

抗生长分化因子 15 的抗体分子及其应用

技术领域

本发明涉及生物医药领域，具体而言，本发明涉及特异性结合生长分化因子 15 (growth differentiation factor 15, GDF15)的抗体分子及其抗原结合片段，以及所述抗体分子及其抗原结合片段的应用。

背景技术

生长分化因子 15 (growth differentiation factor 15, GDF15)是转化生长因子 β (trans-forming growth factor β , TGF β)超家族成员之一，在人体内负责调节食物摄入、能量消耗和体重以应对代谢和毒素引起的压力等。GDF15 的受体为胶质细胞源性神经营养因子(glial cell line derived neurotrophic factor, GDNF)家族受体 α 样(GDNF-family receptor α -like, GFRAL)蛋白，当与其受体 GFRAL 结合时，可以激活位于脑干后极区和孤束核的神经元，因为这些区域有其受体 GFRAL 的表达；然后它触发位于臂旁核和中央杏仁核内的神经元的激活，形成了对压力条件的进食反应。正是由于这些功能，GDF15 作为治疗肥胖症及相关代谢疾病的潜在疗法的靶标已引起人们的关注。

一直以来体内循环 GDF15 含量水平还与癌症、心力衰竭或慢性肾病患者的较低体重指数(BMI)和恶病质相关。最近研究的数据表明当其结合位于脑干区表达 GFRAL 的神经元及触发位于臂旁核和中央杏仁核内的神经元的激活后会导致食欲抑制，最终体重减轻。因此其成为治疗恶病质相关体重减轻及肥胖等疾病的潜在靶点。

发明内容

本发明要解决的技术问题是提供一种以高亲和力和特异性结合人生长分化因子 15 蛋白 (GDF15) 的新抗体，例如单克隆抗体，作为用于治疗诸如恶病质等疾病或症状的新治疗剂。

针对上述技术问题，本发明的目的是提供一种抗 GDF15 的抗体或其片段，并基于该抗体或其片段，提供其用途。本发明所述抗体分子的“片段”涵盖抗体的各种功能性片段，例如其抗原结合片段。

本发明提供以下技术方案。

一方面，本发明提供一种抗体或其抗原结合片段，所述抗体或其片段能够特异性结合 GDF15，特别是人 GDF15。根据本发明的具体实施方式，本发明的抗体为采用人 GDF15 的胞外区作为免疫原而得到的鼠抗体，以及基于所述鼠抗体得到的人源化抗体。

具体而言，本发明提供一种抗体或其片段，所述抗体或其片段包含重链可变区（VH）和轻链可变区（VL），其中所述重链可变区（VH）和轻链可变区（VL）包含选自以下的互补决定区（CDR）组合（H-CDR1、H-CDR2、H-CDR3；和，L-CDR1、L-CDR2、L-CDR3）：

(1) 依次示于 SEQ ID NO.23（TSGMGVG）、SEQ ID NO.24（HILWDDVKRYNPALKS）、SEQ ID NO.25（MAWDWFAY）的 H-CDR1、H-CDR2、H-CDR3；和，依次示于 SEQ ID NO.26（KASQNVD TNVA）、SEQ ID NO.27（SASYRSS）、SEQ ID NO.28（QQYHSYPT）的 L-CDR1、L-CDR2、L-CDR3；

(2) 依次示于 SEQ ID NO.23（TSGMGVG）、SEQ ID NO.29（HIRWDDVKRYNPALKS）、SEQ ID NO.25（MAWDWFAY）的 H-CDR1、H-CDR2、H-CDR3；和，依次示于 SEQ ID NO.30（KASQNVD TDVA）、SEQ ID NO.31（SASYRYS）、SEQ ID NO.32（HQYNSYPT）的 L-CDR1、L-CDR2、L-CDR3；

(3) 依次示于 SEQ ID NO.33（TAGMTVG）、SEQ ID NO.34（HIWWNDDKYYPALKS）、SEQ ID NO.35（IATMNYAMDY）的 H-CDR1、H-CDR2、H-CDR3；和，依次示于 SEQ ID NO.36（RASQSVSTSSFSYMH）、SEQ ID NO.37（YASNLES）、SEQ ID NO.38（QHSWEIPYT）的 L-CDR1、L-CDR2、L-CDR3；

(4) 依次示于 SEQ ID NO.39（TSGMGVD）、SEQ ID NO.40（HIYWDDDKRYNP SLKS）、SEQ ID NO.41（RAWDAMDY）的 H-CDR1、H-CDR2、H-CDR3；和，依次示于 SEQ ID NO.42（KARQNVGTNVA）、SEQ ID NO.31（SASYRYS）、SEQ ID NO.43（QQYNSYPYT）的 L-CDR1、L-CDR2、L-CDR3；

(5) 依次示于 SEQ ID NO.23（TSGMGVG）、SEQ ID NO.44（HIWWNDDKYYP SLKS）、SEQ ID NO.45（GAYDFFDY）的 H-CDR1、H-CDR2、H-CDR3；和，依次示于 SEQ ID NO.26（KASQNVD TNVA）、SEQ

ID NO.31 (SASYRYS)、SEQ ID NO.46 (QQYNTYPYT) 的 L-CDR1、L-CDR2、L-CDR3；和

(6) 依次示于 SEQ ID NO.47 (TSGIGIT)、SEQ ID NO.48 (TIWDDDDNRYNPSLKS)、SEQ ID NO.49 (SAWDWFAY) 的 H-CDR1、H-CDR2、H-CDR3；和，依次示于 SEQ ID NO.50 (KASQNVGTNVA)、SEQ ID NO.51 (SASYRNS)、SEQ ID NO.52 (QQYN SHPVT) 的 L-CDR1、L-CDR2、L-CDR3。

