определить, какие остатки в этих пептидах являются наиболее важными для связывания антитела, в клетках HEK293 экспрессировали полноразмерные белки FGFR1 с различными заменами на аланин в пределах определенных областей эпитопов и тестировали их на связывания антител с помощью Вестерн-блоттинга. Как показано на фиг. 1D, замены на аланин в K175, K177, Y205, R208 предотвращали связывание YW182.2 и YW182.5, не влияя на экспрессию, что показано с помощью зондирования с использованием анти-FGFR1 к домену D1 (анти-D1). Связывание YW182.3 было предотвращено при замене R208A, но не при заменах K175, K177 или Y205.

Способность антител активировать мутантные FGFR1 с заменами на аланин *in vivo* тестировали с помощью анализа GAL-ELK1, описанного выше. Было установлено, что для каждого из анти-FGFR1 антител активация хорошо коррелирует со свойствами связывания этих мутантов (фиг. 1E). Эти результаты свидетельствуют о том, что для связывания YW182.2 и YW182.5 несмотря на различную аффинность связывания необходим сходный набор аминокислот в домене D2, в то время как для связывания YW182.3 имеет большое значение другой набор аминокислот в той же области.

Кристаллические структуры 2:2 комплекса FGFR ECD/FGF были описаны ранее (Plotnikov et al. Cell 98(5): 641-50 (1999)). В гомодимерных структурах 2:2 FGFR1c ECD/FGF2 один домен D2 взаимодействует с другим доменом D2, и каждый FGF2 связывается с двумя доменами D2 с двух сторон, чтобы стабилизировать димер D2 (фиг. 1F). В этих структурах важные для связывания YW182.2 и YW182.5 замены на аланин (K175, K177, Y205 и R208) расположены внутри димера D2. Так как YW182.2 Fab действует в качестве агониста, то предполагается, что YW182.2 Fab может связываться с двумя доменами D2 одновременно для стабилизации димера D2 и, по существу, действует как молекулярный миметик лигандов FGF. На основе анализа замен на аланин можно заключить, что YW182.5 Fab может связываться аналогичным образом за исключением того, что его аффинность значительно ниже, чем у YW182.2 Fab.

Пример 3. Выделение и характеристика анти-KLB антител.

Мыши BALB/C были иммунизированы HEK293, стабильно экспрессирующими белки hFGFR1c и hKLB. Селезенки собирали через 12 недель и получали гибридомы. Гибридомы, продуцирующие антитела анти-hKLB, были идентифицированы с помощью анализа FACS с использованием клеток HEK293, используемых для иммунизации. В общем, клетки 293, экспрессирующие один hKLB, один hFGFR1 или оба белка, окрашивали разведенным супернатантом гибридомы и PE-конъюгированными козьими антителами против мышиного антитела IgG (Jackson Labs) в буфере FACS (0,5% BSA в PBS). Тот же самый буфер FACS использовали для промывки окрашенных клеток. Окрашенные клетки анализировали с помощью FACScan (Becton Dickinson) и программного обеспечения для анализа FlowJo FACS (Tree Star). кДНК, кодирующую тяжелую цепь и легкую цепь IgG, клонировали в экспрессионные векторы. Все рекомбинантные молекулы моноклонального антитела получали из временно трансфицированных клеток яичника китайского хомячка (CHO) и очищали с использованием обычной колоночной хроматографии.

Было выявлено около 20 различных гибридом, продуцирующих анти-KLB антитела. Последовательности CDR легкой цепи и тяжелой цепи для 16 из этих анти-KLB антител приведены в табл. 2 и 3. Последовательности легкой цепи этих 16 анти-KLB антител, а также 8C5 показаны на фиг. 3A (11F1, 6D12, 11D4, 8E1, 46C3, 8H7, 21H3, 25F7, 14E6, 14C6, 24A1, 5F8, 6C1, 12A1, 12B8, 14C10 и 8C5; SEQ ID NO: 111-127 соответственно).

Последовательности тяжелой цепи этих 16 анти-KLB антител, а также 8C5 показаны на фиг. 3B (11F1, 6D12, 11D4, 8E1, 46C3, 8H7, 21H3, 25F7, 14E6, 14C6, 24A1, 5F8, 6C1, 12A1, 12B8, 14C10 и 8C5; SEQ ID NO: 94-110 соответственно).

Таблица 2. Последовательности CDR H мышинных моноклональных анти-KLB антител

Антитело	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)
46C3	DTYIH (SEQ ID NO: 5)	RIDPANGNTKYDPKFQD (SEQ ID NO: 20)	GTSYSWFAY (SEQ ID NO: 36)
8H7	SYWIH (SEQ ID NO: 6)	EIDPSVSNSNYNQKFKG (SEQ ID NO: 21)	LGVMVYGSSPFWFAY (SEQ ID NO: 37)
21H3	SYWIH (SEQ ID NO: 6)	EIDPSVSNSNYNQKFKG (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)	GGYHYPGWLVY (SEQ ID NO: 43)
12A11	RYWMS (SEQ ID NO: 12)	EISPDSSSTINYTPSLKD (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)	HIWWDDDKRYNPALKS (SEQ ID NO: 30)	IDGIYDGSFYAMDY (SEQ ID NO: 46)
8C5	TYGVH (SEQ ID NO: 15)	VIWSGGSTDYNAAFIS (SEQ ID NO: 31)	DYGSTYVDAIDY (SEQ ID NO: 47)

Таблица 3. Последовательности CDR L мышиных моноклональных анти-KLB антител

Антитело	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	KASDHINNWLA (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	KASDHINNWLA (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	SASSSLSSSYLY (SEQ ID NO: 55)	GASNLAS (SEQ ID NO: 71)	HQWSSYPLT (SEQ ID NO: 86)
24A1	KSSQSLNSGNQKNSLA (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	RASQSISDYVY (SEQ ID NO: 59)	YASQSIG (SEQ ID NO: 75)	QNGHNFPLYT (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)

Большинство полученных из гибридом анти-KLB антител вместе с одним антителом, полученным с помощью фагового дисплея (обозначено Ph # 5, которое было получено с помощью фагового дисплея с использованием рекомбинантного белка hKLB-ECD-HIS (R&D Systems)), были ранжированы на основе медианы сдвига, который наблюдали на диаграмме FACS при измерении связывания 0,8 мкг/мл антител с клетками 293, экспрессирующими hKLB (фиг. 4).

Кроме того, некоторые антитела были ранжированы по ELISA. Для этих экспериментов анти-KLB антитела, являющиеся химерными рекомбинантными IgG с мышиными вариабельными областями и константными областями hIgG1, были использованы для измерения связывания белка hKLB-ECD-His. Относительное связывание всех тестируемых антител за исключением 14E6 были схожим, 14E6 проявило более сильное связывание в условиях ELISA, чем при анализе FACS (фиг. 5).

Пример 4. Связывание KLB с анти-KLB антителами.

Для тестирования конкуренции связывания между различными анти-KLB антителами использовали ELISA. В некоторых экспериментах антитела IgG, очищенные из супернатантов гибридомы, соответствующих 6D12, 8C5 и 11F1, биотинилировали с использованием набора для биотинилирования NHS-PEO

Solid Phase (Pierce). Связывание с белком KLB-ECD-His тестировали с использованием конъюгированного с пероксидазой хрена стрептавидина в присутствии различных концентраций анти-KLB, полученных из гибридом. В некоторых экспериментах связывание рекомбинантного человеческого IgG с белком KLB-ECD-His тестировали с использованием конъюгированного с пероксидазой хрена антитела против человеческого IgG (Jackson ImmunoResearch Inc.) в присутствии различных концентраций анти-KLB, полученных из гибридом. Было отмечено, что ни одно из антител 11F1, 11D4, 8E1 и 46C3 не конкурирует с 6D12 за связывание (другие белки не были испытаны против 6D12). Анти-KLB антитела 14E6 и 12A11 конкурируют за связывание с 8C5, но не с 11D4 и 14C10 (другие не испытывали против 8C5), и 11D4 конкурирует за связывание с 11F1, но не с 6D12, 8E1 и 46C3 (другие не были испытаны против 11F1).

Пример 5. Межвидовая кросс-реактивность анти-KLB антител.

Видовую кросс-реактивность раскрытых анти-KLB антител анализировали с помощью анализа FACS с использованием кДНК KLB из мыши, крысы, кролика, яванского макака и макака-резусов, клонированной в экспрессионные векторы млекопитающих pRK, которые временно трансфицировали в клетки HEK293T. Экспрессируемые последовательности внеклеточного домена полипептида KLB были следующими.

Мышь

FSGDGKAIWDKKQYVSPVNPSQLFLYDTFPPKNFSWGVGTGAFQVEGSWKTDG
RGPSIWDRIYVYSHLRGVNGTDRSTDSYIFLEKDLLALDFLGVSFYQFSISWPRLFPNGT
VAAVNAQGLRYYRALLDSLVLNIEPIVTLYHWDLPPLTLQEEYGGWKATMIDLFND
YATYCFQTFGDRVKYWITHNPYLVAWHGFGTGMHAPGEKGNLTAVYTVGHNLKA
HSKVWHNYDKNFRPHQKGWLSITLGSHWIEPNRTDNMEDVINCQHSMSVVGWFAN
PIHGDGDYPEFMKTGAMIEFSEAEKEEVGTADFFAFSFGPNNFRPSNTVVKMGQNV
SLNLRQVLNWKLEYDDPQLISENGWFTDSYIKTEDTTAIYMMKNFLNQVLQAIKFDE
IRVFGYTAWTLLDGFQWQDAYTTRRGLFYVDFNSEQKERKPKSSAHYYKQIIQDNGFP
LKESTPDMKGRFPCDFSWGVTEVLKPEFTVSSPQFTDPHLYVWNVGTGNRLLYRVEG
VRLKTRPSQCTDYVSIKKRVEMLAKMKVTHYQFALDWTSLIPTGNLSKVNQRVLRYY
RCVVSEGLKLGVPMTLYHPTHSHLGLPLPLSSGGWLNMTAKAFQDYAELCFRE
LGLDLVKLWITINEPNRLSDMYNRTSNDTYRAAHNLMIAHAQVWHLVDRQYRPVQHG
AVSLSLHCDWAEPANPFVDSHWKAAERFLQFEIAWFADPLFKTGDYPSVMKEYIASK
NQRGLSSSVLPRFTAKESRLVKGTVDYFALNHFTTRFVIHKLNTNRSVADRDVQFLQ
DITRLSSPSRLAVTPWGVKLLAWIRRNRYRDRDIYITANGIDDLALEDQIRKYYLEKY
VQEALKAYLIDKVKIKGYAFKLTEESKPRGFFTSDFRAKSSVQFYSKLISSSGLPAE
NRSPACGQPAEDTDCTICSFLV (SEQ ID NO: 158).

Крыса (+ FLAG на N-конце)

DYKDDDDKLEFSGDGKAIWDKKQYVSPVNPGLFLYDTFPPKNFSWGVGTGAF
QVEGSWKADGRGPSIWDRIYVDSHLRGVNSTDRSTDSYVFLEKDLLALDFLGVSFYQF
SISWPRLFPNGTVAAVNAKGLQYYRALLDSLVLNIEPIVTLYHWDLPPLTLQEEYGGW
KNATMIDLFNDYATYCFQTFGDRVKYWITHNPYLVAWHGFGTGMHAPGEKGNLTA
VYTVGHNLKAHSKVWHNYDKNFRPHQKGWLSITLGSHWIEPNRTENMEDVINCQHS
MSVVGWFANPIHGDGDYPEFMKTSSVIPEFSEAEKEEVGTADFFAFSFGPNNFRPSN
TVVKMGQNVSLNLRQVLNWKLEYDNPRILISENGWFTDSYIKTEDTTAIYMMKNFLN
QVLQAIKFDEIQVFGYTAWTLLDGFQWQDAYTTRRGLFYVDFNSEQKERKPKSSAHY
YKQIIQDNGFPQESTPDMKGQFPCDFSWGVTEVLKPEFTVSSPQFTDPHLYVWNV
GNRLLYRVEGVRLKTRPSQCTDYVSIKKRVEMLAKMKVTHYQFALDWTSLIPTGNLS

KINRQVLRYYRCVVSEGLKLGISPMVTLYHPTHSHLGLPMLLSGGWLNNTAKAFQ
 DYAGLCFKELGDLVKLWITINEPNRLSDMYNRTSNDTYRAAHNLMIAHAQVWHLYD
 RQYRPVQHGA VSLSLHSDWAEPANPYVESHWKAAERFLQFEIAWFADPLFKTGDYPL
 AMKEYIASKKQKRLSSSVLPRFTLKESRLVKGTIDFYALNHFTTRFVIHKQLNTNCSVA
 DRDVQFLQDITRLSSPSRLAVTPWGMKLLGWIRRNRYRDMDIYVTANGIDDLALED
 QIRKYYLEKYVQEALKAYLIDKVKIKGYAFKLTEEKSKPRFGFFTSDFKAKSSVQFYS
 KLISSSGFSENRSACGQPPEDTECAICSFLT (SEQ ID NO: 147).

Кролик (+ FLAG на N-конце)

DYKDDDDKLDFFPGDGRAVWSQNPNSPVNESQLFLYDTFKNFFWGVGTGAF
 QVEGSWKKGKGLSVWDHFIATHLNVSSRDGSSDSYIFLEKDLSALDFLGVSFYQFSIS
 WPRLFPDGTVA VANA KGLQYYNRLDLSLLRNIEPVVTLYHWDLPWALQEKYGGWK
 NETLIDLNDYATYCFQTFGDRVKYWITHNPYLVAWHGYGTGLHAPGEKGNVAAYV
 TVGHNLLKAHSKVWHNYNRNFRPHQKGWLSITLGSHWIEPNRAESIVDILKCQQSMV
 SVLGWFANPIHGDGDYPEVMTKKLLSVLPFSEAEKNEVRGTADFFAFSFGPNNFKPL
 NTMAKMGQNVSLNLRQVLNWKLEYGNPRILIAENGWFTDSYVQTEDTTAIYMMKNF
 LNQVLQAIRLDGVRVFGYTAWSLLDGFEWQDAYNTRRGLFYVDFNSEQRERRPKSSA
 HYYKQVIGENGFTLREATPDLQGQPCDFSWGVTESVLKPEVASSPQFSDPHLYVWN
 ATGNRMLHRVEGVRLKTRPAQCTDFITIKKQLEMLARMKVTHFRFALDWASVLPTGN
 LSEVNRQALRYRCVVTEGLKLNISPMVTLYYPHTAHLGLPAPLLHSGGWLDLPSTAKA
 FRDYAGLCFRELGDLVKLWITINEPNRLSDVYNRTSNDTYQAAHNLLIAHAIVWHLYD
 RQYRPSQRGALSLSLHSDWAEPANPYVASHWQAAERFLQFEIAWFAEPLFKTGDYPV
 AMREYIASKTRRGLSSSVLPRFSDAERRLVKGAADFYALNHFTTRFVMHEQQNGSRY
 DSDRDVQFLQDITRLASPSRLAVMPWGEGKLLRWMRNNGDLDVYITANGIDDQALQ
 NDQLRQYYLEKYVQEALKAYLIDKIKIKGYAFKLTEEKSKPRFGFFTSDFKAKSSIQF
 YNKLITSNGFPSENGGPRCNQTQGNPECTVCLLLL (SEQ ID NO: 148).

Яванский макак (+ FLAG на N-конце)

DYKDDDDKLEFSGDGRAVWSKNPNFTPVNESQLFLYDTFKNFFWGVGTGAL
 QVEGSWKKGKGPSIWDHFVHTLKNVSSTNGSSDSYIFLEKDLSALDFIGVSFYQFSI
 SWPRLFPDGIVTVANA KGLQYYNTLLDSLVLNIEPIVTLYHWDLPALQEKYGGWK
 NDTIIDIFNDYATYCFQTFGDRVKYWITHNPYLVAWHGYGTGMHAPGEKGNLAAVY
 TVGHNLIKAHSKVWHNYNTHFRPHQKGWLSITLGSHWIEPNRSENTMDILKCQQSMV
 SVLGWFASPIHGDGDYPEGMKKLLSILPLFSEAEKNEVRGTADFFAFSFGPNNFKPLN
 TMAKMGQNVSLNREALNWKLEYNNPRILIAENGWFTDSHVKTEDTTAIYMMKNFL
 SQVLQAIRLDEIRVFGYTAWSLLDGFEWQDAYTIRRGFLFYVDFNSKQKERKPKSSAHY
 YKQIIRENGFSLKEATPDVQGQPCDFSWGVTESVLKPEVASSPQFSDPYLYVWNAT
 GNRLHLRVEGVRLKTRPAQCTDFVNIKKQLEMLARMKVTHYRFALDWASVLPTGNLS
 AVNRQALRYRCVVSEGLKLGISAMVTLYYPHTAHLGLPEPLLHAGGWLNPNSTVEAF
 QAYAGLCFQELGDLVKLWITINEPNRLSDIYNRSGNDTYGAAHNLLVAHALAWRLYD
 RQFRPSQRGAVSLSLHADWAEPANPYADSHWRAAERFLQFEIAWFAEPLFKTGDYPA
 AMREYIASKHRRGLSSSALPRLTEAERLLKGTVDFCALNHFTTRFVMHEQLAGSRYD
 SDRDIQFLQDITRLSSPTRLA VIPWGVKLLRWVRRNYGDMDIYITASGIDDQALEDDR
 LRKYYLEKYLQEVKAYLIDKVRKIKGYAFKLAEKSKPRFGFFTSDFKAKSSIQFYNK
 MISSSGFPSENSSSRCSQTQKNTCTVCLFLA (SEQ ID NO: 149).

Макак-резус (+ FLAG на N-конце)

DYKDDDDKLEFSGDGRAVWSKNPNFTPVNESQLFLYDTFKNFFWGVGTGAL
 QVEGSKKDGKGPSIWDHFVHTLKNVSSTNGSSDSYIFLEKDLSALDFIGVSFYQFSI
 SWPRLFPDGIVTVANAKGLQYYNALLDSLVLNIEPIVTLYHWDLPLALQEKYGGWK
 NDTIIDIFNDYATYCFQTFGDRVKYWITIHPYLVAWHGYGTGMHAPGEKGNLAAVY
 TVGHNLIKAHSKVWHNYNTHFRPHQKGWLSITLGSHWIEPNRSENTMDILKCQQSMV
 SVLGWFANPIHGDGDYPEGMKKKLLSILPLFSEAEKNEVRGTADFFAFSGPNNFKPLN
 TMAKMGQNVSLNLREALNWIKLEYNNPQILIAENGWFTDSHVKTEDTTAIYMMKNFL
 SQVLQAIRLDEIRVFGYTAWSLLDGFEWQDAYTIRRGFLFYVDFNSKQKERKPKSSAHY
 YKQIIRENGFSLKEATPDVQGGQPCDFSWGVTESVLKPEVASSPQFSDPYLYVWNAT
 GNRLLHRVEGVRLKTRPAQCTDFVNIKKQLEMLARMKVTHYRFALDWASVLTGNLS
 AVNRQALRYRVCVSEGLKLGISAMVTLYYPTHAHLGLPELLHAGGWLNPNSTVEAF
 QAYAGLCFQELGDLVKLWITINEPNRLSDIYNRSGNDTYGAAHNLLVAHALAWRLYD
 RQFRPSQRGAVSLSLHADWAEPANPYADSHWRAAERFLQFEIAWFAEPLFKTGDPYA
 AMREYIASKHRRGLSSSALPRLTEAERRLLKGTVDFCALNHFTTRFVMHEQLAGSRYD
 SDRDIQFLQDITRLSSPTRLAVIPWGVRLKLRWVRRNYGDMDIYITASGIDDQALEDDR
 LRKYYLEKYLQEVLKAYLIDKVRIKGYAFLAEKSKPRFGFFTSDFAKSSIQFYNK
 MISSSGFPSENSSSRCSQTQKNTCTVCLFLV (SEQ ID NO: 150).

Как показано в табл. 4, было обнаружено, что большинство антител, например 6D12, 11D4 и 8E1, связываются с KLB кролика, яванского макака и макак-резусов и около половины анти-KLB антител, например, 8C5, 14E6 и 14C6 связываются с KLB мыши и крысы.

Таблица 4. Связывание мышиных анти-KLB антител с KLB из разных видов

Анти-KLB антитело	мышь	крыса	кролик	Яванский макак	Макак-резус
11F1	нет	нет	нет	ДА	ДА
6D12	нет	нет	ДА	ДА	ДА
11D4	нет	нет	ДА	ДА	ДА
8E1	нет	нет	ДА	ДА	ДА
46C3	нет	нет	ДА	нет	нет
8H7	Слабое	нет	ДА	ДА	ДА
21H3	Слабое	нет	ДА	ДА	ДА
25F7	нет	нет	Слабое	ДА	ДА
8C5	ДА	ДА	нет	ДА	ДА
14E6	ДА	ДА	ДА	ДА	ДА
14C6	ДА	ДА	ДА	ДА	ДА
24A1	ДА	ДА	ДА	ДА	ДА
5F8	нет	нет	ДА	ДА	ДА
6C1	нет	нет	ДА	ДА	ДА
12A11	Слабое	нет	ДА	ДА	ДА
12B8	нет	нет	ДА	ДА	ДА
14C10	нет	нет	ДА	ДА	ДА

Пример 6. Картирование эпитопов анти-KLB антител.

Чтобы определить, связывают ли анти-KLB антитела внеклеточный домен (ECD) человеческого альфа-Клото (hKLA), была использована конструкция, имеющая следующую последовательность.

Предсказанная экспрессируемая полипептидная последовательность (с С-концевым (внутриклеточным) FLAG)

EPGDGAQTWARFSRPPAPEAAGLFQGTFPDGLWAVGSAAYQTEGGWQQHGKGASI
 WDTFTHHPLAPPGDSRNASPLGAPSPQATGDVASDSYNNVFRDTEALRELGVTHY
 RFSISWARVLPNGSAGVPNREGLRYYRRLERLRELGVQPVVTLYHWDLPQRLQDAY
 GGWANRALADHFRDYAELCFRHFQGVKYWITIDNPYVVAWHGYATGR LAPGIRGS
 PRLGYLVAHNLLLAHAKVWHLYNTSFRPTQGGQVSIALSSHWINPRRMTDHSIKECQK
 SLDFVLGWFAKPVFIDGDYPESMKNLSSILPDFTESEKKFIKGTADFFALCFGPTLSFQ
 LLDPHMKFRQLESPNLRQLLSWIDLEFNHPQIFIVENGWVFSGTTKRDDAKYMYYLKK
 FIMETLKAIKLDGVDVIGYTAWSLMDGFEWHRGYSIRRGIFYVDFLSQDKMLLPKSSA
 LFYQKLIKENGFPPLPENQPLEGTFPCDFAWGVVDNYIQVDTTLSQFTDLNVYLWDVH
 HSKRLIKVDGVVTKRKSYCVDFAAIQPQIALLQEMHVTHFRFSLDWALILPLGNQSQ
 VNHTILQYYRCMASELVRVNITPVVALWQPMAPNQGLPRLLARQGAWENPYTALAFA
 EYARLCFQELGHHVKLWITMNEPYTRNMTYSAGHNLLKAHALAWHVYNEKFRHAQ
 NGKISIALQADWIEPACPFQKDKVAERVLEFDIGWLAEPFGSGDYPWVMRDWLNQ
 RNNFLLPYFTEDEKKLIQGTDFLALSHYTTILVDSEKEDPIKYNDYLEVQEMTDITWL
 NSPSQVAVVPWGLRKVLNWLKFKYGDLPYIISNGIDDGLHAEDDQLRVYYMQNYIN
 EALKAHILDGINLCGYFAYSFNDR TAPRFGLYRYAADQFEPKASMKHYRKIIDSNGFPG
 PETLERFCPEEFTVCTECSFFHTRKSLLAFIAFLFFASIISLSLIFYYSKKGRRSYKLEDYK
 DDDDK (SEQ ID NO: 151).

Оба белка KLA и KLB имеют два гликозидаза-подобных домена, один N-концевой и один С-концевой. Чтобы определить область KLB, распознаваемую антителами, анти-KLB, hKLB, hKLA и химерную конструкцию, содержащую N-концевой гликозидаза-подобный домен hKLA и С-концевой гликозидаза-подобный домен hKLB, клонировали в экспрессионный вектор млекопитающих pCMV-Tag4A (Agilent). N- и С-концевые домены hKLA и hKLB соответствуют последовательностям SEQ ID NO: 151 и SEQ ID NO: 145 соответственно, как показано в табл. 5. N-концевые домены hKLA и hKLB были разделены на 5 сегментов, и С-концевые домены были разделены на 5 сегментов на основе гомологии последовательностей между двумя белками.

Таблица 5. Подпоследовательности KLA и KLB

Полипептидный сегмент	Последовательность аминокислот
N-концевой гликозидаза-подобный домен KLA	28-469 из SEQ ID NO: 151
С-концевой гликозидаза-подобный домен KLA	486-928 из SEQ ID NO: 151
N-концевой гликозидаза-подобный домен KLB	29-452 из SEQ ID NO: 145
С-концевой гликозидаза-подобный домен KLB	469-923 из SEQ ID NO: 145
Сегмент 1 ECD KLA	1-94 из SEQ ID NO: 151
Сегмент 2 ECD KLA	95-201 из SEQ ID NO: 151
Сегмент 3 ECD KLA	202-329 из SEQ ID NO: 151
Сегмент 4 ECD KLA	330-442 из SEQ ID NO: 151
Сегмент 5 ECD KLA	443-472 из SEQ ID NO: 151
Сегмент 6 ECD KLA	473-529 из SEQ ID NO: 151
Сегмент 7 ECD KLA	530-613 из SEQ ID NO: 151

Сегмент 8 ECD KLA	614-729 из SEQ ID NO: 151
Сегмент 9 ECD KLA	730-831 из SEQ ID NO: 151
Сегмент 10 ECD KLA	832-944 из SEQ ID NO: 151
Сегмент 1 ECD KLB	1-77 из SEQ ID NO: 145
Сегмент 2 ECD KLB	78-184 из SEQ ID NO: 145
Сегмент 3 ECD KLB	185-313 из SEQ ID NO: 145
Сегмент 4 ECD KLB	314-425 из SEQ ID NO: 145
Сегмент 5 ECD KLB	426-455 из SEQ ID NO: 145
Сегмент 6 ECD KLB	456-514 из SEQ ID NO: 145
Сегмент 7 ECD KLB	515-598 из SEQ ID NO: 145
Сегмент 8 ECD KLB	599-722 из SEQ ID NO: 145
Сегмент 9 ECD KLB	723-829 из SEQ ID NO: 145
Сегмент 10 ECD KLB	830-992 из SEQ ID NO: 145

Антитела согласно настоящему изобретению анализировали с помощью FACS, и примерно половина антител по данным этого анализа распознавала N-концевой гликозидаза-подобный домен hKLB, в то время как остальные антитела распознавали C-концевой гликозидаза-подобный домен (табл. 6). Как показано в табл. 6, два антитела, которые распознают N-концевой домен hKLB, связывают часть домена, содержащую сегмент 1, в то время как остальным для связывания необходимы только сегменты 2-5.

Таблица 6. Картирование связывания мышиных анти-KLB антител

Анти-KLB антитело	N- или C-концевой домен	Сегмент (1-10)
11F1	N-концевой	1-5
6D12	N-концевой	1-5
11D4	N-концевой	2-5
8E1	N-концевой	2-5
46C3	N-концевой	2-5
8H7	N-концевой	2-5
21H3	N-концевой	2-5
25F7	N-концевой	2-5
8C5	C-концевой	5-10
14E6	C-концевой	5-10
14C6	C-концевой	5-10
24A1	C-концевой	5-10
5F8	C-концевой	5-10
6C1	C-концевой	5-10
12A11	C-концевой	5-10
12B8	C-концевой	5-10
14C10	C-концевой	5-10

Пример 7. Определение биспецифических антител, которые специфически активируют комплекс FGFR1c/KLB.

На основании способности RIMAb активировать FGFR1 в виде Fab была получена молекула, в которой более низкоаффинное RIMAb было присоединено к более высокоаффинному анти-KLB антителу, что привело к созданию биспецифического анти-KLB/анти-FGFR1 антитела (фиг. 6A; WO 2012/158704).

Не желая ограничиваться конкретной теорией, авторы предполагают, что FGF21-опосредованная активация происходит путём привлечения FGF21 к комплексу FGFR1c/KLB через C-концевой KLB-связывающий хвост, в то время как детерминанты для FGFR-специфичности располагаются в N-концевой области, которая, вероятно, связывается с FGFR с низкой аффинностью (см. фиг. 6B) (Yie et al. FEBS Lett. 583(1): 19-24 (2009)). Таким образом, присоединение низкоаффинного RIMAb1 к высокоаффинному анти-KLB антителу в виде биспецифического антитела может привести к KLB-зависимому агонисту FGFR1. Не желая ограничиваться конкретной теорией, авторы предполагают, что биспецифическое анти-KLB/анти-FGFR1 антитело, которое включает плечо FGFR1, имеющее низкую аффинность, может снизить риск прочного связывания биспецифического анти-KLB/анти-FGFR1 антитела с FGFR1 в

отсутствие KLB и риск предотвращения связывания и/или активации FGFR1 другими лигандами FGF (например, FGF1, FGF2, FGF8 и FGF23). Кроме того, плечо FGFR1 с низкой аффинностью делает возможным присутствие более высоких уровней примесей анти-FGFR1, включая, без ограничения, половину антитела анти-FGFR1, несущую выступ, нековалентные димеры анти-FGFR1 антител, ковалентные димеры анти-FGFR1 и формы с высокой молекулярной массой, которые не приводят к клинически значимым побочным эффектам.

В настоящем описании bFKB1, в общем, относится к любому из нескольких биспецифических анти-KLB/анти-FGFR1 антител, раскрытых в настоящем описании. Подробные данные о конкретных биспецифических анти-KLB/анти-FGFR1 антителах, раскрытых на фигурах, представлены ниже. Клетки HEK293 котрансфицировали смесью четырех экспрессионных векторов, кодирующих тяжелые и легкие цепи анти-FGFR1 (YW182.2 (R1MAb1) и YW182.3 (R1MAb2)) и анти-KLB антител, описанных выше. Тяжелые цепи анти-FGFR1 и анти-KLB были соответственно помечены Flag-пептидом и Остгистидином, так что гетеродимер IgG может быть очищен с помощью последовательной аффинной очистки из кондиционированной среды. Частично очищенный гетеродимер IgG затем анализировали в люциферазном анализе GAL-ELK1 для идентификации KLB-зависимых агонистов. Чтобы свести к минимуму неправильное спаривание тяжелых и легких цепей, анти-FGFR1 был экспрессирован с человеческой константной областью Fab, а анти-KLB был экспрессирован с мышинной константной областью Fab. Меченые биспецифические IgG первоначально были испытаны в неочищенном виде с использованием 28 комбинаций 3 анти-R1MAbs и 18 анти-KLB Ab (табл. 7).

Фиг. 7A показывает данные по индукции для некоторых биспецифических комбинаций YW182.2 (R1MAb1), YW182.3 (R1MAb2) и YW182.5 (R1MAb3) с 18C5, 12A11 и 14E6 в люциферазном анализе GAL-ELK1. В большинстве случаев было отмечено, что активированный биспецифическими антителами сигналинг значительно лучше происходит в клетках, которые коэкспрессируют FGFR1c и KLB, по сравнению с клетками, которые экспрессируют только FGFR1c, но не KLB.

На основании данных об активности этих антител в начальных экспериментах 8 репрезентативных анти-KLB Ab (Ph#5, 8C5, 12A11, 14C10, 6D12, 11D4, 6C1 и, в качестве отрицательного контроля, 14E6) были использованы для получения немеченых биспецифических антител с YW182.5 (получали с помощью описанной выше технологии "выступ-во-впадину" и использовали для дальнейшего исследования (см. выше, и, например, в Atwell et al. FEBS Lett. 583(1): 19-24 (2009)). Как показано на фиг. 8A, биспецифические антитела были получены с константной областью IgG1 человека (дикого типа, с эффекторной функцией (1)) и с константной областью IgG1 человека с мутацией N297G для устранения эффекторной функции (3) или константной областью мыши с двойной мутацией [D265G/N297G] (DANG) для устранения эффекторной функции (2).

В табл. 7 ниже перечислены различные биспецифические антитела, которые были получены с использованием технологии "выступ-во-впадину".

Таблица 7. Биспецифические анти-KLB/анти-FGFR1 антитела

BsAb ID#	Анти-FGFR1 плечо	Анти-FGFR1 платформа	Анти-KLB плечо	Анти-KLB платформа
1	YW182.3	Человеческий IgG1	Ph#5	Человеческий IgG1
2	YW182.2	Человеческий IgG1	Ph#5	Человеческий IgG1
3	YW182.3	Человеческий IgG1	14E6	Химера мышиный VH/VL-человеческий IgG1
4	YW182.3	Человеческий IgG1	8C5 (KLBmAb1)	Химера мышиный VH/VL-человеческий IgG1
5	YW182.5	Человеческий IgG1	11D4 (KLBmAb5)	Химера мышиный VH/VL-человеческий IgG1
6	YW182.5	Человеческий IgG1	14C10 (KLBmAb3)	Химера мышиный VH/VL-человеческий IgG1
7	YW182.5	Человеческий IgG1	6C1 (KLBmAb4)	Химера мышиный VH/VL-человеческий IgG1
8	YW182.5	Человеческий IgG1	6D12 (KLBmAb6)	Химера мышиный VH/VL-человеческий IgG1
9	YW182.5	Человеческий IgG1	12A11 (KLBmAb2)	Химера мышиный VH/VL-человеческий IgG1
10	YW182.5	Человеческий IgG1	8C5 (KLBmAb1)	Химера мышиный VH/VL-человеческий IgG1
11	YW182.5	Человеческий IgG1 N297G	8C5.K4H3. RNL	Человеческий IgG1 N297G
12	YW182.5	Человеческий IgG1 N297G	8C5.K4H3. KNV	Человеческий IgG1 N297G
13	YW182.5	Человеческий IgG1	8C5.K4H3.	Человеческий IgG1

		N297G	M4L.KNV	
14	YW182.5	Человеческий IgG1 N297G	8C5.K4H3. M4L.KNV	Человеческий IgG1 N297G
15	YW182.5_W33Y	Человеческий IgG1 N297G	8C5.K4H3. M4L.KNV	Человеческий IgG1 N297G
16	YW182.2_W33Y	Человеческий IgG1 N297G	8C5.K4H3. M4L.KNV	Человеческий IgG1 N297G
17	YW182.5_YGDY	Человеческий IgG1 N297G	8C5.K4H3. M4L.KNV	Человеческий IgG1 N297G
18	YW182.2_YA	Человеческий IgG1 N297G	8C5.K4H3. M4L.KNV	Человеческий IgG1 N297G
19	YW182.5	Человеческий IgG1 N297G	8C5_W52Y. K4H3.M4L. KNV	Человеческий IgG1 N297G
20	YW182.5	Химера человеческий VH/VL-мышинный IgG2a DANG	Мышиный 8C5	Мышиный IgG2a DANG

В качестве контрольного изотипа IgG были использованы антитела против агглютинаина амброзии (мышинный IgG2a) или человеческие анти-Her2 антитела трастузумаб (IgG1 человека). Fab-фрагменты экспрессировали в *E.coli* и очищали с использованием обычной колоночной хроматографии. За исключением FGF21, который был использован в анализе связывания радиоактивно меченого лиганда с клетками, который проводили с йод-меченым FGF21 от Phoenix Pharmaceuticals и произведенным самостоятельно немеченым FGF21, рекомбинантный FGF21 для всех остальных анализов был получен от R&D Systems (2539-FG/CF). Каждая из биспецифических комбинаций (за исключением отрицательного контроля) показала зависимость сигналинга от FGFR1c и KLB. Данные для некоторых комбинаций показаны на фиг. 7B. Кроме того, сочетание плеч анти-KLB и YW182.5 (R1Mab3) показало более низкий фоновый сигналинг в клетках, которые экспрессируют FGFR1c, но не KLB.

Как показано на фиг. 6C, активность анти-KLB/анти-FGFR1c антитела (BsAb17) была протестирована на клетках HEK293, дефицитных по FGFR1, экспрессирующих различные рецепторы. Клетки HEK293T, дефицитные по FGFR1, были получены с использованием способа CRISPR-cas9 с помощью гидовых РНК. Анти-KLB/анти-FGFR1c антитела показали индукцию активности люциферазы в рекомбинантных клетках, коэкспрессирующих hFGFR1c и hKLB (фиг. 6C).

Аналогичные результаты наблюдались для других анти-KLB/анти-FGFR1c антител. Как показано на фиг. 7C, при тестировании в люциферазном анализе GAL-ELK1 в клетках HEK293, экспрессирующих FGFR1c совместно с KLB или без него, множество комбинаций биспецифических антител из плеч анти-FGFR1 и анти-KLB, например, BsAb5, 6, 7, 8, 9, 10, дозозависимо индуцировали активность люциферазы в клетках, экспрессирующих рекомбинантные hFGFR1c и hKLB, но не в клетках без экспрессии KLB. Эти результаты указывают на то, что эти биспецифические антитела действуют как KLB-зависимые агонисты FGFR, так же как FGF21.

Также была протестирована синергия антитела анти-KLB/анти-FGFR1c (BsAb17) с FGF21. Как показано на фиг. 9B, между BsAb17 и FGF21 не наблюдалось синергии, когда последовательно увеличивали концентрацию FGF21, а концентрацию BsAb17 оставляли неизменной.

Кроме того, когда концентрацию анти-KLB/анти-FGFR1c антитела (BsAb17) последовательно увеличивали, а концентрацию FGF21 оставляли неизменной, между BsAb17 и FGF21 не наблюдалось синергии (фиг. 9C).

Аффинность связывания (K_d) двух биспецифических антител, BsAb10 и BsAb9, (наряду с hFGF21) в растворе с клетками HEK293, экспрессирующими KLB человека, яванского макака и мыши, FGFR1c человека или оба белка hFGFR1c и hKLB, измеряли с помощью анализа связывания радиоактивно меченого лиганда. Для анализа связывания клетками радиоактивного лиганда клетки HEK293, которые стабильно коэкспрессировали KLB и/или FGFR1c, помещали в 96-луночный планшет при плотности от 100000 до 200000 клеток на 0,2 мл связывающего буфера (DMEM с 1% бычьего сывороточного альбумина (BSA), 50 mM HEPES, pH 7,2, 0,1% азида натрия и 350 mM человеческого IgG). К клеткам добавляли смеси для реакции конкуренции объемом 50 мкл, содержащие фиксированную концентрацию йод-меченого FGF21 (Phoenix Pharmaceuticals) или йод-меченого BsAb и серийные разведения немеченого FGF21 (Genentech) или немеченого BsAb. Реакционную смесь для конкуренции инкубировали с клетка-

ми в течение 2 ч при комнатной температуре. После 2 ч инкубации реакционные смеси для конкуренции переносили в фильтровальный планшет Millipore Multiscreen и промывали четыре раза буфером для связывания, чтобы отделить свободные йод-меченый FGF21 или антитело от связанных. Активность фильтров считывали на гамма-счётчике Wallac Wizard 1470 (PerkinElmer Life и Analytical Sciences). Данные о связывании были оценены с использованием программного обеспечения New Ligand (Genentech), которое использует алгоритм аппроксимации Мансона и Родбарда (Munson and Rodbard Anal. Biochem. 107, 220-239 (1980)) для определения аффинности связывания.

Как показано в табл. 8, оба антитела проявили хорошую реакционную способность по отношению к клеткам, экспрессирующим только KLB (межвидовой паттерн соответствует наблюдаемому ранее), но оба антитела гораздо слабее связываются с клетками, экспрессирующими только hFGFR1c, и более сильно связываются с клетками, экспрессирующими hKLB и hFGFR1c.

Таблица 8. Связывание биспецифических анти-KLB антител с KLB/FGFR1 из разных видов

FGFR1c	(нет)	(нет)	(нет)	Человек	Человек
KLB	Человек	Яванский макак	мышь	Человек	(нет)
BsAb10	6,6 нМ	15,4 нМ	15,5 нМ	2,3 нМ	300 нМ
BsAb9	9,8 нМ	35 нМ	нет данных	2,2 нМ	300 нМ
hFGF21	нет данных	нет данных	нет данных	5,3 нМ	нет данных

Фиг. 9D показывает аффинность BsAb10 и BsAb9 к клеткам HEK293, стабильно экспрессирующим hKLB, hFGFR1c или оба белка, по сравнению с антителом с двумя соответствующими связывающими анти-FGFR1 плечами (YW182.5) по данным анализа FACS. Были получены результаты, аналогичные указанным выше (фиг. 9D).

Дальнейшие эксперименты проводили с одним биспецифическим антителом, BsAb10, которое имеет YW182.5 в качестве анти-FGFR1 плеча и 8C5 в качестве анти-KLB плеча, и производными BsAb10 (BsAb11-20). Как показано на фиг. 6C, мышинные рецепторы были экспрессированы в клетках FIEK293, и было показано, что BsAb17 также индуцирует активность люциферазы в этих клетках, что подтверждает видовую кросс-реактивность этого Ab.

BsAb10 затем было протестировано в миобластах крысы L6, в которых отсутствуют эндогенные KLB и FGFR, но которые были трансфицированы для экспрессии hKLB и каждой из 5 изоформ hFGFR (фиг. 9A). Было обнаружено, что BsAb10 индуцирует активность люциферазы только в клетках, экспрессирующих как FGFR1c, так и KLB, что указывает на активность BsAb10 в качестве специфического агониста для комплекса FGFR1c/KLB, но не KLB в комплексе с другими FGFR (фиг. 9A). FGF21 и FGF19 были использованы в качестве контроля, чтобы продемонстрировать, что FGF21 индуцирует активность люциферазы, когда клетки экспрессируют комбинацию KLB и любого из FGFR1c, 2c или 3c, и что FGF19 индуцирует активность люциферазы, когда клетки экспрессируют комбинацию KLB и FGFR4. За исключением FGF21, который был использован в анализе связывания радиоактивно меченого лиганда с клетками, который проводили с йод-меченым FGF21 от Phoenix Pharmaceuticals и произведенным самостоятельно немеченым FGF21, рекомбинантный FGF21 для всех остальных анализов был получен от R&D Systems (2539-FG/CF). кДНК, кодирующие внеклеточный домен (ECD) человеческих FGFR1b, 1c, 2b, 2c, 3b, 3c и 4, были клонированы в экспрессионный вектор, содержащий промотор цитомегаловируса (CMV), чтобы получить химерные белки человеческий FGFR-человеческий Fc или His-меченые белки FGFR.

Тем не менее, как описано выше, исходное анти-FGFR1c антитело для BsAb10, R1MAb3 (YW182.5), неожиданно может связываться с FGFR1b, изоформой FGFR1, которая не вступает во взаимодействие с KLB. Кроме того, R1MAb3 (YW182.5) может активировать FGFR1b в анализе GAL-ELK1 в клетках L6, что отличается от активности BsAb10 (см. фиг. 2C и 2B).

Кроме того, сочетание FGFR1b и KLB не приводит к активации под действием BsAb10 (фиг. 9A). Не желая быть ограниченными какой-либо конкретной теорией, авторы предполагают, что эти данные свидетельствуют о том, что наличие предварительно сформированного комплекса FGFR1/KLB является необходимым условием для KLB-зависимой активации FGFR1 под действием BsAb10.

Пример 8. BsAb10 и его производные действуют как молекулярные миметики FGF21.

Дальнейшее исследование BsAb10 и его производных (BsAb11-20) и FGF21 выявило некоторые сходства и различия. Для определения уровня фосфорилирования промежуточных участников сигнализации MAPK клетки выращивали в базальной среде-2 для преадипоцитов, содержащей FBS, L-глутамин и GA-1000. При достижении клетками сплошного покрытия подкожные преадипоциты (приобретенные у Lonza) дифференцировали в культуральной среде, содержащей дексаметазон, индометацин и 3-изобутил-1-метилксантин (IBMX). Для анализа экспрессии генов клетки дифференцировали в течение 14 дней, а затем дополнительно культивировали в течение дополнительных 48 ч с указанными агонистами. Для анализа сигналинга MAPK клетки дифференцировали в течение 10 дней, культивировали в среде без сыворотки в течение 3 ч, а затем культивировали в течение дополнительного часа с указанными агонистами.

Как показано на фиг. 6D, по данным вестерн-блоттинга BsAb10, BsAb17, BsAb20 и FGF21 проявили сравнимую активность в отношении индукции фосфорилирования промежуточных участников сигнального пути MAPK, таких как MEK и ERK, в первичных человеческих адипоцитах, которые представляют собой релевантный тип клеток для антидиабетической активности FGF21. Антитела, используемые для Вестерн-блот-анализа, были получены от Cell Signaling Technology: pFRS2a (T196) (#3864), pMEK1/2 (S217/221) (#9154), pERK1/2 (T202/204) (#4370), ERK1/2 (#4695), HSP90 (#4874), бета-актин (# 5125), от Abcam: UCP1 (ab10983) или от R&D Systems: KLB (AF2619).

Как показано на фиг. 8B, усиление фосфорилирования ERK, представленное в виде кратного изменения уровня pERK, наблюдалось в первичных человеческих адипоцитах, обработанных BsAb10, BsAb17, BsAb20 или FGF21.

Кроме того, профиль аффинности BsAb10 напоминает FGF21. При тестировании с помощью FACS BsAb10 показало сильное связывание с клетками, экспрессирующими hKLB, вне зависимости от коэкспрессии FGFR1c (фиг. 10A). Неожиданным стало очень низкое связывание BsAb10 с клетками, экспрессирующими FGFR1c, но не KLB, что указывает на чрезвычайно низкую моновалентную аффинность плеча YW182.5 (фиг. 10 A).

Как представлено на фиг. 10B, анализ связывания радиоактивно-меченого лиганда показал, что константа диссоциации (K_d) BsAb10 для клеток, экспрессирующих как FGFR1c, так и KLB, составляет 2,3 нМ и близка к 5,3 нМ для hFGF21 в аналогичном формате анализа. Эти значения близки к наблюдаемой EC_{50} этих молекул в анализе GAL-ELK1 в клетках HEK293 (3,2 и 4,7 нМ, соответственно, для BsAb10 и FGF21). При экспрессии в клетках только человеческого KLB или только мышинного KLB K_d составили 6,6 и 15,5 нМ соответственно.

Поскольку аффинность к FGFR1 была настолько низкой, анализ связывания радиоактивно-меченого лиганда не позволяет достоверно определить K_d BsAb10 для клеток, экспрессирующих только FGFR1c, но, по оценкам, она составляет > 300 нМ, как показано на фиг. 3B. По той же причине кинетика связывания BsAb10 с FGFR1 не может быть достоверно определена и с помощью SPR.

Кроме того, взаимодействие между белками FGFR1c-ECD и KLB-ECD стабилизировалось BsAb10, как ранее наблюдалось для FGF21, что согласуется с предположением, что BsAb10 действует как FGFR1c-селективный миметик FGF-21 (фиг. 11) (Yie et al., Chemical Biology; Drug Design 79, 398-410 (2012)). Взаимодействие FGFR1/KLB/BsAb10 было изучено с помощью измерений с использованием поверхностного плазмонного резонанса (SPR) на приборе PROTEON™ XPR36 (Bio-Rad Laboratories) при температуре 25°C. Белок FGFR1-His (20 мкг/мл) при pH 4,5 иммобилизовали при поверхностной плотности (1000 RU) на активированный сенсорный чип PROTEON™ GLC с использованием стандартных процедур аминного связывания, как описано производителем. BsAb10 и/или смеси 1:1 BsAb10 и KLB-ECD вводили при концентрациях 6,25, 12,5, 25, 50, 100 или 200 нМ в PBS, содержащем 0,005% об./об. TWEEN®-20, 0,3M NaCl (pH 7,4), при скорости потока 80 мкл/мин и записывали сенсограммы фаз ассоциации и диссоциации. Образцы вводили в течение 300 с, после чего диссоциацию оценивали в течение 600 с. Данные сравнивали с внутренними контролями, обрабатывали и измеряли константы диссоциации с помощью программного обеспечения PROTEON™ Manager (версия 3.0, Bio-Rad). Предполагается, что активация комплекса FGFR1c/KLB под действием BsAb10 происходит путём образования трехкомпонентного комплекса из FGFR1c-ECD, KLB-ECD и BsAb10.

Как показано на фиг. 11, было также отмечено, что BsAb10 формирует тройной комплекс с рекомбинантными KLB-ECD и FGF21 или FGF19. Взаимодействие BsAb10/KLB/FGF было изучено с помощью интерферометрии биослоя (BLI), измеренной на приборе Octet RED (ForteBio) при температуре 25°C. BsAb10 (20 мкг/мл) при pH 4,5 иммобилизовали на активированном реагирующем с аминокислотными биосенсорном чипе, как описано производителем. KLB-ECD (20 мкг/мл) в PBS, содержащем 0,005% об./об. TWEEN®-20, 0,3M NaCl (pH 7,4), захватывали на тех же самых биосенсорных чипах, после чего проводили измерения с FGF21 (R&D Systems) при концентрациях 0, 0,2, 0,8, или 2 мкМ в том же буфере. Качественные данные были обработаны с помощью программного обеспечения для сбора данных (ForteBio).

На фиг. 12A показана схема проведенного эксперимента с резонансным флуоресцентным переносом энергии с временным разрешением (TR-FRET) на поверхности клеток. Для TR-FRET COS7-клетки котрансфицировали для экспрессии SNAP-меченого FGFR1 и немеченого KLB и высевали в 96-луночный планшет с прозрачным дном (Costar) в количестве 100000 клеток на лунку. Трансфицированные клетки метили через 24 ч после трансфекции 100 нМ конъюгированного с донором бензилгуанин SNAP-Lumi4-Tb (Cisbio) и 1 мкМ конъюгированного с акцептором бензил-гуанин SNAPAlexa647 (NEB) в течение 1 ч при 37°C, 5% CO₂. После трех промывок излучение Lumi4-Tb и сигнал TR-FRET регистрировали при 620 и 665 нм, соответственно, в течение 400 мкс после задержки на 60 мкс после возбуждения лазером с длиной волны 343 нм с использованием планшетного спектрофлуориметра Safire2 (Tecan) при $t = 0$ и $t = 15$ мин после добавления лиганда. Сигнал эмиссии Alexa647 был обнаружен при 682 нм после возбуждения при 640 нм на том же планшетном спектрофлуориметре. Интенсивность FRET затем вычисляли следующим образом: (сигнал при 665 нм клеток, меченных SNAP-донором и SNAP-акцептором) - (сигнал при 665 нм тех же трансфицированных клеток, меченных SNAP-донором и не ме-

ченных SNAP-акцептором).

Как показано на фиг. 12B, эксперимент TR-FRET позволяет предположить, что BsAb17 и FGF21 оба усиливают димеризацию FGFR1c-ECD, когда KLB также присутствует в клетке. Результаты представлены как отношение FRET: интенсивность FRET, разделенная на излучение донора при длине волны 620 нм.

Кроме того, BsAb10 связывается с С-концевой половиной KLB-ECD, в то время как FGF21 и FGF19, предположительно, связываются с сайтом в N-концевой половине KLB (Goetz et al. *Mol. Cell. Biol.*, 32(10): 1944-54 (2012); Foltz et al. *Sci. Transl. Med.* 4: 162ra153 (2012)), что свидетельствует о том, что эпитоп BsAb10 на KLB должен отличаться от сайта связывания FGF21 и FGF19. Для картирования эпитопа KLB для BsAb10 проводили связывание 8C5 (KLB-связывающее плечо BsAb10) с серией химерных антигенов, экспрессированных в клетках HEK293. Каждый химерный белок был сконструирован путем слияния KLB человека и альфа-Клото (KLA) человека (50% идентичности с белком KLB человека) или KLB кролика (86% идентичности с KLB человека). Как показано на фиг. 13B, 8C5 связывается с С-концевым доменом KLB, в частности, с областью, содержащей 34 аминокислоты в С-концевом домене KLB (SSPTRLAVIPWGVKLLRWVRRNYGDMDIYITAS; SEQ ID NO: 142).

Как показано на фиг. 13B, аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 142 может соответствовать аминокислотам 857-890 белка KLB, который включает сигнальную последовательность, например, такую как последовательность из 52 аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 157, или может относиться к аминокислотам 805-838 белка KLB, который не включает сигнальную последовательность.

Несмотря на сходство между FGF21 и BsAb10 и его производными в активности, имеющей место после связывания с рецептором, эпитоп BsAb10 на KLB отличается от сайта связывания FGF21 и FGF19 (фиг. 14A).

На фиг. 14B показаны результаты люциферазного анализа GAL-ELK1, выполненного на миоблестах крысы L6, котрансфицированных FGFR4 и KLB и обработанных FGF19 отдельно или в комбинации с анти-KLB/анти-FGFR1c антителом (BsAb17). Как показано на фиг. 14B, предварительная обработка BsAb17 также не блокировала активность FGF19 в клетках L6, экспрессирующих комплекс FGFR4/KLB.

Кроме того, как показано на фиг. 14C, предварительная обработка BsAb17 не блокировала активность FGF19 в клетках гепатомы H4IIE, экспрессирующих FGFR4 и KLB. В присутствии BsAb17 FGF19 был еще способен активировать комплекс FGFR4/KLB для индукции фосфорилирования ERK (фиг. 14C). Эти данные указывают на то, что представленное биспецифическое антитело анти-KLB/анти-FGFR1, например биспецифическое антитело анти-KLB/анти-FGFR1c, не мешает взаимодействию FGF19 или FGF21 с комплексом KLB/FGFR1c.

Пример 9. BsAb10 и его производные действуют в качестве длительно действующего миметика FGF21 *in vivo*.

Кросс-реактивность BsAb10 и его производных с мышинным рецепторным комплексом, как описано выше (см., например, фиг. 6C и 10B), позволила протестировать его активность *in vivo* с помощью моделей на мышах. Чтобы избежать потенциальной токсичности от эффекторной функции IgG, в Fc-область BsAb20 была введена двойная мутация [D265A/N297G], которая предотвращает связывание с FcγR и привлечение иммунных эффекторных клеток. Кроме того, чтобы избежать потенциальной токсичности от эффекторной функции IgG, в Fc-область BsAb17 была введена замена N297G, которая предотвращает связывание с FcγR и привлечение иммунных эффекторных клеток.

Как показано на фиг. 15A, когда диабетическим мышам db/db вводили внутривенно 5 мг/кг BsAb17, уровень глюкозы в крови снижался в отсутствие изменений в потреблении пищи и весе тела. Мыши C57BL/6 на диете с низким уровнем жира, получившие BsAb17, продемонстрировали снижение уровня глюкозы в крови, но не достигли токсической гипогликемии (фиг. 15A).

Кроме того, когда мышам C57BL/6 на диете с высоким содержанием жиров (индуцированное диетой ожирение, DIO) вводили BsAb17 в дозе 3 мг/кг в дни 0 и 6, наблюдалось значительное снижение веса и уровня глюкозы в крови (фиг. 15B). Для кормления согласно диете с высоким содержанием жиров была использована диета с высоким содержанием жиров и высоким содержанием углеводов (Harlan Teklad TD.03584, 58,4% калорий из жира).

Как показано на фиг. 15C, увеличение толерантности к глюкозе наблюдалось у мышей C57BL/6 на диете с высоким содержанием жиров (индуцированное диетой ожирение, DIO), которым был введен BsAb17 в дозе 3 мг/кг.

У мышей C57BL/6 на диете с высоким содержанием жиров (индуцированное диетой ожирение, DIO), которым был введен BsAb17 в дозе 3 мг/кг, наблюдалось снижение уровней триглицеридов в печени, сывороточного инсулина, свободных жирных кислот, триглицеридов и общего холестерина (фиг. 15D). Аналогичные результаты ранее наблюдались при инъекциях FGF21.

Чтобы определить, требуется ли для наблюдаемого при лечении биспецифическим анти-KLB/анти-FGFR1c антителом улучшения толерантности к глюкозе наличие функционального KLB, проводили отдельный эксперимент на *klb*-гетерозиготных мышах и гомозиготных *klb*-дефицитных мышах. Для создания *klb*-дефицитных (KO) мышей *Klb*-специфичную пару нуклеаз с "цинковыми пальцами" (ZFN) получили от Sigma-Aldrich и использовали для проницательной микроинъекции в соответствии с известными способами. Пара ZFN нацелена на следующую последовательность *Klb* в геноме мыши (разрезаемый

сайт обозначен маленькими буквами), и у мышей КО не хватает одной удалённой пары оснований (g выделен жирным шрифтом), что вызывает сдвиг рамки считывания: GTTACCGGCTTcscggaGACGG GAAAGCAATATGG (SEQ ID NO: 156). Фиг. 16А показывает N-концевую аминокислотную последовательность мышинового белка KLB и соответствующую аминокислотная последовательность, кодируемую аллелем *klb* у *klb*-дефицитных мышей.

На фиг. 16В приведены результаты вестерн-блоттинга, который был выполнен, чтобы подтвердить отсутствие экспрессии белка KLB у *klb*-дефицитных мышей.

Как показано на фиг. 16С, BsAb20 улучшает толерантность к глюкозе у *klb*-гетерозиготных мышей, что измерено с помощью теста на толерантность к глюкозе (GTT), но не у гомозиготных *klb*-дефицитных мышей, что указывает на необходимость присутствия функционального KLB для улучшения толерантности к глюкозе. Для теста на толерантность к глюкозе (GTT) мыши голодали в течение ночи, и им вводили внутривенно 2 г/кг раствор глюкозы.

Кроме того, в отличие от анти-FGFR1 R1Mab1, которое изменяет уровни FGF23 и фосфора в сыворотке (Wu et al., Sci. Transl. Med. 3, 113ral26 (2011) и Wu et al., PLoS One 8, e57322 (2013)), биспецифическое анти-KLB/анти-FGFR1 антитело не влияет на эти параметры в сыворотке крови, что указывает на отсутствие KLB-независимой агонистической активности FGFR1 (фиг. 16D).

Как показано на фиг. 17, BsAb17 не меняет уровней FGF23 или фосфора в сыворотке, которые являются чувствительными маркерами KLB-независимого FGFR1. Действие инсулина у обработанных BsAb17 мышей измеряли с помощью гиперинсулинемических-эугликемических фиксаций. В целом, мышей анестезировали изофлураном и катетеризировали левую общую сонную артерию и правую шейную вену для отбора проб и инфузии соответственно. Свободные концы катетеров были тоннельно выведены под кожей на заднюю часть шеи, где свободные концы катетеров были прикреплены к трубке из MICRO-RENATHANE® (0,033 в OD). Животных после операции содержали индивидуально и ежедневно регистрировали вес тела. Все метаболические эксперименты были проведены после 5-дневного периода послеоперационного восстановления и были предварительно описаны. Мышей в сознании в условиях свободного поведения помещали в 1 л пластиковый контейнер с подстилкой и не давали корм с 7:00 утра (t = -300 мин). Мыши были немедленно подключены к двухканальному поворотному соединению из нержавеющей стали (Instech Laboratories), чтобы обеспечить одновременно инфузию в яремную вену и отбор проб артериальной крови. Мышей не трогали, и они могли свободно передвигаться, чтобы исключить стресс. За 2 ч до начала фиксации в яремную вену вводили болюс 5 мКи $[3\text{-}^3\text{H}]\text{-D-глюкозы}$ (t = -120 мин), после чего следовала постоянная инфузия со скоростью 0,05 мКи/мин. После 2 ч периода уравнивания при t = 0 мин (т.е. 5 ч голодания) отбирали исходный образец артериальной крови для измерения уровня глюкозы в крови, $[3\text{-}^3\text{H}]\text{-D-глюкозы}$, гематокрита и инсулина в плазме. Затем начинали процедуру гиперинсулинемической-эугликемической фиксации в течение 145 мин (4 мЕд/кг/мин). $[3\text{-}^3\text{H}]\text{-D-глюкозу}$ добавляли к переменной инфузии глюкозы, которая была использована для поддержания эугликемии, а постоянную инфузию $[3\text{-}^3\text{H}]\text{-D-глюкозы}$ прекращали, чтобы зафиксировать удельную активность глюкозы в артериальной крови на постоянном уровне. Красные клетки крови от мыши донора линии C57BL/6J промывали и восстанавливали в равном объеме 0,9% гепаринизированного физиологического раствора (гематокрит ~ 50%) и проводили их инфузию со скоростью 4 мкл/мин в течение данного исследования, чтобы заменить кровь, удалённую во время исследования. Образцы артериальной крови брали через каждые 10 мин, чтобы определить уровень глюкозы в крови. При t = 80, 90, 100 и 120 мин были взяты образцы крови для определения $[3\text{-}^3\text{H}]\text{-D-глюкозы}$. При t = 120 мин в катетер яремной вены вводили болюс 13 мКи 2-дезоксид- $[14\text{C}]\text{глюкозы}$ ($[2\text{-}^{14}\text{C}]\text{DG}$). При t = 122, 125, 130, 135 и 145 мин артериальную кровь отбирали для определения уровня глюкозы в крови, $[3\text{-}^3\text{H}]\text{-D-глюкозы}$ и $[2\text{-}^{14}\text{C}]\text{DG}$ в плазме. Концентрацию инсулина в артериальной крови измеряли в точках 100 и 120 мин. При t = 145 мин мышей анестезировали. Камбаловидную, икроножную мышцу, белую наружную часть латеральной широкой мышцы бедра (Quad), печень, сердце, эпидидимальную и подкожную белую жировую ткань, бурю жировую ткань и мозг вырезали, немедленно замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C до предстоящего анализа ткани. Иммунореактивный инсулин анализировали с использованием набора Linco Rat Radioimmunoassay (LincoResearch).

Для измерения уровня $[3\text{-}^3\text{H}]\text{-D-глюкозы}$ образцы плазмы депротеинизировали с помощью гидроксида бария ($\text{Ba}(\text{OH})_2$) и сульфата цинка (ZnSO_4), сушили и определяли радиоактивность с помощью жидкостной сцинтилляции. Вырезанные ткани депротеинизировали хлорной кислотой и затем нейтрализовали до pH ~ 7,5. В части образца измеряли радиоактивность ($[2\text{-}^{14}\text{C}]\text{DG}$ и $[2\text{-}^{14}\text{C}]\text{DG-фосфат}$ ($[2\text{-}^{14}\text{C}]\text{DGP}$)), а часть обрабатывали $\text{Ba}(\text{OH})_2$ и ZnSO_4 , и для нее измеряли радиоактивность в супернатанте ($[2\text{-}^{14}\text{C}]\text{DG}$). Уровни радиоактивности $[2\text{-}^{14}\text{C}]\text{DG}$ и $[2\text{-}^{14}\text{C}]\text{DG-фосфата}$ ($[2\text{-}^{14}\text{C}]\text{DGP}$) определяли с помощью жидкостного сцинтилляционного подсчета. Скорости потоков глюкозы были оценены с использованием уравнения нестационарного состояния, учитывающего объем распределения (130 мл/кг). Тканеспецифичный клиренс (K_g) $[2\text{-}^{14}\text{C}]\text{DG}$ и показатель поглощения глюкозы (R_g) рассчитывали, как описано ранее (Kraegen, E.W. et al., Am. J. Physiol., 248, E353-362 (1985)):

$$K_g = [2\text{-}^{14}\text{C}]\text{DGP}_{\text{ткань}} / \text{AUC } [2\text{-}^{14}\text{C}]\text{DG}_{\text{плазма}}$$

$$R_g = K_g \times [\text{глюкоза}]_{\text{плазма}}$$

где $[2\text{-}^{14}\text{C}]\text{DGP}_{\text{ткань}}$ является радиоактивностью $[2\text{-}^{14}\text{C}]\text{DGP}$ в ткани (распадов в мин/г), $\text{AUC}[2\text{-}^{14}\text{C}]\text{DGP}_{\text{плазма}}$ является площадью под кривой исчезновения $[2\text{-}^{14}\text{C}]\text{DGP}$ в плазме (распадов в мин/мл/мин), $[\text{глюкоза}]_{\text{плазма}}$ является средним уровнем глюкозы в крови (мкг/мл) в течение времени эксперимента ($t = 102\text{-}125$ мин). Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ SEM.

Как показано на фиг. 15E, которая представляет потребление глюкозы всем организмом, измеренное после однократной инъекции BsAb17 в дозе 10 мг/кг, BsAb17 увеличивает скорость стимулированного инсулином потребления глюкозы всем организмом.

Кроме того, как показано на фиг. 15F, BsAb17 усиливает подавление инсулином скорости эндогенной продукции глюкозы после однократной инъекции BsAb17 в дозе 10 мг/кг. Эти результаты указывают на то, что однократное введение 10 мг/кг BsAb17 мышам DIO за 5 дней до фиксации заметно понижало концентрации глюкозы и инсулина после голодания.

Поглощение глюкозы тканями (R_g) в конце стимулированного инсулином периода усиливалось в сердце, скелетных мышцах, белой жировой ткани (WAT) и межлопаточной BAT ткани (iBAT), что указывает на сенсибилизацию BsAb17 всего организма к инсулину (фиг. 15G).

В ходе эксперимента по фиксации было определено количество отклонений уровня глюкозы в артериальной крови. Как показано на фиг. 18A, в ходе эксперимента по гиперинсулинемической-эугликемической фиксации количество отклонений уровня глюкозы в артериальной крови у мышей, которым вводили BsAb17, отличалась от количества отклонений у мышей, которым вводили контрольный IgG.

Также была определена разница в весе между мышами, которым вводили BsAb17, и мышами, которым вводили контрольный IgG. Как показано на фиг. 18B, изменения в концентрациях глюкозы и инсулина наблюдались без видимой потери в весе.

После инъекции BsAb17 также анализировали стационарную скорость инфузии глюкозы. Как показано на фиг. 18C, стационарная скорость инфузии глюкозы увеличилась на 64% после инъекции BsAb17. Эти результаты показывают, что BsAb17 улучшил чувствительность всего организма к инсулину у мышей DIO еще до того, как стала очевидной потеря веса.

Предыдущие исследования с фармакологическими дозами FGF19 или FGF21 показали увеличение расхода энергии (EE) (Fu et al., Endocrinology 145, 2594-2603 (2004); Coskun et al., Endocrinology 149, 6018-6027 (2008); Wu et al., PLoS One 8, e57322 (2013); Lin et al., Cell Metab., 17, 779-789 (2013)), таким образом, было высказано предположение, что будет наблюдаться аналогичный эффект. Для расчета EE и дыхательного коэффициента (RQ) были использованы следующие уравнения:

$$EE = VO_2 \times (3,815 + 1,232 \times RQ), \text{ где} \\ (RQ = VCO_2 / VO_2).$$

Действительно, одна инъекция BsAb17 DIO или мышам на диете с низким уровнем жира при нормальной комнатной температуре (21°C) привела к значительному увеличению потребления O_2 (VO_2), выработки CO_2 (VCO_2) и EE у животного после инъекции без существенного изменения активности (фиг. 19A). Неожиданно было обнаружено, что наблюдаемое увеличение EE на 15-46% не сопровождалось значительными изменениями в дыхательных коэффициентах ($RQ = VCO_2 / VO_2$) (фиг. 19A).

Аналогичное увеличение EE без изменения RQ было вызвано непрерывной инфузией FGF21 мышам DIO (фиг. 21C).

Фиг. 20A показывает количество VO_2 , VCO_2 и общее измерение активности мышей DIO, получавших одну инъекцию BsAb17 при нормальной комнатной температуре.

Как показано на фиг. 19B, увеличение EE сохранялось, когда температура клетки была повышена до термонеutralной (29-30°C), что позволяет предположить, что вызываемая BsAb17 индукция активации коричневого жира не зависит от адаптивного термогенного входа из симпатической нервной системы.

Фиг. 20B показывает количество VO_2 , VCO_2 и общее измерение активности мышей DIO, получавших одну инъекцию BsAb17 при нормальной комнатной температуре с последующим сдвигом температуры до термонеutralной.

Повышение EE было также очевидно, когда мышам DIO, акклиматизированных к термонеutralной комнатной температуре (29-30°C), тестировали в течение двух недель (фиг. 21B).

Как показано на фиг. 21A, которая показывает средние величины EE, изменения в EE наблюдались у мышей на диете с низким уровнем жира и мышам DIO при нормальной комнатной температуре и у мышей на диете с низким уровнем жира и мышам DIO, акклиматизированных в термонеutralной комнатной температуре.

В противоположность этому непрерывная инфузия агониста $\beta 3$ -специфических адренорецепторов CL-316,243, как и ожидалось, индуцировала острое повышение EE и снижение RQ (фиг. 19H). Непрерывную инфузию FGF21 или CL-316,243 осуществляли с помощью осмотического мини-насоса (Alzet 2001), который имплантировали подкожно. Таким образом, индукция EE под действием BsAb17 и FGF21 является устойчивой, но, как предполагается, более избирательной, чем другие описанные ранее механизмы активации BAT, такие как введение симпатомиметиков (норадреналина или агониста $\beta 3$ -специфических адренорецепторов CL-316243), сердечных натрийуретических пептидов, или интерлей-

кина 4, которые сопровождаются усилением окисления липидов и снижением RQ (Gerhart-Hines et al., *Mol. Cell* 44, 851-863 (2011); Mattsson et al., *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 299, E374-383 (2010); Nguyen et al., *Nature* 480, 104-108 (2011); Birkenfeld et al. *Diabetes* 57, 3199-3204 (2008); Bordicchia et al., *J. Clin. Invest.* 122, 1022-1036 (2012); и de Souza et al., *Diabetes* 46, 1257-1263 (1997)).

Не желая ограничиваться конкретной теорией, авторы считают, что несколько линий доказательств позволяют предположить доминирующую роль активации BAT в метаболическом действии BsAb17. Во-первых, как показано на фиг. 19C, инъекции BsAb17 повышают поглощение 18F-фтордезоксиглюкозы (FDG) именно в iBAT.

Во-вторых, однократные инъекции BsAb17 индуцировали экспрессию белка UCP1 в паховой WAT (ingWAT), что свидетельствует о превращении жировой ткани в бурую (фиг. 19D).

Как показано на фиг. 19E, также наблюдалась индукция экспрессии UCP1 в культивируемых первичных адипоцитах, обработанных FGF21 или BsAb17, что указывает на прямое действие на зрелые адипоциты. Для определения экспрессии UCP1 тотальную РНК использовали для синтеза кДНК с использованием набора для синтеза кДНК SUPERScript® VILO (ABI). Для qPCR образцы в трех повторностях помещали в прибор ViiA 7 Real-Time PCR (Applied Biosystems). Использовали предварительно созданные зонды компаний Applied Biosystems зонды для анализа экспрессии UCP1 TaqMan® Gene (Hs01027785_m1). Для каждого образца мРНК количество нормализовали на количество транскриптов TBP (Hs00427620_m1) и SDHA (Hs00188166_m1).

Далее с помощью телеметрической системы наблюдали увеличение температуры тела покоя после однократной инъекции BsAb17, которое длилось в течение ≥ 26 дней до постепенного возвращения к исходному уровню (фиг. 19F).

Фиг. 22 показывает различия в центральной температуре тела, которые наблюдались у мышей после однократной инъекции BsAb17 по сравнению с мышами, обработанными контрольным IgG. Центральную температуру тела контролировали с использованием датчика TA-F10 (Sciences Data International, DSI), который имплантировали в брюшную полость. После восстановления после хирургического вмешательства мышам случайным образом делили на группы на основании массы тела и температуры тела. Температуру тела и активность контролировали с помощью имплантируемых систем телеметрии DSI.

Профили экспрессии генов были проанализированы для iBAT из мышей DIO, получавших однократную инъекцию BsAb17, FGF21 или контрольного IgG. Как показано на фиг. 19G, индуцированные однократной инъекцией BsAb17 изменения экспрессии генов в iBAT напоминают результаты двукратных ежедневных инъекций FGF21.

И, наконец, при введении мышам C57BL/6 как FGF21, так и BsAb20 происходит индукция фосфорилирования ERK и MEK в различных жировых тканях, в том числе в iBAT и ingWAT (фиг. 23).

В предыдущих исследованиях предполагалось, что адипонектин вносит свой вклад в полное действие FGF21 (Lin et al., *Cell Metab.*, 17, 779-789 (2013); Holland et al., *Cell Metab.*, 17, 790-797 (2013)). На самом деле, одна инъекция BsAb17 мышам DIO привела к увеличению уровней сывороточного высокомолекулярного (HMW) адипонектина при ассоциированной потере веса (фиг. 24A).

Аналогичным образом, однократное введение BsAb17 макакам на диете с низким уровнем жира (фиг. 24B) привело к увеличению уровней сывороточного высокомолекулярного (HMW) адипонектина при ассоциированной потере веса.

Как показано на фиг. 24C, после однократной инъекции BsAb17 мыши с нокаутом адипонектина (Adipoq) на HFD демонстрировали устойчивую реакцию, выражающуюся в увеличении EE (25,3% увеличения против 20,9% увеличения у мышей дикого типа (wt)).

Кроме того, после однократной инъекции BsAb17 у мышей с нокаутом адипонектина (Adipoq) на HFD уменьшался вес тела и уровень триглицеридов печени (фиг. 24D). Тем не менее, изменения толерантности к глюкозе, толерантности к инсулину, изменения уровня инсулина в сыворотке крови и различных липидов были менее выражены у мышей с нокаутом (фиг. 24D), что согласуется с идеей, что BsAb17 действует как миметик FGF21, регулируя метаболизм питательных веществ всего организма, в частности, через функции адипонектина. Для определения толерантности к инсулину мыши голодали в течение 4 ч, и им внутривенно вводили 1 ед./кг раствора инсулина человека (Humulin R., Eli Lilly and Company).

Повышенная селективность BsAb10 к рецептору (см. фиг. 9A) и описанный ранее низкий уровень проникновения молекул IgG в мозг (Yu et al., *Sci. Transl. Med.*, 3, 84ra44 (2011)) предсказывают измененный профиль безопасности BsAb10 и его производных по сравнению с FGF21/19. В соответствии с низким уровнем экспрессии FGFR1 в печени, FGF21, но не BsAb17, индуцирует экспрессию мРНК классических генов-мишеней FGFR Spry4 и Dusp6 в печени (фиг. 25).

BsAb17 или BsAb20 также привели к увеличению сигнала фосфо-ERK в различных жировых тканях и адипоцитах поджелудочной железы, но не в печени (фиг. 23).

Фиг. 26 показывает, что BsAb17 по данным иммуногистохимии также не приводит к увеличению фосфорилирования ERK в различных участках головного мозга, включая циркумвентрикулярные органы.

Кроме того, хроническое применение BsAb20 в лечении мышей DIO в течение 8 недель уменьшило количество BrdU+ клеток в печени до уровня, характерного для мышей C57BL/6 на диете с низким уровнем жира, противоположно тому, как это ожидалось для FGF19-подобной активности (фиг. 27). Для включения BrdU в печень мышам внутрибрюшинно вводили 100 мг/кг BrdU (BD Biosciences) за 2 ч до эвтаназии. Анти-BrdU окрашивание проводили, как описано (Nicholes K. et al. *Am. J. Pathol.*, 160, 2295-2307 (2002)), и BrdU-положительные гепатоциты подсчитывали с использованием автоматизированной системы анализа изображений Ariol.

Проводили анализ костей мышей, которые были обработаны анти-KLB/анти-FGFR1c антителом. Фиг. 28А показывает схему анализа. Для выполнения анализа костной ткани образцы бедренной кости визуализировали с помощью системы микровизуализации μ CT40 от SCANCO Medical (Бассерсдорф, Швейцария), работающей с рентгеновской трубкой с энергией 70 кэВ и током 114 мкА. Непрерывные аксиальные изображения срезов были получены с изотропным размером вокселя 12 мкм. Морфометрический анализ трабекулярной кости в бедренной кости был выполнен с помощью программного обеспечения μ CT40 от SCANCO Medical (Бассерсдорф, Швейцария). Для определения интересующего объема (VOI), включающего вторичную трабекулярную кость, находящуюся дорсальнее проксимальной пластинки роста бедренной кости и выступающую на 1,5 мм дистальнее первичной трабекулярной кости, был использован полуавтоматический профиль. Кортикальная кость была исключена путем размещения границ VOI в пределах внутренней границы кортикальной кости. До сегментации изображения для подавления электромагнитных помех к данным изображений был применен ограниченный трехмерный (3D) гауссовский низкочастотный фильтр (сигма фильтра = 0,5, поддержка фильтра = 1). Для выделения "бинаризованной" трабекулярной структуры из VOI применяли глобальный порог (0,36 г HA/см³). Порог трабекулярной сегментации был выбран путем визуального осмотра результатов сегментации из репрезентативного подмножества выборок. Трабекулярные структурные характеристики были определены количественно путем прямого морфометрического 3D-анализа. Предыдущие исследования показали, что морфометрический анализ трабекулярной кости с помощью микрокомпьютерной томографии хорошо коррелирует с аналогичными оценками, сделанными с помощью гистоморфометрии.

Как показано на фиг. 28В, хроническое лечение мышей DIO с применением BsAb20 в течение 6 недель привело к ожидаемым изменениям в метаболических параметрах без какого-либо отрицательного сигнала в различных параметрах костной ткани в большеберцовой трабекулярной и бедренной кортикальной костях по данным микрокомпьютерной томографии.

Как показано на фиг. 29, инъекция BsAb17 мышам DIO не увеличивала уровни сывороточного кортикостерона выше контроля. Хронический положительный энергетический баланс, распространенный в современном обществе, приводит к пандемии ожирения и связанным с ним нарушениям метаболизма, характеризующимся резистентностью к инсулину, гиперинсулинемией, нарушением толерантности к глюкозе, гиперлипидемией и гепатостеатозом, которые часто приводят к серьезным заболеваниям, таким как диабет 2 типа, цирроз печени, инсульт и болезни сердца. В 2009 году было сообщено о наличии UCP1-позитивного BAT у взрослых людей и ее функциональной значимости в активации ЕЕ с помощью рассеивания тепла, что привело к огромному интересу по терапевтической индукции и активации BAT для лечения ожирения и связанных с ним метаболических заболеваний (Yoneshiro and Saito, *Ann. Med.*, 1-9 (2014)).

Тем не менее, наиболее известные механизмы активации BAT также вызывают липолиз белой жировой ткани, что может оказать негативное воздействие на сердечно-сосудистую систему (Dong et al., *Cell Metab.* 18, 118-129 (2013)). Следует отметить, что трансплантация BAT увеличивает ЕЕ и вызывает потерю веса без изменения RQ (Stanford et al., *J. Clin. Invest.* 123, 215-223 (2013)). В связи с этим FGF21 и антитело-агонист анти-FGFR1/KLB, предусмотренные в настоящем описании, представляют собой уникальный подход к селективной индукции термогенного ответа в BAT без изменения RQ, тем самым имитируя трансплантацию BAT, а не неспецифическую симпатическую активацию. Кроме того, на основании наблюдаемых эффектов у мышей предполагается, что опосредуемая антителом активация комплекса FGFR1c/KLB может обеспечить более безопасное и более эффективное средство для борьбы с ожирением и для антидиабетической терапии по сравнению с более широкой активацией комплекса FGFR/KLB аналогами FGF21 или FGF19.

Пример 10. Гуманизация анти-KLB антитела 8C5.

Мышиные CDR легкой цепи из 8C5 были перенесены в каркасные области каппа 2 и каппа 4 легкой цепи человека. В дополнение к первичному перемещению были также произведены точечные мутации, так что в позицию 4 в каждой легкой цепи была введена замена на лейцин (обозначенной "M4L"). Был проведен анализ для выявления тех вариантов, которые лучше экспрессируются и не проявляют значительной агрегации. Аналогичным образом CDR тяжелой цепи были перенесены в каркасные области H1, H2, H3 и H4 IgG1 тяжелой цепи человека. Различные остатки в каркасе тяжелой цепи мутировали следующим образом: в H1 были внесены следующие изменения: K71R, N73T и V78A (исходный вариант обозначен "KNV", а измененный вариант - "RTA"); в H2 были внесены следующие изменения: N73T (исходный вариант обозначен "KNV", а измененный вариант - "KTV"); в H3 были внесены следующие из-

менения: K71R и V78L (исходный вариант обозначен "KNV", а изменённый вариант - "RNL"), и в H4 были внесены следующие изменения: K71V, N73T и V78F (исходный вариант обозначен "KNV", а изменённый вариант - "VTF").

Были получены антитела, сконструированные на основе всех парных комбинаций из 4 легких цепей и 8 тяжелых цепей (в общей сложности 32 антитела), и были протестированы уровни их экспрессии и аффинности. Основываясь на этих экспериментах, полученные из 8C5 легкая цепь K4.M4L и тяжелая цепь H3.KNV проявляли наилучшее сочетание уровня экспрессии и желаемой аффинности.

Ниже приведены последовательности вариабельных областей 8C5.K4.M4L.H3.KNV и полноразмерного антитела.

Вариабельная область тяжелой цепи 8C5.K4.M4L.H3.KNV

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASDFSLTTYGVHWVRQAPGKGLEWLGVIW
SGGSTDYNAAFISRLTISKDNSKNTVYVLMNSLRAEDTAVYYCARDYGSTYVDAIDY
WGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 128)

Полноразмерная тяжелая цепь 8C5.K4.M4L.H3.KNV

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASDFSLTTYGVHWVRQAPGKGLEWLGVIW
SGGSTDYNAAFISRLTISKDNSKNTVYVLMNSLRAEDTAVYYCARDYGSTYVDAIDY
WGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT
HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP
VLDSGDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID
NO: 129)

Вариабельная область легкой цепи 8C5.K4.M4L.H3.KNV

DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVESYGNRYMTWYQQKPGQPPLLIYR
AANLQSGVPPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQSNEDPWTFGQGTKVEIK
(SEQ ID NO: 130)

Полноразмерная легкая цепь 8C5.K4.M4L.H3.KNV

DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVESYGNRYMTWYQQKPGQPPLLIYR
AANLQSGVPPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQSNEDPWTFGQGTKVEIKR
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:
131)

Пример 11. Создание гибридного антитела анти-FGFR1 между YW182.3 и YW182.5.

YW182.5, которое является плечом анти-FGFR1, не активирующим комплекс KLB/FGFR1c в отсутствие плеча анти-FGFR1, дает хорошие результаты в сочетании с 8C5, и имеет триптофан в положении 33 тяжелой цепи, который подвержен окислению. YW182.2, который, как предполагается, связывает тот же эпитоп, что и YW182.5, также имеет триптофан в положении 33 тяжелой цепи. Некоторые мутации были введены в этом положении, чтобы обойти эту проблему: для YW182.5 были введены мутации W33Y, W33H, W33F и W33L, и для YW182.2 были введены мутации W33Y и W33F. Неожиданно оказалось, что введенные мутации имели различные эффекты в двух антителах. В случае YW182.2 было отмечено, что мутации не оказали заметного влияния на аффинность или агонистическую активность в отношении FGFR1, в то время как для YW182.5 мутации значительно уменьшили аффинность и агонистическую активность по отношению к FGFR1 (см., например, фиг. 31). Поэтому с целью выявления антител с мутацией W33Y, но с аффинностью, близкой к таковой для антитела YW182.5, были проведены эксперименты с использованием двух подходов.

В одном из подходов для последовательности YW182.2 W33Y тяжелой цепи было выполнено аланиновое сканирование CDR3 с мутациями на аланин в положениях 95, 96, 97, 98, 99, 100, 100a и 100b. Аффинности полученных антител были проанализированы, и были идентифицированы антитела, сохранившие очень высокую исходную аффинность YW182.2 W33Y (табл. 9).

Таблица 9. Аффинность производных YW182.2

Антитело	EC ₅₀ (нМ)
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	Не обнаружено

Во втором подходе CDR антитела YW182.2 W33Y (с очень высокой аффинностью) и антитела YW182.5 W33Y (почти без связывания) были перемешаны и составлены в различных комбинациях. Антитела YW182.2 W33Y и YW182.5 W33Y имеют идентичные последовательности CDR в легкой цепи (CDR-L1, RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 139); CDR-L2, SASFLYS (SEQ ID NO: 140), и CDR-L3 QQSYT-TPPT (SEQ ID NO: 141)), имеют различие в одном аминокислотном остатке в CDR-H1 (YW182.2 W33Y CDR-H1, STYIS (SEQ ID NO: 152) и YW182.5 W33Y CDR-H1, SNYIS (SEQ ID NO: 136)); различия в трёх аминокислотных остатках в CDR-H2 или рядом с CDR-H2 (YW182.2 W33Y CDR-H2, EIDPYDGDY-YADSVKG (SEQ ID NO: 137) и YW182.5 W33Y, EIDPYDGATDYADSVKG (SEQ ID NO: 153)), а также очень сильно отличающиеся последовательности CDR-H3 (YW182.2 W33Y, EHFDVAVHYYVMDY (SEQ ID NO: 154) и YW182.5 W33Y GTDVMYD (SEQ ID NO: 138)). Были сконструированы и протестированы антитела с тяжелыми цепями на основе всех возможных комбинаций CDR тяжелых цепей YW182.5 W33Y и YW182.2 W33Y (восемь, включая два исходных антитела). Большинство антител имели аффинность, аналогичную аффинности одного или другого антитела, но, неожиданно, одна комбинация продемонстрировала аффинность, которая была почти идентичной исходной аффинности антитела YW182.5. Это антитело имеет CDR-H1 и CDR-H3 из YW182.5 W33Y, но CDR-H2 из YW182.2 W33Y. Это антитело обозначили "YW182.5 YGDY", чтобы представить следующие изменения в последовательности YW182.5: W33Y, A49G, A56D и D58Y.

Ниже приведены последовательности антитела YW182.5 YGDY.

Вариабельная область тяжелой цепи YW182.5 YGDY

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSNYISWVRQAPGKGLEWVGEIDP
YDGDYTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCATGTDVMDYWGQ
GTLVTVSS (SEQ ID NO: 132).

Полноразмерная тяжелая цепь YW182.5 YGDY

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSNYISWVRQAPGKGLEWVGEIDP
YDGDYTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCATGTDVMDYWGQ
GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TTPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLVWLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:
133).

Вариабельная область легкой цепи YW182.5 YGDY

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFL
YSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYTTPPTFGQGTKVEIK (SEQ ID
NO: 134).

Полноразмерная легкая цепь YW182.5 YGDY

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFL
YSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST
YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 135)

Пример 12. Тестирование биспецифических антител с гуманизированными вариантами 8C5 и анти-FGFR1.

Различные комбинации биспецифических антител 8C5.K4H3.M4L.KNV и различных плечей анти-FGFR1 тестировали в люциферазном анализе GAL-ELK1 в клетках HEK293, экспрессирующих FGFR1c с KLB или без него. Как было отмечено ранее, каждая комбинация биспецифического антитела дозозависимо индуцировала активность люциферазы в клетках, экспрессирующих рекомбинантный hFGFR1c и hKLB, но не в клетках без экспрессии KLB (фиг. 30). Эти данные подтверждают, что эти модифицированные варианты сохраняют преимущества исходных антител, например BsAb13. Аффинности связывания антитела анти-KLB/анти-FGFR1, которое имеет гуманизированное плечо 8C5 (8C5.K4.M4L.H3.KNV) и плечо YW182.5_YGDY, с комплексом KLB/FGFR1c человека, макака и мыши на поверхности HEK293, приведены в табл. 10.

Таблица 10. Аффинности связывания

Линия клеток	K _d анти-KLB/анти-FGFR1c антитела (нМ)	Среднее K _d (нМ)	Стандартное отклонение
293huKLB/huR1c	1,87	1,88	0,06
	1,95		
	1,83		
293cytoKLB/cynoR1c	2,54	2,55	0,25
	2,80		
	2,31		
293msKLB/msR1c	4,12	3,92	0,17
	3,85		
	3,80		

В дополнение к различным описанным и заявленным вариантам приведенное раскрытие изобретения также относится к другим вариантам осуществления, имеющим другие комбинации признаков, раскрытых и заявленных в настоящем документе. Таким образом, конкретные признаки, представленные в описании, могут быть объединены друг с другом иным образом в пределах объема приведенного раскрытия изобретения, таким образом, что раскрытие изобретения включает любую пригодную комбинацию признаков, раскрытых в данном документе. Предшествующее описание конкретных вариантов осуществления изобретения было представлено в целях иллюстрации и описания. Оно не предназначено быть исчерпывающим или ограничивать изобретение этими раскрытыми вариантами осуществления.

Специалистам в данной области будет очевидно, что в композиции и способы согласно раскрытому изобретению могут быть внесены различные модификации и вариации, не выходя за пределы сущности или объема раскрытого изобретения. Таким образом, предполагается, что изобретение включает модификации и изменения, которые находятся в пределах объема прилагаемой формулы изобретения и ее эквивалентов.

В настоящем описании цитируются различные публикации, патенты и патентные заявки, и их содержание включено в настоящее описание посредством ссылки во всей их полноте.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Анти-бета-Клото антитело или его антигенсвязывающая часть, содержащее: (a) CDR1 вариательной области тяжелой цепи (HVR-H1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15; (b) CDR2 вариательной области тяжелой цепи (HVR-H2), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31; (c) CDR3 вариательной области тяжелой цепи (HVR-H3), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47; (d) CDR1 вариательной области легкой цепи (HVR-L1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62; (e) CDR2 вариательной области легкой цепи (HVR-L2), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 78; и (f) CDR3 вариательной области легкой цепи (HVR-L3), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93.

2. Антитело по п.1, где антитело или его антигенсвязывающая часть включает:

(a) вариательную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 128, и вариательную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 130; или

(b) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 129, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 131.

3. Биспецифическое антитело или его антигенсвязывающая часть, которые связываются с бета-Клото (KLB) и рецептором фактора роста фибробластов 1c (FGFR1c), включающие:

(i) первое плечо, которое связывается с KLB, включающее:

(a) домен CDR1 варибельной области тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 15; (b) домен CDR2 варибельной области тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 31; (c) домен CDR3 варибельной области тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 47; (d) домен CDR1 варибельной области легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 62; (e) домен CDR2 варибельной области легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 78; и (f) домен CDR3 варибельной области легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 93; и

(ii) второе плечо, которое связывается с FGFR1c, включающее:

(a) домен CDR1 варибельной области тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 136; (b) домен CDR2 варибельной области тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 137; (c) домен CDR3 варибельной области тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 138; (d) домен CDR1 варибельной области легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 139; (e) домен CDR2 варибельной области легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 140; и (f) домен CDR3 варибельной области легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 141.

4. Биспецифическое антитело или его антигенсвязывающая часть по п.3, включающие:

(a) первое плечо, которое связывается с KLB, включающее варибельную область тяжелой цепи и варибельную область легкой цепи, где варибельная область тяжелой цепи содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 128, и варибельная область легкой цепи содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 130; и

(b) второе плечо, которое связывается с FGFR1c, включающее варибельную область тяжелой цепи и варибельную область легкой цепи, где варибельная область тяжелой цепи содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 132, и варибельная область легкой цепи содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 134.

5. Биспецифическое антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп.3, 4, включающие:

(a) первое плечо, которое связывается с KLB, включающее область тяжелой цепи и область легкой цепи, где область тяжелой цепи содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 129, и область легкой цепи содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 131; и

(b) второе плечо, которое связывается с FGFR1c, включающее область тяжелой цепи и область легкой цепи, где область тяжелой цепи содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 133, и область легкой цепи содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 135.

6. Антитело по п.1 или 3, где антитело или его антигенсвязывающая часть представляют собой моноклональное антитело или человеческое, гуманизированное или химерное антитело.

7. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело по любому из пп.1-6.

8. Клетка-хозяин для экспрессии нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеиновую кислоту по п.7.

9. Способ получения антитела, включающий культивирование клетки-хозяина по п.8 таким образом, что продуцируется антитело.

10. Способ по п.9, дополнительно включающий выделение антитела из клетки-хозяина.

11. Фармацевтическая лекарственная форма для лечения метаболического расстройства, содержащая одно или несколько антител по любому из пп.1-6 и фармацевтически приемлемый носитель.

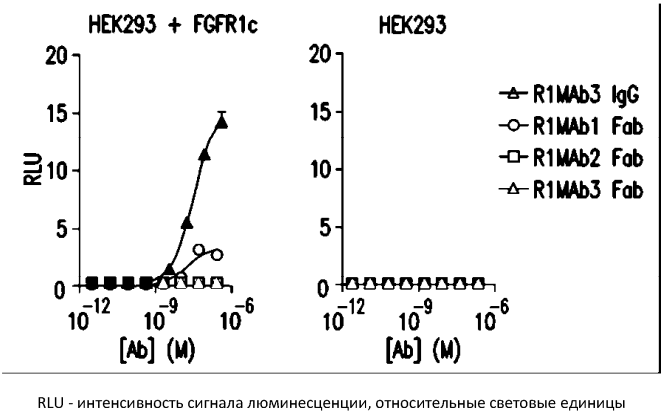
12. Фармацевтическая лекарственная форма по п.11, дополнительно содержащая дополнительный терапевтический агент, выбранный из группы, состоящей из антидиабетического агента, предотвращающего ожирение агента, лекарственного средства для метаболических заболеваний, антигипертензивного лекарства, статина, метформина, пиоглитазона, DPP4i, аналога GLP1, сульфонилмочевины, инсулина, аналога лептина и лорказерина.

13. Применение антитела по любому из пп.1-6 в качестве лекарственного средства, для активации рецепторного комплекса KLB/FGFR1 или для лечения метаболического расстройства, выбранного из группы, состоящей из синдрома поликистозных яичников (PCOS), метаболического синдрома (MetS), ожирения, неалкогольного стеатогепатита (NASH), неалкогольной жировой болезни печени (NAFLD), гиперлипидемии, артериальной гипертензии, диабета 2 типа, диабета не 2 типа, диабета 1 типа, латентного аутоиммунного диабета (LAD), диабета взрослого типа у молодых (MODY), а также старения и связанных с ним заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, ALS, синдрома Барде-Бидля, синдрома Прадера-Вилли, синдрома Альстрёма, синдрома Коэна, наследственной остеодистрофии Олбрайта (псевдогипопаратиреозидизм), синдрома Карпентера, синдрома МОМО, синдрома Рубинштейна-Тейби, синдрома ломкой X-хромосомы и синдрома Бёресона-Форсмана-Лемана.

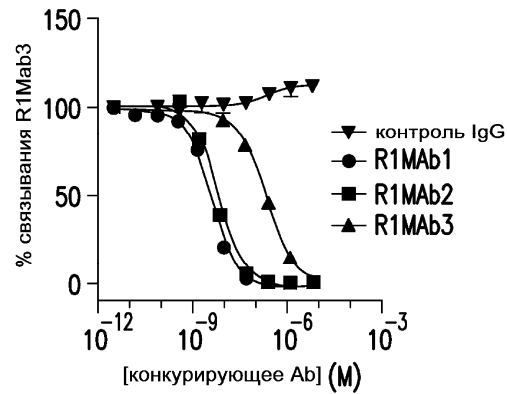
14. Применение по п.13, где метаболическое расстройство представляет собой диабет.

15. Применение по п.13, где метаболическое расстройство представляет собой диабет 2 типа.

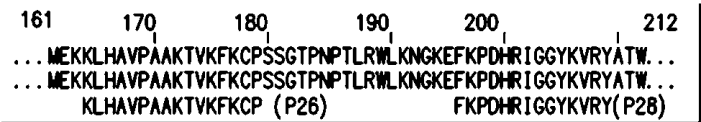
16. Применение по п.13, где метаболическое расстройство представляет собой NASH.
17. Антитело по любому из пп.1-6, где антитело или его антигенсвязывающая часть активирует комплекс KLB-FGFR1c.



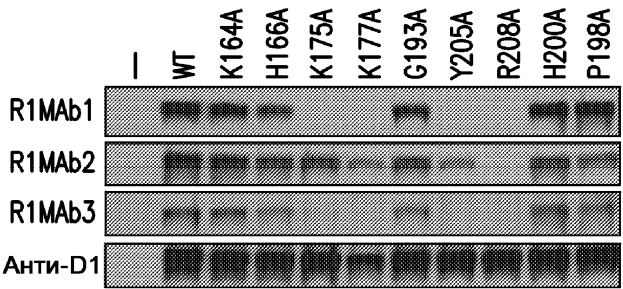
Фиг. 1А



Фиг. 1В

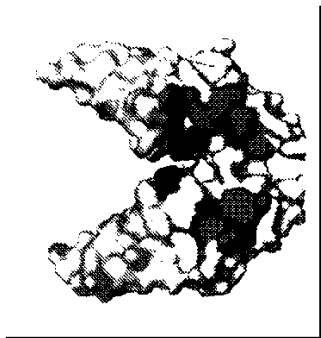


Фиг. 1С

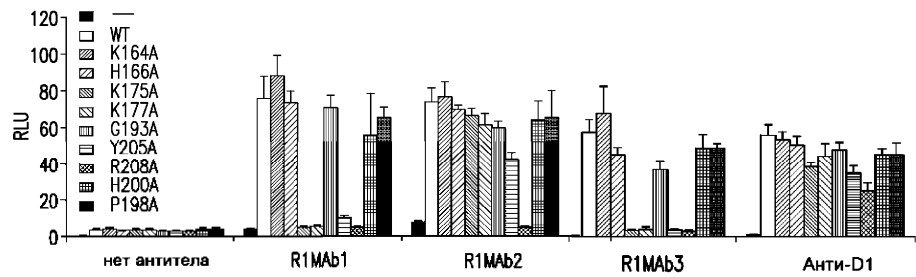


WT – дикий тип

Фиг. 1D



Фиг. 1F



WT – дикий тип

Фиг. 1E

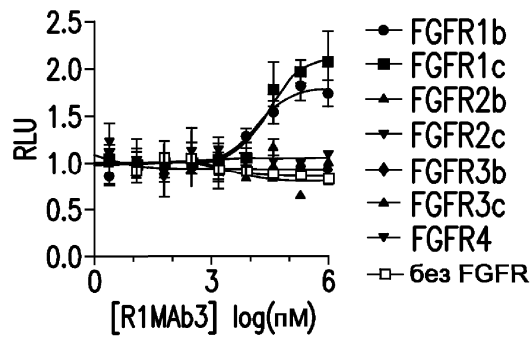
		k_{on} ($M^{-1}c^{-1}$)	k_{off} (c^{-1})	K_D (M)
R1Mab1	FGFR1b	1.9×10^6	2.2×10^{-3}	11.3×10^{-10}
	FGFR1c	4.6×10^6	3.6×10^{-3}	7.8×10^{-10}
R1Mab2	FGFR1b	4.5×10^5	3.7×10^{-4}	8.2×10^{-10}
	FGFR1c	7.3×10^5	5.1×10^{-4}	7.1×10^{-10}

Фиг. 2A

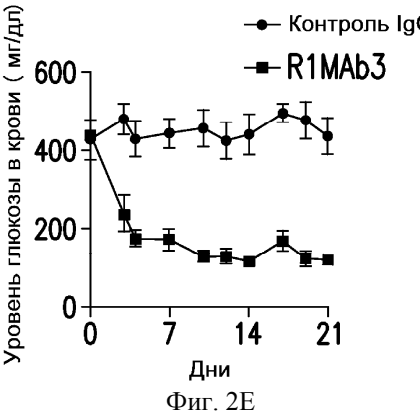
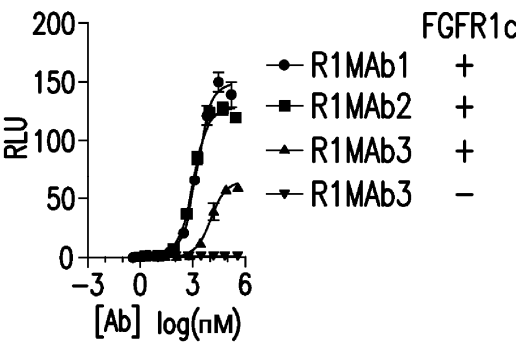
		k_{on} ($M^{-1}c^{-1}$)	k_{off} (c^{-1})	K_D (M)
R1Mab1	FGFR1b	1.9×10^6	2.2×10^{-3}	11.3×10^{-10}
	FGFR1c	4.6×10^6	3.6×10^{-3}	7.8×10^{-10}
R1Mab2	FGFR1b	4.5×10^5	3.7×10^{-4}	8.2×10^{-10}
	FGFR1c	7.3×10^5	5.1×10^{-4}	7.1×10^{-10}

OD630 – оптическая плотность при 630 нм

Фиг. 2B



Фиг. 2C



Подчеркнуты последовательности CDR в соответствии с системой Kabat

Варибельная область легкой цепи

		CDR L1 – Contact																																										
		CDR L1 – Chothia																																										
		CDR L1 – Kabat																																										
Нумерация по Kabat		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
	6D12	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	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	

Нумерация по Kabat	CDR L2 – Contact																																													
	CDR L2 – Chothia																																													
	CDR L2 – Kabat																																													
	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78				
11F1	Q	Q	K	P	D	G	T	V	K	L	L	I	Y	F	T	S	S	L	R	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	Y	S	L	T	I	S	N	L				
6D12	Q	Q	K	S	N	T	A	P	K	L	W	I	Y	D	T	S	K	L	A	S	G	V	P	G	R	F	S	G	S	G	S	G	N	S	Y	S	L	T	I	S	S	M				
11D4	Q	Q	K	P	N	G	T	I	K	L	L	I	Y	T	S	R	L	Q	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	Y	S	L	T	I	S	N	L					
8E1	Q	Q	K	P	G	N	A	P	R	L	L	I	Y	G	T	T	N	L	E	T	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	R	D	Y	I	L	S	I	T	S	L				
46C3	L	Q	K	P	G	Q	S	P	K	L	L	I	Y	K	V	S	N	R	F	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	R	D	F	T	L	K	I	S	R	V				
8H7	Q	Q	K	P	G	Q	S	P	K	L	L	I	C	S	A	S	Y	R	Y	T	G	V	P	D	R	F	T	G	S	G	S	G	T	D	F	T	F	T	I	S	S	V				
21H3	Q	Q	K	P	G	Q	S	P	K	L	L	I	C	S	A	S	Y	R	Y	T	G	V	P	D	R	F	T	G	S	G	S	G	T	D	F	T	F	T	I	S	S	V				
25F7	Q	Q	K	P	G	N	A	P	R	L	L	I	S	G	A	S	N	L	E	T	G	I	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	K	D	Y	T	L	T	I	T	S	L				
14E6	Q	Q	K	P	D	G	T	I	K	R	L	I	Y	A	A	S	T	L	D	S	G	V	P	R	R	F	S	G	S	R	S	G	S	D	Y	S	L	T	I	S	S	L				
14C6	Q	Q	K	P	G	S	S	P	K	L	W	I	Y	G	A	S	N	L	A	S	G	V	P	G	R	F	S	G	S	G	S	G	T	S	Y	S	L	T	I	S	S	M				
24A1	Q	Q	K	P	G	Q	S	P	K	L	L	V	Y	L	A	S	T	R	E	S	G	V	P	D	R	F	I	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	V				
5F8	Q	Q	K	S	D	A	S	P	K	L	W	I	Y	T	S	T	L	A	P	G	V	P	A	R	F	S	G	S	G	S	G	N	S	Y	S	L	T	I	S	S	M					
6C1	Q	Q	K	A	G	Q	S	P	K	P	L	I	Y	S	A	S	Y	R	F	S	G	V	P	D	R	F	T	G	S	G	S	G	T	E	F	T	L	T	I	S	N	V				
12A11	Q	Q	K	S	H	E	S	P	R	L	L	I	Y	A	S	Q	S	I	S	G	I	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	S	D	F	T	L	S	I	N	S	V					
12B8	Q	Q	K	P	G	S	A	P	R	L	L	I	S	A	A	T	S	L	E	T	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	K	D	Y	T	L	S	I	T	S	L				
14C10	Q	Q	K	P	G	Q	P	P	K	L	L	I	Y	R	A	S	N	L	E	S	G	I	P	A	R	F	S	G	S	G	S	R	T	D	F	T	L	T	I	N	P	V				
8C5	Q	Q	K	P	G	Q	P	P	K	L	L	I	Y	R	A	A	N	L	Q	S	G	I	P	A	R	F	S	G	S	G	S	R	T	D	F	T	L	T	I	D	P	V				

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

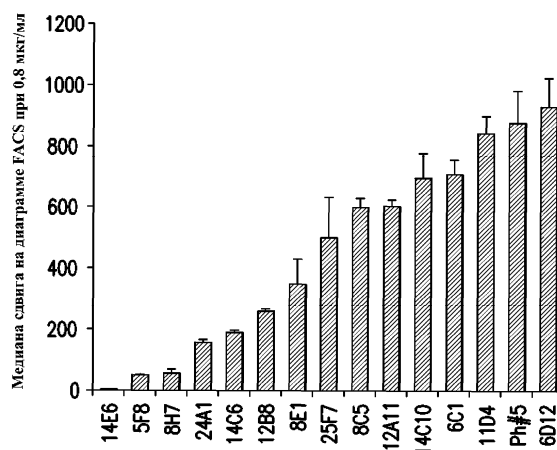
Фиг. 3А

Варибельная область тяжелой цепи

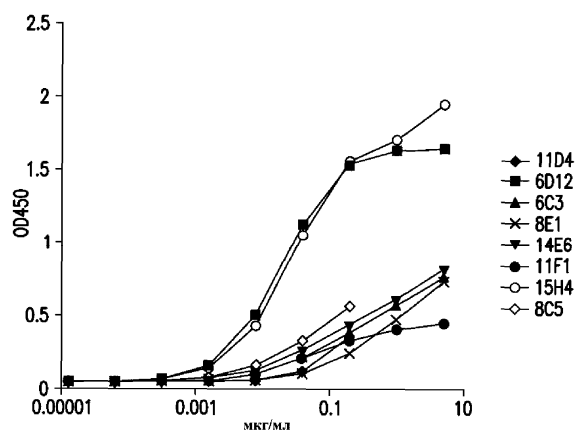
Нумерация по Kabat	CDR H1 – Contact																																									
	CDR H1 – Kabat																																									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	35a	35b	36	37	38	39	40
11F1	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	K	P	G	G	S	L	K	L	S	C	A	P	S	G	F	T	F	S	S	Y	G	I	S	.	.	W	V	R	Q	T
6D12	E	V	Q	L	Q	Q	S	G	A	E	L	V	R	P	G	A	L	V	N	L	S	C	K	A	S	G	F	N	I	K	D	Y	Y	M	N	.	.	W	V	K	Q	R
11D4	Q	V	Q	V	K	E	S	G	P	G	L	V	A	P	S	Q	S	L	S	I	T	C	T	V	S	G	F	S	L	T	N	Y	G	V	S	.	.	W	I	R	Q	P
8E1	E	V	Q	L	Q	Q	S	G	A	E	L	V	K	P	G	A	S	V	K	L	S	C	T	A	A	D	F	N	I	K	D	T	Y	M	H	.	.	W	V	K	Q	R
46C3	E	V	Q	L	Q	Q	S	G	A	E	L	V	K	P	G	A	S	V	K	L	S	C	T	A	S	D	F	N	I	I	D	T	Y	I	H	.	.	W	V	K	Q	R
8H7	Q	V	Q	L	Q	Q	P	G	A	E	I	V	K	P	G	A	S	V	R	L	S	C	K	A	S	G	Y	S	F	T	S	Y	W	I	H	.	.	W	V	K	Q	R
21H3	Q	V	Q	L	Q	Q	P	G	A	E	I	V	K	P	G	A	S	V	R	L	S	C	K	A	S	G	Y	S	F	T	S	Y	W	I	H	.	.	W	V	K	Q	R
25F7	E	V	Q	L	Q	Q	S	G	A	E	L	L	K	P	G	A	S	V	R	L	S	C	T	A	S	G	F	N	I	Q	D	T	Y	T	H	.	.	W	V	R	Q	R
14E6	E	V	P	L	Q	Q	S	G	P	E	L	V	K	P	G	A	T	V	K	I	S	C	K	P	S	G	D	T	F	T	E	Y	T	M	N	.	.	W	V	R	Q	S
14C6	Q	I	Q	L	Q	Q	S	G	A	E	L	M	K	P	G	A	S	V	R	M	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	S	S	Y	W	I	E	.	.	W	V	K	Q	R
24A1	Q	V	Q	L	K	Q	S	G	A	E	L	V	R	P	G	T	S	V	T	L	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	D	Y	E	M	H	.	.	W	M	K	Q	T
5F8	E	V	Q	L	Q	Q	S	G	T	E	L	V	R	P	G	A	S	V	K	L	S	C	K	T	S	D	F	N	I	K	D	T	Y	I	H	.	.	W	V	K	Q	R
6C1	Q	V	Q	L	Q	Q	S	G	D	E	L	M	K	P	G	A	S	V	K	I	S	C	K	V	T	G	N	T	F	S	S	Y	W	I	E	.	.	W	V	K	Q	R
12A11	E	V	K	F	L	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	V	S	G	I	D	F	S	R	Y	W	M	S	.	.	W	V	R	Q	A
12B8	Q	I	Q	L	V	Q	S	G	P	E	L	K	K	P	G	E	T	A	K	I	S	C	K	A	S	G	Y	A	F	S	N	Y	G	M	N	.	.	W	V	K	Q	R
14C10	Q	V	T	L	K	E	S	G	P	G	I	L	Q	P	S	Q	T	L	S	L	T	C	S	F	S	G	F	S	L	T	S	A	M	G	I	G	W	I	R	Q	P	
8C5	Q	V	Q	L	K	Q	S	G	P	G	L	V	Q	P	S	Q	S	L	S	V	A	C	T	V	S	D	F	S	L	T	T	Y	G	V	H	.	.	W	V	R	Q	S

		CDR H2 – Contact																																										
		CDR H2 – Chothia																																										
		CDR H2 – Kabat																																										
Нумерация по Kabat		41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	
11F1		P	E	K	R	L	E	W	V	A	T	V	S	S	G	G	R	Y	T	Y	P	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	A	E	N	T	V	Y	L	L	Q	
6D12		P	E	Q	G	L	E	W	T	G	W	I	D	P	E	N	D	D	T	I	Y	D	P	K	F	Q	G	K	A	T	I	T	A	D	T	S	S	N	T	V	Y	L	L	Q
11D4		P	G	K	G	L	E	W	L	G	V	I	W	.	G	D	G	S	I	N	Y	H	S	A	L	I	S	R	L	T	I	T	K	D	N	S	K	S	Q	V	F	L	L	K
8E1		P	E	Q	G	L	E	W	I	G	R	I	D	P	S	N	G	N	A	K	Y	D	P	K	F	Q	G	K	A	S	I	T	A	D	S	S	S	N	T	A	Y	L	L	H
46C3		P	E	Q	G	L	E	W	I	G	R	I	D	P	A	N	G	N	T	K	Y	D	P	K	F	Q	D	K	A	A	L	T	S	D	T	D	S	N	T	A	Y	L	L	L
8H7		P	G	Q	G	L	E	W	I	G	E	I	D	P	S	V	S	N	S	N	Y	N	Q	K	F	K	G	K	A	T	L	T	A	D	K	S	S	S	T	A	Y	M	Q	
21H3		P	G	Q	G	L	E	W	I	G	E	I	D	P	S	V	S	N	S	N	Y	N	Q	K	F	K	G	K	A	T	L	T	A	D	K	S	S	S	T	A	Y	M	Q	
25F7		P	E	Q	G	L	E	W	I	G	R	I	D	P	S	N	G	N	T	K	Y	D	P	K	F	Q	G	K	A	K	I	L	A	D	T	S	S	N	T	A	Y	L	Q	
14E6		H	G	K	S	L	E	W	I	G	G	I	N	P	N	N	G	E	T	S	Y	N	Q	K	F	K	G	K	A	T	L	T	V	D	K	S	S	S	T	A	F	M	D	
14C6		S	G	H	G	L	E	W	I	G	E	I	F	P	G	G	G	S	T	I	Y	N	E	N	F	K	D	K	A	T	F	T	A	D	T	S	S	N	T	A	Y	M	Q	
24A1		P	V	Y	G	L	E	W	I	G	A	I	W	P	E	N	A	D	S	V	Y	N	Q	K	F	K	G	K	V	T	L	T	A	D	K	S	S	S	T	A	Y	M	D	
5F8		P	E	Q	G	L	D	W	L	G	R	I	D	P	A	N	G	N	T	K	Y	D	P	K	F	Q	G	K	A	A	M	T	S	D	T	S	S	N	T	A	Y	L	R	
6C1		P	G	H	G	L	E	W	I	G	E	I	L	P	G	S	D	S	T	K	Y	V	E	K	F	K	V	K	A	T	F	T	A	D	T	S	S	N	T	A	Y	M	Q	
12A11		P	G	K	G	L	E	W	I	G	E	I	S	P	D	S	S	T	I	N	Y	T	P	S	L	K	D	K	F	V	I	S	R	D	N	A	K	N	T	A	Y	L	Q	
12B8		P	G	K	D	L	K	W	M	G	W	I	D	T	D	T	G	E	A	T	Y	T	D	P	F	K	G	R	F	V	F	S	R	E	T	S	A	S	T	A	Y	L	Q	
14C10		S	G	K	G	L	E	W	L	A	H	I	W	.	W	D	D	K	R	Y	N	P	A	L	K	S	R	L	T	I	S	K	D	T	S	R	N	Q	V	F	L	K		
8C5		P	G	K	G	L	E	W	L	G	V	I	W	.	S	G	G	S	T	D	Y	N	A	A	F	I	S	R	L	T	I	S	K	D	N	S	K	S	Q	V	F	F	K	
		CDR H3 – Contact																																										
		CDR H1 – Contact																																										
		CDR H3 – Kabat																																										
Нумерация по Kabat		82	82a	82b	82c	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	100a	100b	100c	100d	100e	100f	100g	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	
11F1		M	S	S	L	R	S	E	D	T	A	M	Y	Y	C	T	R	G	G	D	G	Y	A	L	.	.	.	.	.	.	.	D	Y	W	G	Q	G	T	S	V	T	V	S	A
6D12		L	T	S	L	T	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	A	F	T	T	V	F	.	.	.	.	.	.	.	.	A	Y	W	G	H	Q	T	M	V	T	V	S	A	
11D4		L	N	S	L	E	A	D	D	T	A	T	Y	Y	C	A	K	T	H	D	W	F	.	.	.	.	.	.	.	.	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	A	
8E1		L	S	S	L	T	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	S	R	A	L	G	N	G	Y	A	L	.	.	.	.	G	Y	W	G	Q	G	T	S	V	T	V	S	A	
46C3		F	N	S	L	T	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	T	S	Y	S	W	F	.	.	.	.	.	.	A	Y	W	G	Q	G	T	L	V	S	V	S	A	
8H7		L	S	G	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	F	C	V	R	L	G	V	M	V	Y	G	S	S	P	F	W	F	A	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	A	
21H3		L	S	G	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	F	C	V	R	L	G	V	M	V	Y	G	S	S	P	F	W	F	A	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	A	
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	.	.	.	.	D	Y	W	G	Q	G	T	S	V	T	V	S	A	
14E6		L	R	I	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	F	C	A	R	K	T	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	N	Y	W	G	Q	G	T	T	L	I	V	S	A		
14C6		L	S	S	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	F	C	A	R	R	G	Y	Y	D	A	A	W	F	.	.	.	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	A		
24A1		L	R	S	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	Y	C	T	R	E	G	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	N	Y	W	G	Q	G	T	T	L	T	V	S	A		
5F8		L	S	S	L	T	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	S	S	G	N	Y	G	A	M	.	.	.	.	.	D	Y	W	G	Q	G	T	S	V	T	V	S	A		
6C1		L	S	S	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	Y	C	A	R	G	G	Y	H	Y	P	G	W	L	.	.	.	V	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	A		
12A11		M	S	K	V	R	S	A	D	T	A	L	Y	Y	C	A	R	P	S	P	A	L	.	.	.	.	.	.	.	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	A		
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	.	.	.	.	P	Y	W	G	H	Q	T	L	V	T	V	S	A		
14C10		I	A	S	V	D	T	A	D	T	A	T	Y	F	C	A	R	I	D	G	I	Y	D	G	S	F	Y	A	M	.	D	Y	W	G	Q	G	T	S	V	T	V	S	A	
8C5		M	N	S	L	Q	T	T	D	T	A	I	Y	Y	C	A	R	D	Y	G	S	T	Y	V	D	A	I	.	.	D	Y	W	G	Q	G	T	S	V	T	V	S	A		

Фиг. 3В

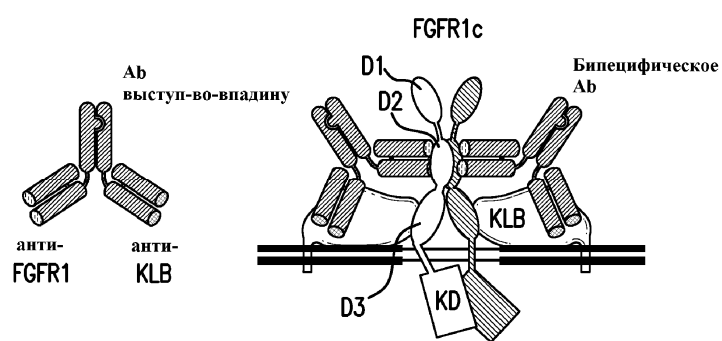


Фиг. 4

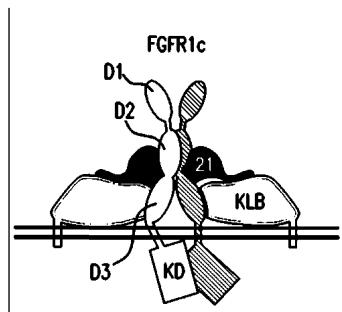


OD450 – оптическая плотность при 450 нм

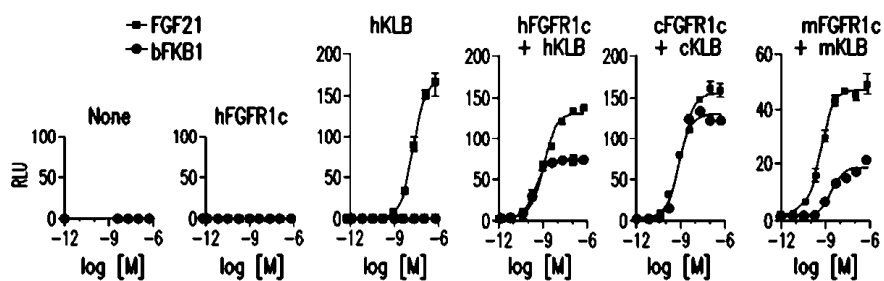
Фиг. 5



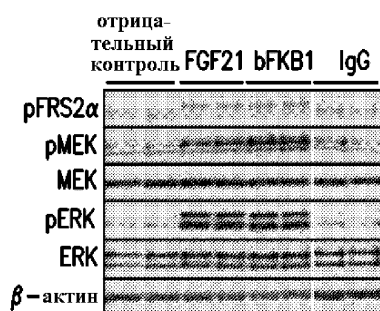
Фиг. 6А



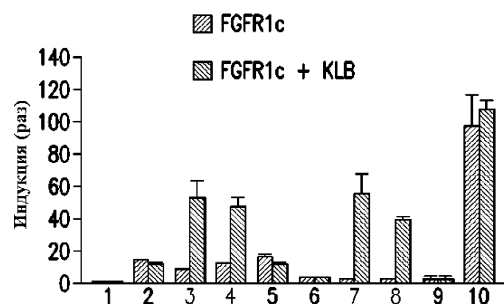
Фиг. 6В



Фиг. 6С

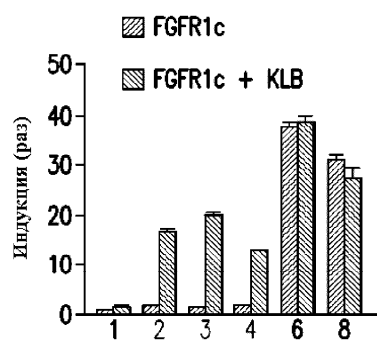


Фиг. 6D



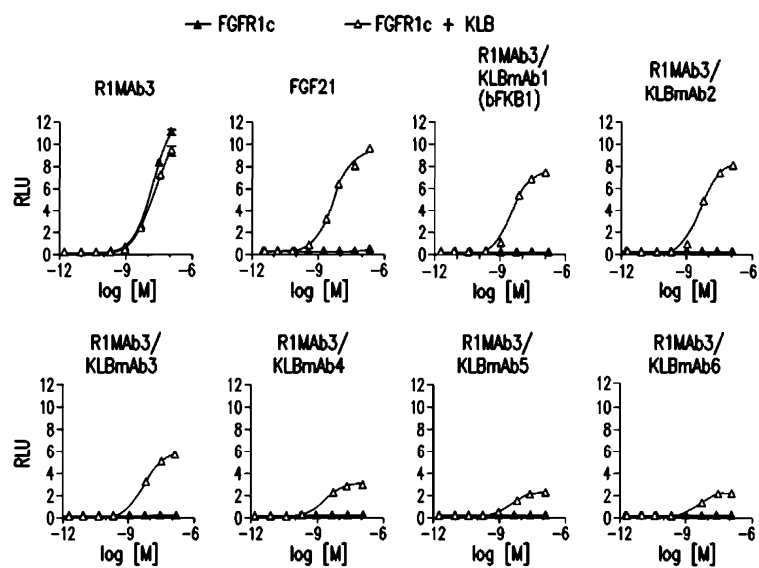
1. Имитация трансфекции
2. R1MAb1/трастузумаб
3. R1MAb1/KLBmAb1
4. R1MAb1/KLBmAb3
5. R1MAb1/KLBmAb7
6. R1MAb2/трастузумаб
7. R1MAb2/KLBmAb1
8. R1MAb2/KLBmAb3
9. R1MAb2/KLBmAb7
10. Очищенное R1MAb1 (133 нМ)

Фиг. 7A

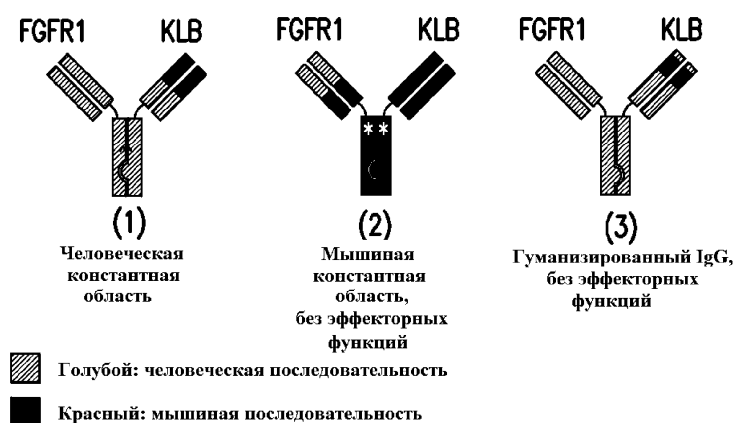


1. Имитация трансфекции
2. R1MAb3/KLBmAb1 (bFKB1)
3. R1MAb3/KLBmAb2
4. R1MAb3/KLBmAb3
5. Очищенное R1MAb3 (133 нМ)
6. Очищенное R1MAb2 (133 нМ)

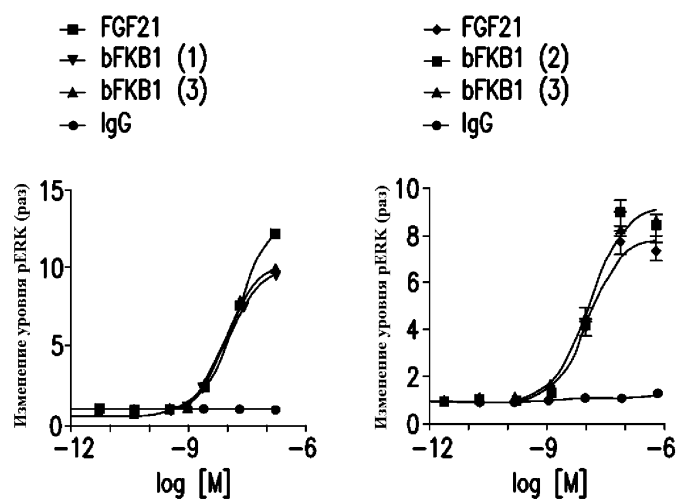
Фиг. 7B



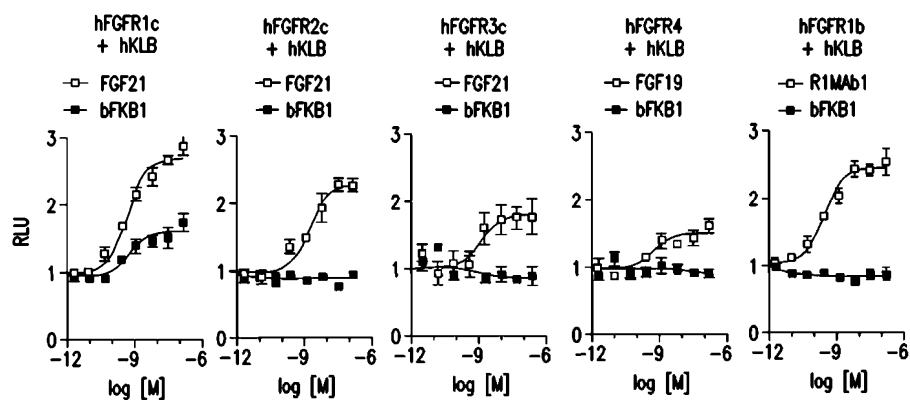
Фиг. 7С



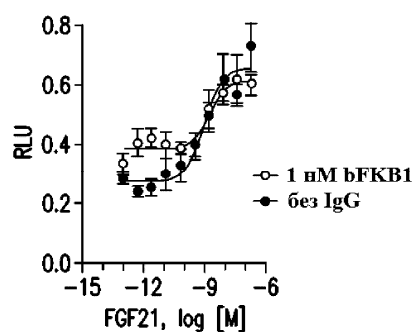
Фиг. 8А



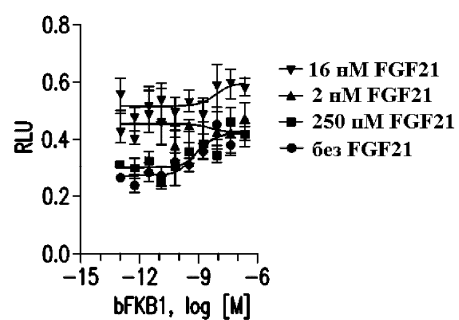
Фиг. 8В



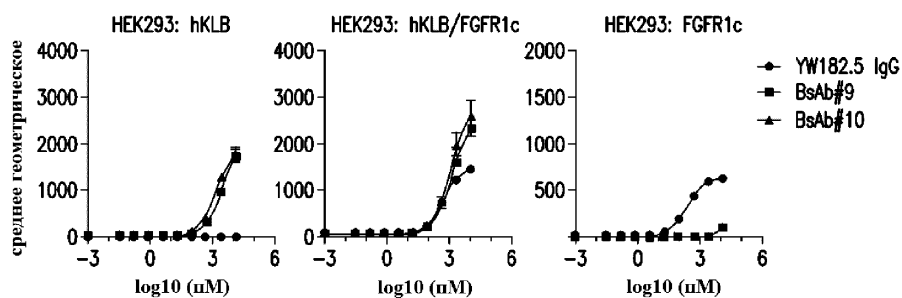
Фиг. 9А



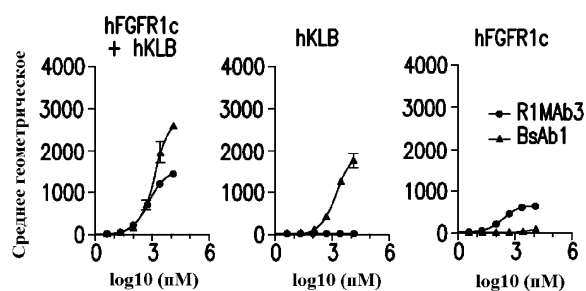
Фиг. 9В



Фиг. 9С



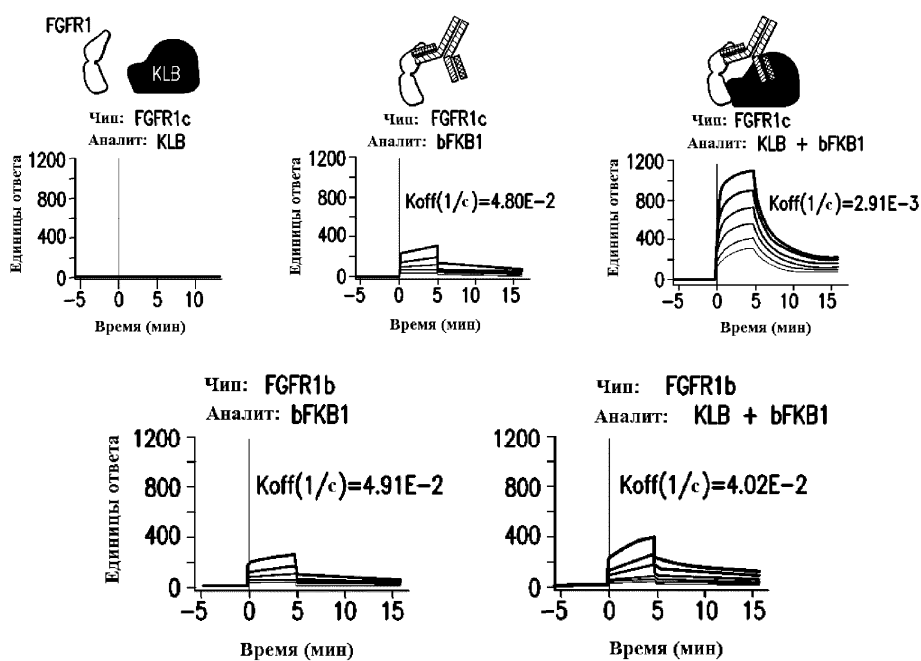
Фиг. 9D



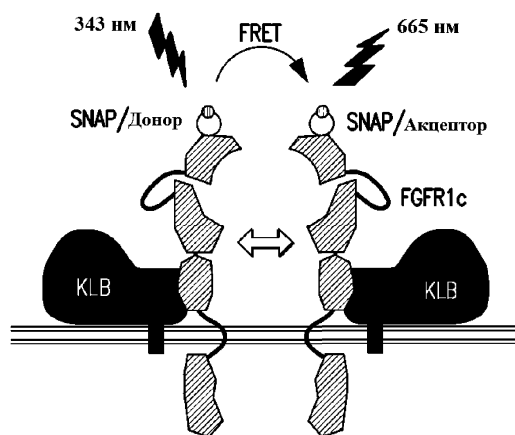
Фиг. 10А

FGFR1	Человеческий	Человеческий	(нет)	(нет)
KLB	Человеческий	(нет)	Человеческий	Мышиный
BsAb1	2.3 нМ	>300 нМ	6.6 нМ	15.5 нМ
FGF21	5.3 нМ	Нет данных	Нет данных	Нет данных

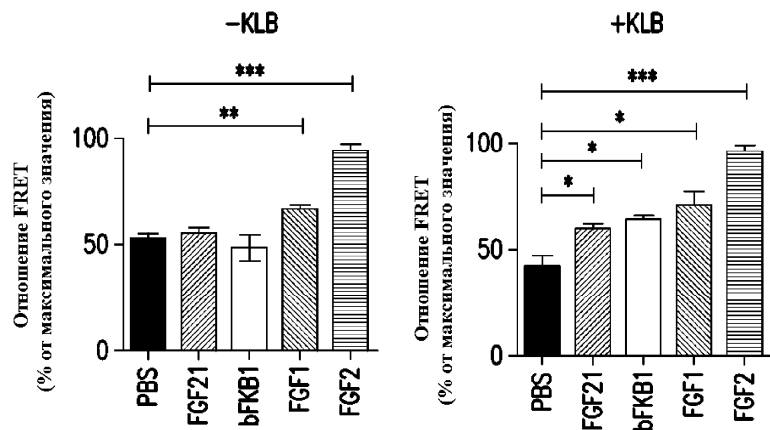
Фиг. 10В



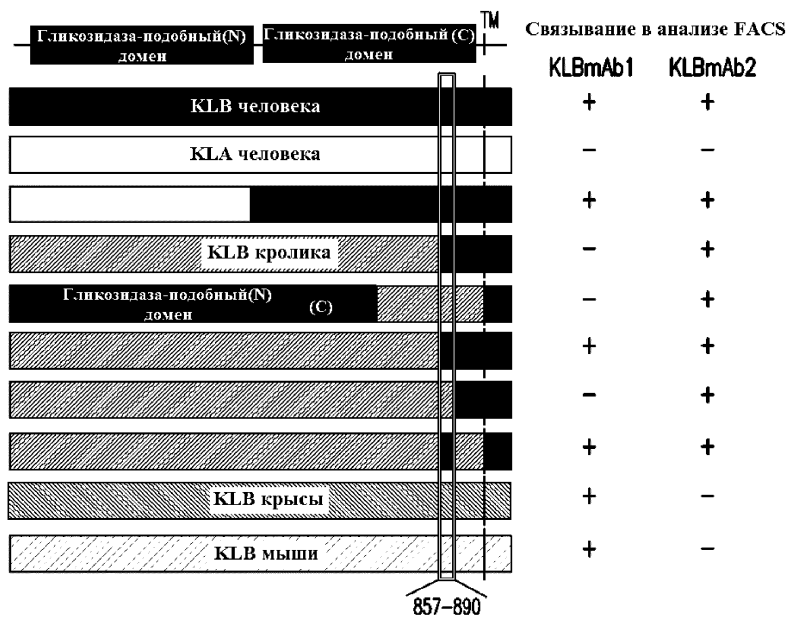
Фиг. 11



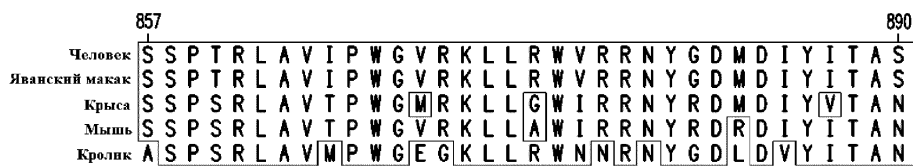
Фиг. 12А



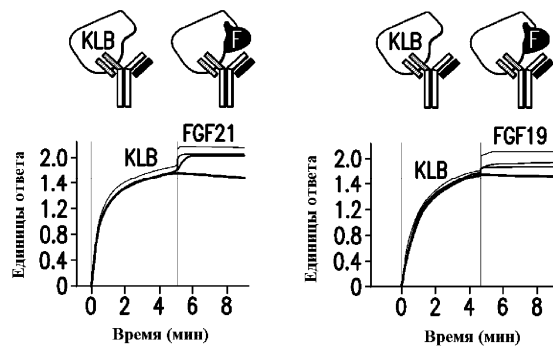
Фиг. 12В



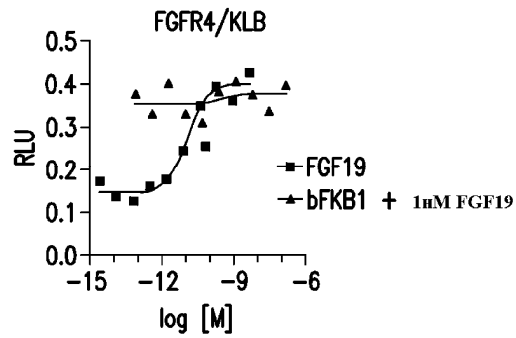
Фиг. 13А



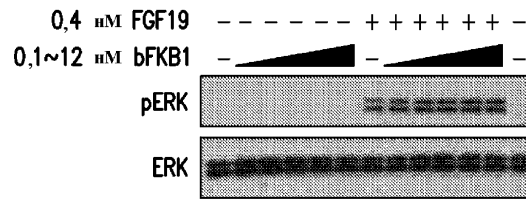
Фиг. 13В



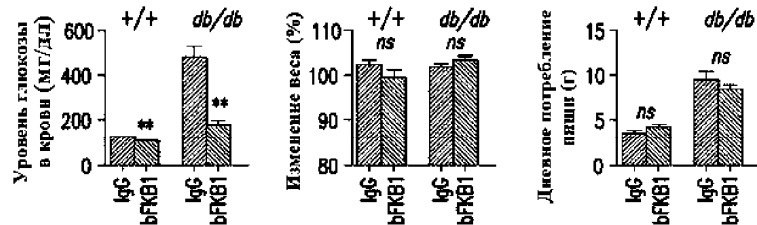
Фиг. 14А



Фиг. 14В

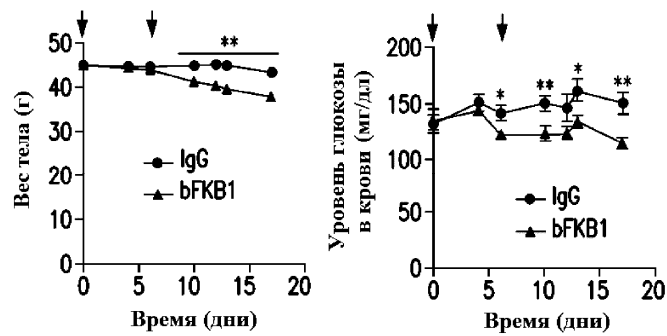


Фиг. 14С

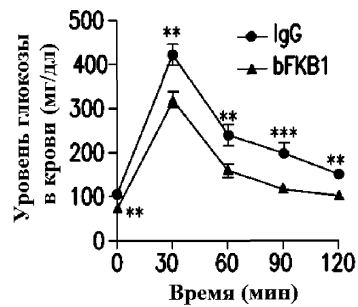


ns – Незначимое отличие

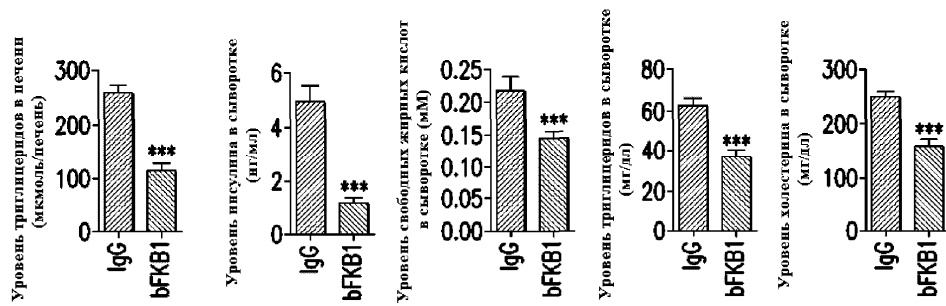
Фиг. 15А



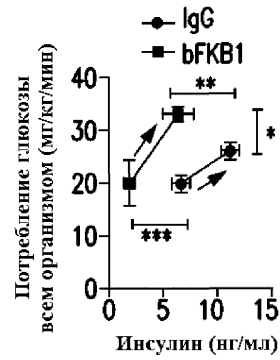
Фиг. 15В



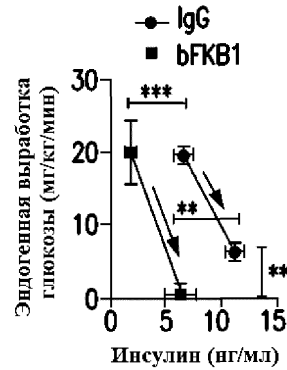
Фиг. 15С



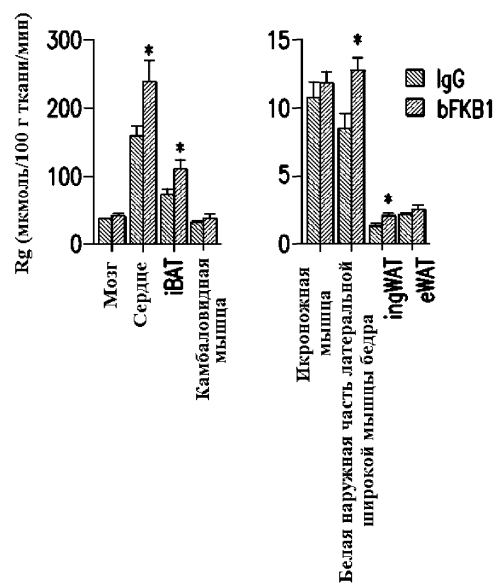
Фиг. 15D



Фиг. 15E



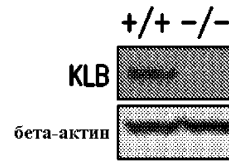
Фиг. 15F



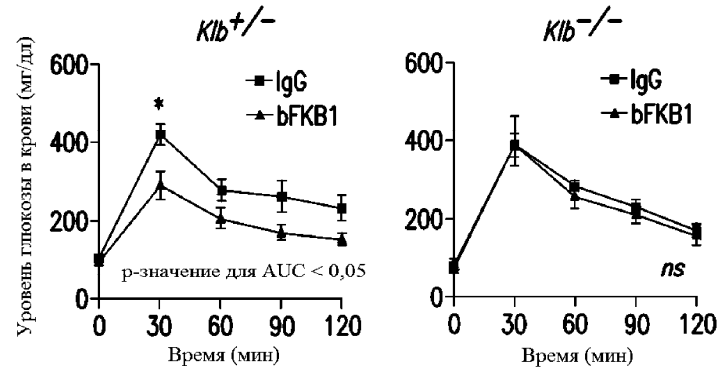
Фиг. 15G

дикий тип: F S G D G K A I W D K K Q Y V S P ...
нокаут: F S E T G K Q Y G I K N S T *

Фиг. 16А

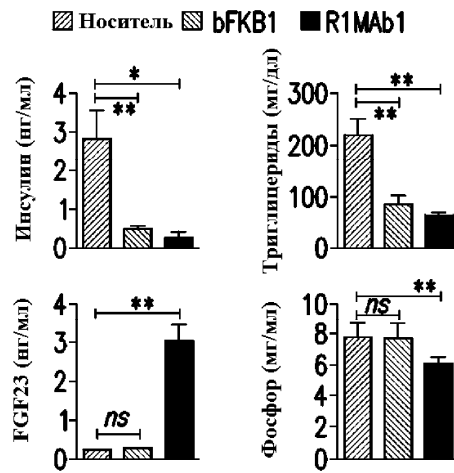


Фиг. 16В

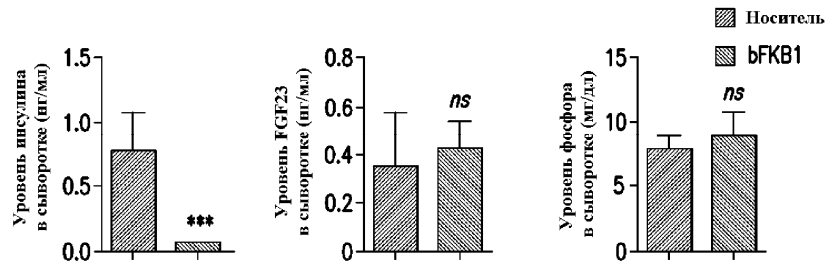


ns – Незначимое отличие

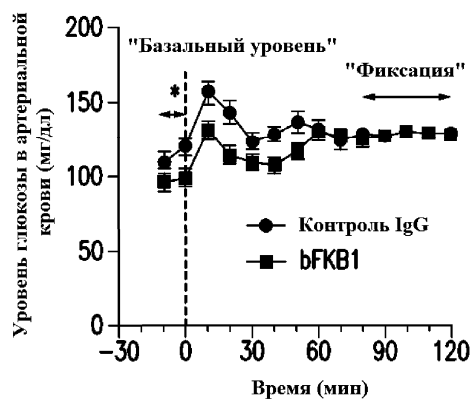
Фиг. 16С



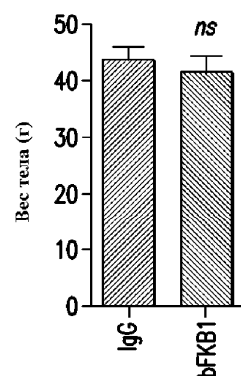
Фиг. 16D



Фиг. 17

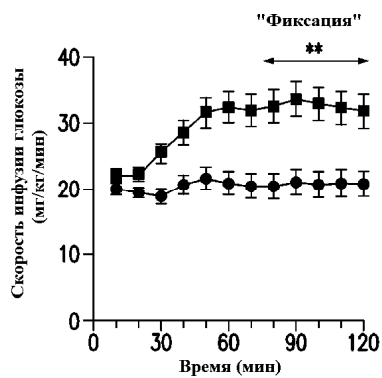


Фиг. 18А

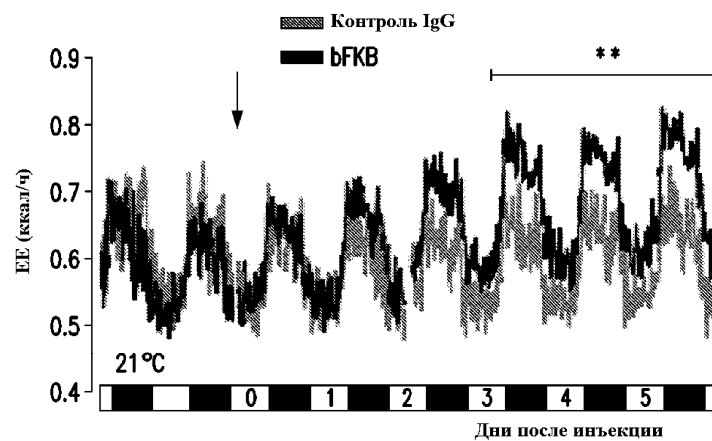


ns – Незначимое отличие

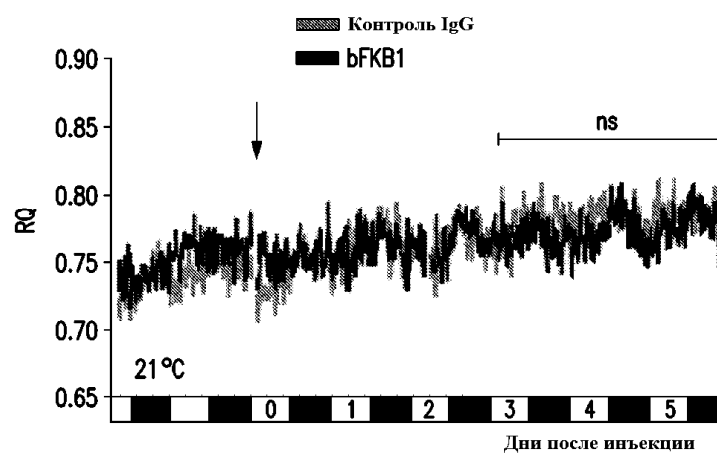
Фиг. 18В



Фиг. 18С



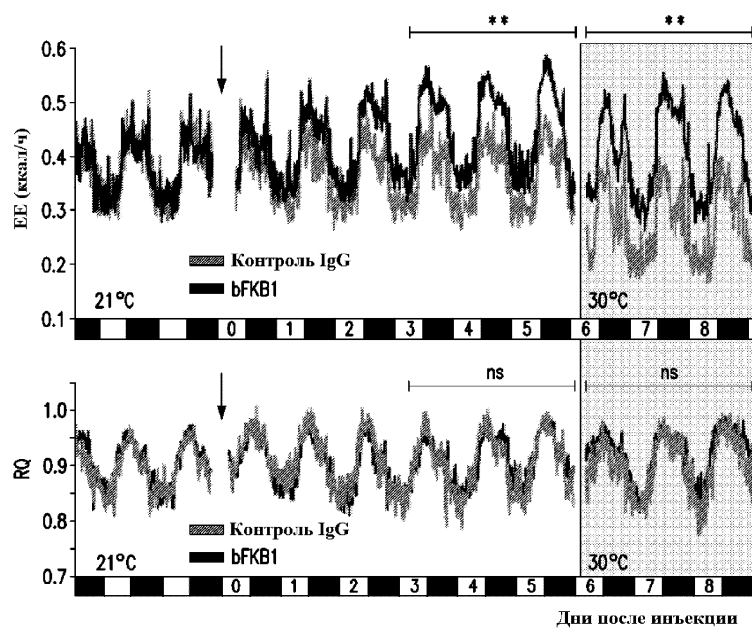
EE - потребление энергии



ns - Незначимое отличие

RQ - дыхательный коэффициент

Фиг. 19А

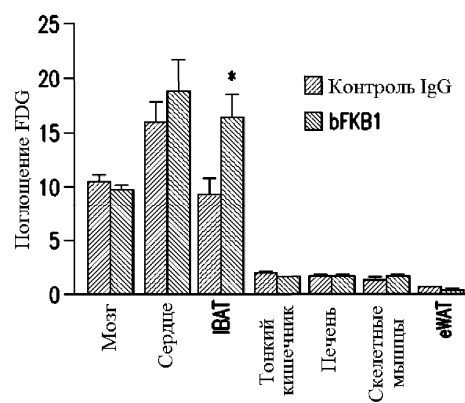


EE - потребление энергии

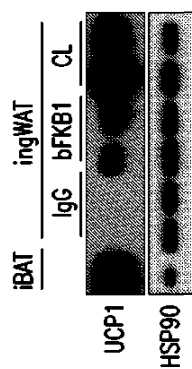
ns – Незначимое отличие

RQ - дыхательный коэффициент

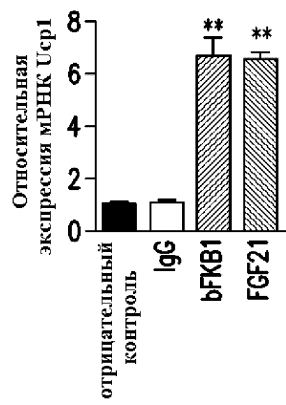
Фиг. 19В



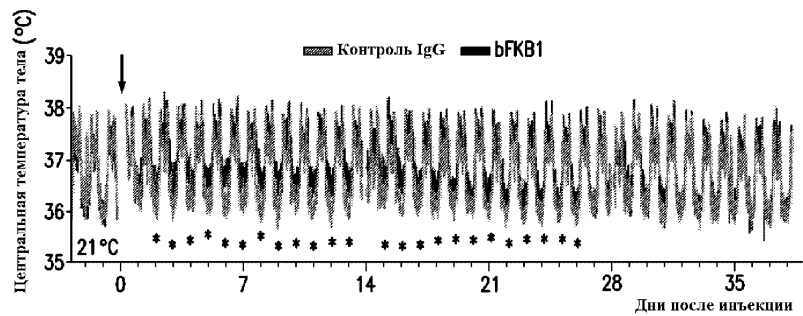
Фиг. 19С



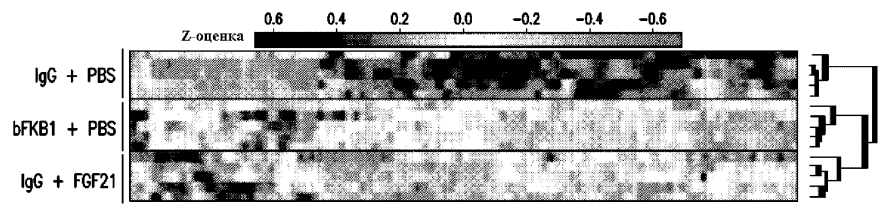
Фиг. 19D



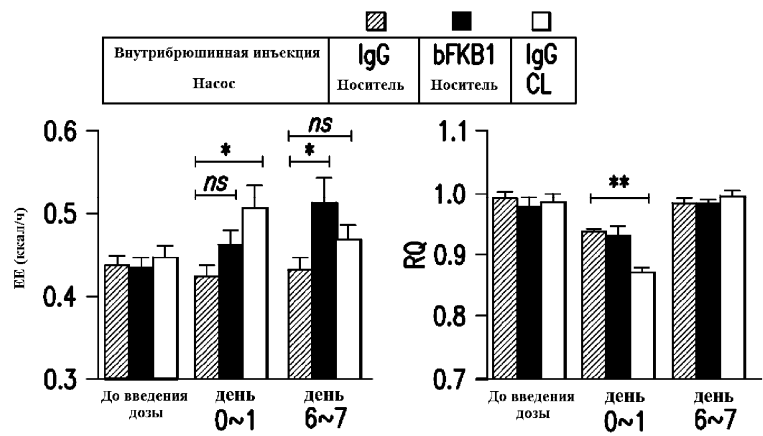
Фиг. 19E



Фиг. 19F



Фиг. 19G

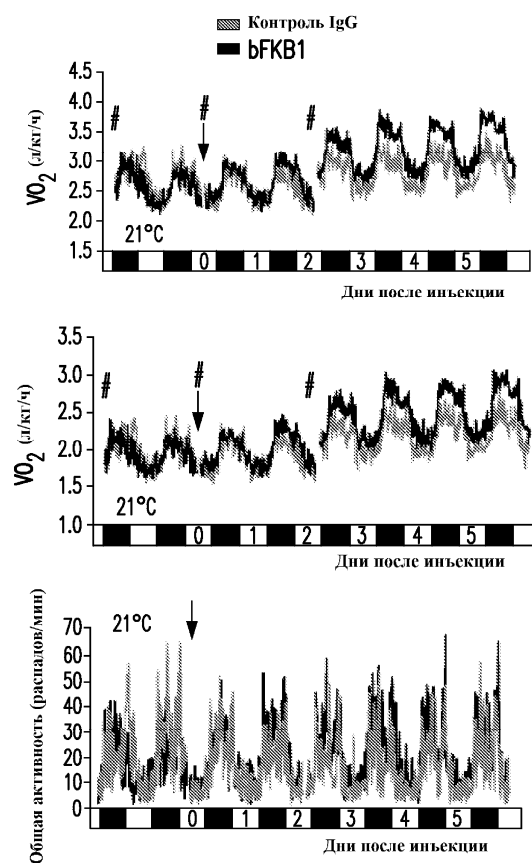


EE - потребление энергии

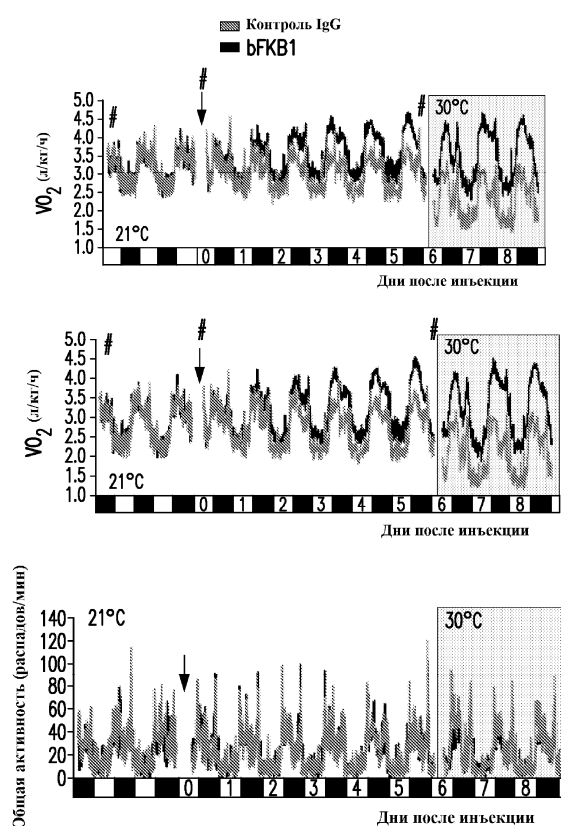
NS – Незначимое отличие

RQ - дыхательный коэффициент

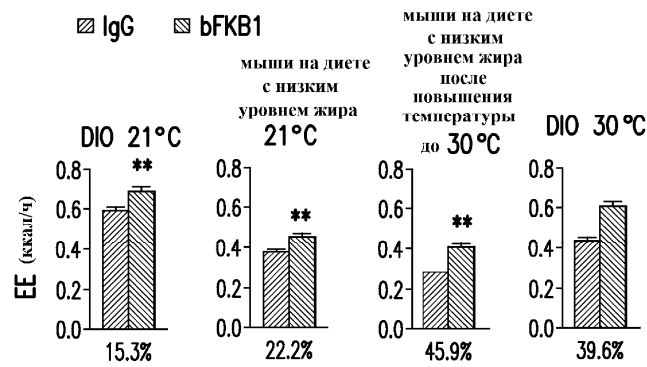
Фиг. 19H



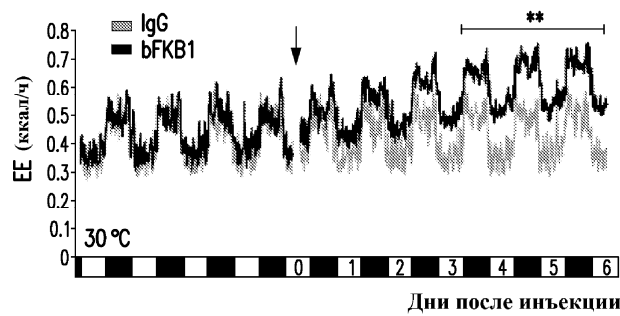
Фиг. 20А



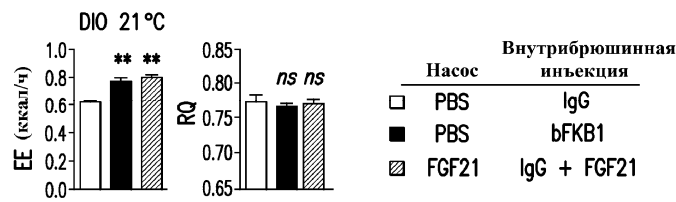
Фиг. 20В



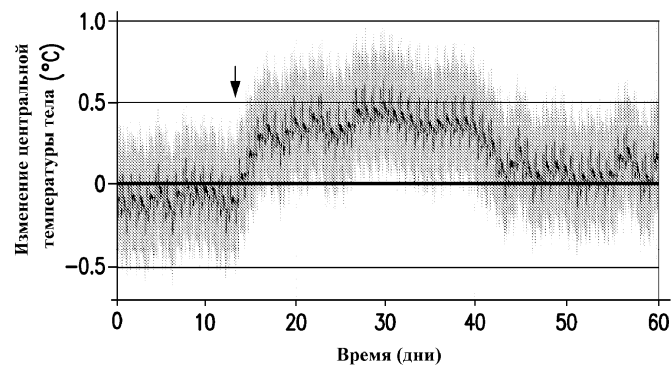
Фиг. 21А



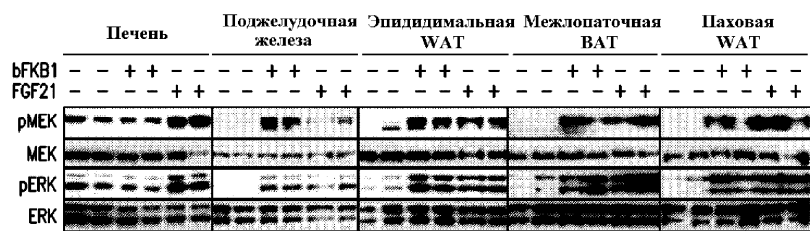
Фиг. 21В



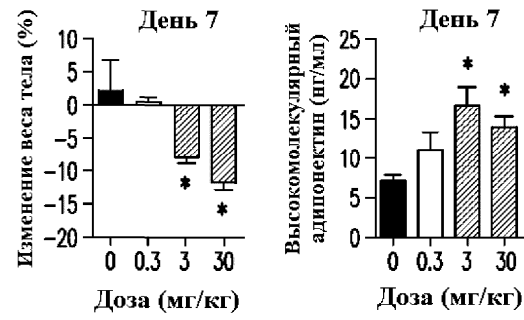
Фиг. 21С



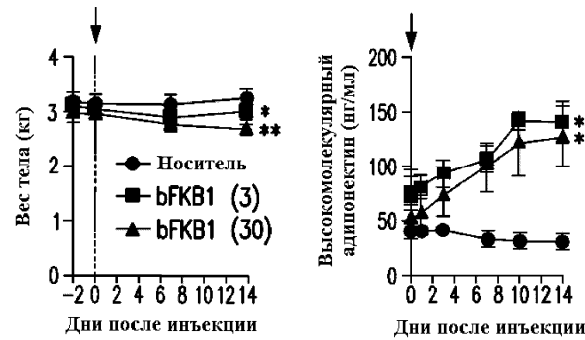
Фиг. 22



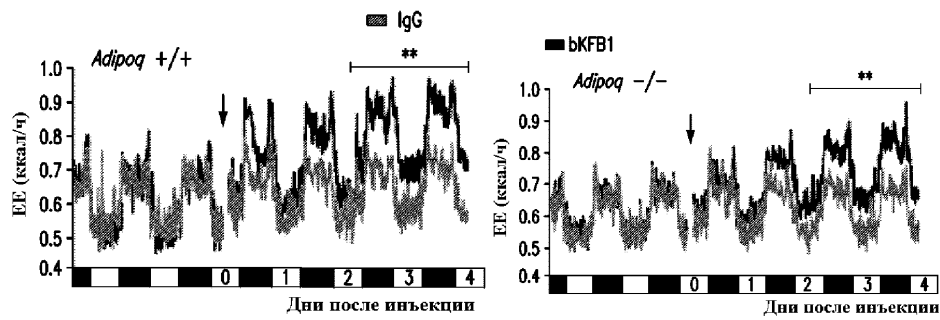
Фиг. 23



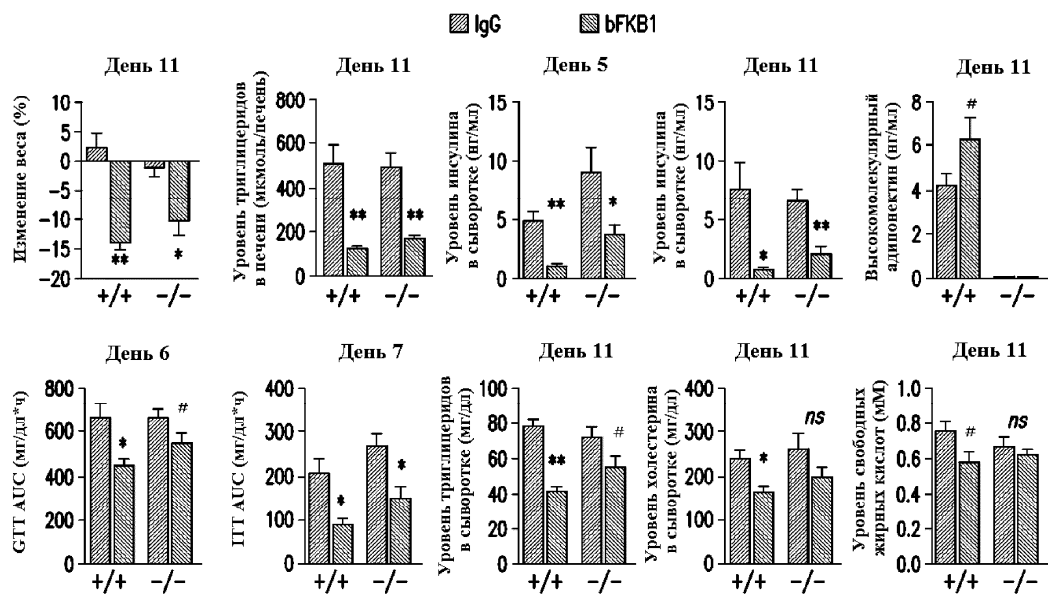
Фиг. 24А



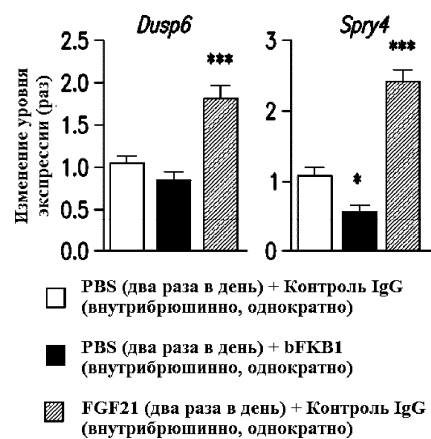
Фиг. 24В



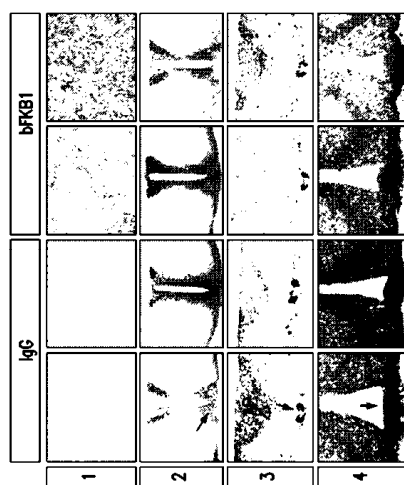
Фиг. 24С



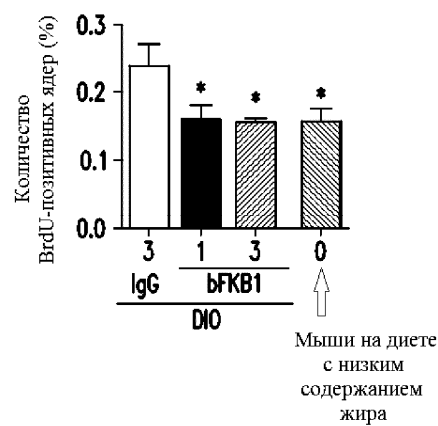
Фиг. 24D



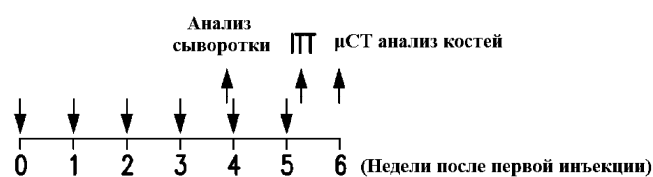
Фиг. 25



Фиг. 26



Фиг. 27



Фиг. 28А

	Контроль IgG	bFKB1 (1 мг/кг)	bFKB1 (3 мг/кг)	Контроль, получающий диету с низким содержанием жира
Изменение веса тела (%)	112.8 ± 1.1	116.6 ± 1.1	102.3 ± 4.7 *	
ITT AUC (ч*мг/кг)	226 ± 18	153 ± 15 *	156 ± 23 *	
Анализ сыворотки				
Инсулин (нг/мл)	3.87 ± 0.42	2.00 ± 0.54 *	1.37 ± 0.65 *	0.59 ± 0.60 ***
FGF21 (нг/мл)	824 ± 67	754 ± 65	696 ± 62 #	690 ± 60 *
Лептин (нг/мл)	46.5 ± 2.3	45.6 ± 2.1	32.9 ± 1.9 *	3.20 ± 1.8 ***
Высокомолекулярный адипопектин (нг/мл)	2802 ± 202	4174 ± 199	5667 ± 299 *	2745 ± 321 *
Общий холестерин (мг/дл)	240.6 ± 9.3	200.7 ± 9.4 **	177.4 ± 9.7 ***	74.6 ± 9.6 ***
Триглицериды (мг/дл)	41.3 ± 2.7	44.8 ± 2.8	31.9 ± 2.9 \$	57.69 ± 2.8 **
FFA (мМ)	1.01 ± 0.04	1.04 ± 0.04	0.81 ± 0.04 **	0.77 ± 0.03 **

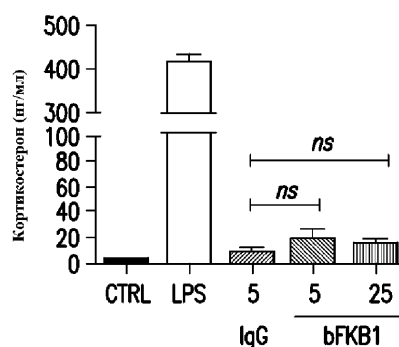
μСТ-анализ трабекулярного вещества кости

BV/TV	0.107 ± 0.006	0.114 ± 0.006	0.117 ± 0.010	0.136 ± 0.004 *
Плотность кости (мг HA/см³)	1028 ± 3	1026 ± 6	1033 ± 3	975 ± 6 ***
Объем кости (мм³)	0.286 ± 0.026	0.327 ± 0.025	0.330 ± 0.033	0.390 ± 0.017 *
Общий объем (мм³)	2.65 ± 0.09	2.86 ± 0.07	2.80 ± 0.10	2.87 ± 0.09
Число трабекул (мм⁻¹)	4.11 ± 0.04	4.08 ± 0.09	4.22 ± 0.13	4.73 ± 0.07 ***
Толщина трабекул (мм)	0.0517 ± 0.0009	0.0526 ± 0.0008	0.0528 ± 0.0014	0.0477 ± 0.0002 *
Расстояние между трабекулами (мм)	0.234 ± 0.003	0.235 ± 0.006	0.228 ± 0.008	0.202 ± 0.003 ***
Площадь поверхности костей (мм²)	13.6 ± 1.0	15.5 ± 1.0	15.3 ± 1.2	19.5 ± 0.9 **
BS/BV (мм⁻¹)	52.6 ± 1.7	51.3 ± 1.1	51.2 ± 2.1	53.5 ± 0.4

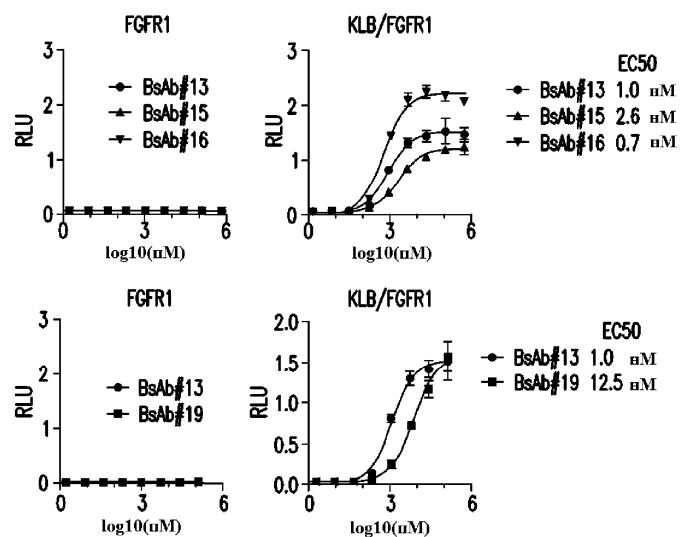
μСТ-анализ кортикального вещества кости

BV/TV	0.404 ± 0.005	0.391 ± 0.005	0.391 ± 0.006	0.393 ± 0.007
Плотность кости (мг HA/см³)	1236 ± 2	1239 ± 3	1240 ± 22	1243 ± 2 *
Объем кости (мм³)	2.55 ± 0.06	2.57 ± 0.06	2.46 ± 0.07	2.56 ± 0.09
Общий объем (мм³)	6.33 ± 0.17	6.6 ± 0.23	6.33 ± 0.26	6.52 ± 0.26
Толщина кости (мм)	0.119 ± 0.001	0.116 ± 0.001	0.115 ± 0.001 \$	0.115 ± 0.002
Объем костного мозга (мм³)	3.79 ± 0.12	4.05 ± 0.17	3.88 ± 0.22	3.98 ± 0.18

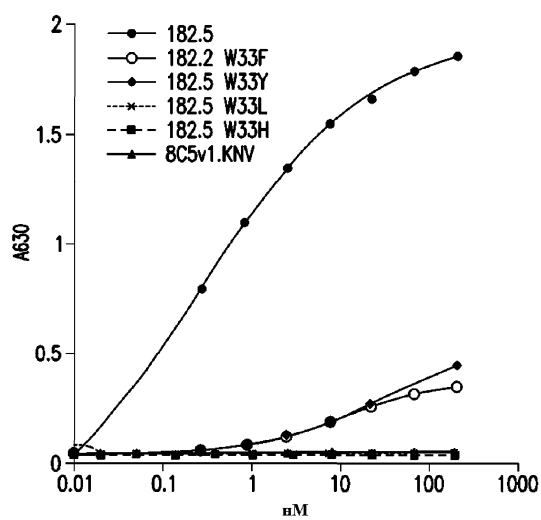
Фиг. 28В



Фиг. 29



Фиг. 30



Фиг. 31



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2