本发明提供的所述抗体或其片段为抗 GDF15、特别是人 GDF15 的抗体或其片段，其能够以高亲和力和特异性结合所述 GDF15。所述抗体或其片段包含的轻重链 CDR 的组合来自本发明的特定抗体（参见实施例部分），基于该特定抗体包含的可变区氨基酸序列，本领域技术人员可以常规地确定其中包含的 CDR。根据本发明的具体实施方式，采用 Kabat 以及任何其他定义方法例如 IMGT、ABM、Chotia 等都可划分该特定抗体的可变区氨基酸序列中的 CDR。因此，以本领域其他已知方法划分得到的轻重链 CDR 及其组合也被涵盖在本发明的范围内。

优选地，在本发明提供的抗体或其片段中，所述重链可变区可包含 SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 19 或 SEQ ID NO: 21 所示的氨基酸序列或与所述氨基酸序列具有至少 75% 同一性的氨基酸序列；和/或，所述轻链可变区可包含 SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 20 或 SEQ ID NO: 22 所示的氨基酸序列或与所述氨基酸序列具有至少 75% 同一性的氨基酸序列。本发明上下文中就序列所用的“至少 75% 同一性”为例如至少 80%、优选至少 85%、更优选至少 90%、进一步优选至少 91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或甚至 99% 同一性等 $\geq 75\%$ 的任何百分比的同一性。

进一步优选地，在本发明提供的所述抗体或其片段中，所述重链可变区和轻链可变区分别包含：

(1) SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列或与所述氨基酸序列具有至少 75% 同一性的氨基酸序列；和，SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列或与所述氨基酸序列具有至少 75% 同一性的氨基酸序列；

(2) SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列或与所述氨基酸序列具有至少 75%

同一性的氨基酸序列；和，SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列或与所述氨基酸序列具有至少 75%同一性的氨基酸序列；

(3) SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列或与所述氨基酸序列具有至少 75%同一性的氨基酸序列；和，SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列或与所述氨基酸序列具有至少 75%同一性的氨基酸序列；

(4) SEQ ID NO: 13 所示的氨基酸序列或与所述氨基酸序列具有至少 75%同一性的氨基酸序列；和，SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列或与所述氨基酸序列具有至少 75%同一性的氨基酸序列；

(5) SEQ ID NO: 15 所示的氨基酸序列或与所述氨基酸序列具有至少 75%同一性的氨基酸序列；和，SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列或与所述氨基酸序列具有至少 75%同一性的氨基酸序列；

(6) SEQ ID NO: 17 所示的氨基酸序列或与所述氨基酸序列具有至少 75%同一性的氨基酸序列；和，SEQ ID NO: 18 所示的氨基酸序列或与所述氨基酸序列具有至少 75%同一性的氨基酸序列；

(7) SEQ ID NO: 19 所示的氨基酸序列或与所述氨基酸序列具有至少 75%同一性的氨基酸序列；和，SEQ ID NO: 20 所示的氨基酸序列或与所述氨基酸序列具有至少 75%同一性的氨基酸序列；

(8) SEQ ID NO: 21 所示的氨基酸序列或与所述氨基酸序列具有至少 75%同一性的氨基酸序列；和，SEQ ID NO: 22 所示的氨基酸序列或与所述氨基酸序列具有至少 75%同一性的氨基酸序列。

特别地，本发明的抗体或其片段至少包含重链可变区和轻链可变区，二者均包括上文所述的 CDR 以及间隔的框架区(framework region)，所包含好的结构域的排列方式为：FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。进一步可选地，所述“至少 75%同一性”导致的氨基酸序列上的至多 25%差异可存在于重链可变区或轻链可变区的任意框架区中，或者存在于本发明的抗体或其片段中重链可变区和轻链可变区以外的任意结构域或序列中。所述差异可以由任何位置的氨基酸缺失、添加或置换产生。

本发明提供的抗体为结合 GDF15、特别是人 GDF15 的鼠抗、嵌合抗体或者完全或部分人源化抗体；所述片段为半抗体或者所述抗体的抗原结合片段，包括 scFv、dsFv、(dsFv)₂、Fab、Fab'、F(ab')₂ 或 Fv 片段。优选地，所述抗体为单克隆抗体或单链抗体。

除了可变区之外，所述抗体或其片段还包含人或鼠的恒定区，优选包含人或鼠的重链恒定区(CH)和/或轻链恒定区(CL)；优选地，所述抗体或其片段包含重链和轻链；更优选地，所述抗体或其片段包含选自 IgG、IgA、IgM、IgD 或 IgE 的重链恒定区和/或 κ 或 λ 型轻链恒定区。根据本发明的具体实施方式，所述抗体为单克隆抗体，优选为鼠、嵌合或人源化的单克隆抗体。根据本发明的具体实施方式，所述单克隆抗体为 IgG，特别是 IgG1。

进一步优选地，本发明提供的抗体或其片段包含重链恒定区，所述重链恒定区包含 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列或与所述氨基酸序列具有至少 75% 同一性的氨基酸序列；和/或包含轻链恒定区，所述轻链恒定区包含 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列或与所述氨基酸序列具有至少 75% 同一性的氨基酸序列。或者，所述重链恒定区包含 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列或与所述氨基酸序列具有至少 75% 同一性的氨基酸序列；和/或包含轻链恒定区，所述轻链恒定区包含 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列或与所述氨基酸序列具有至少 75% 同一性的氨基酸序列。

另一方面，本发明还提供一种核酸分子，其包含编码本发明所述的抗体或其片段的核苷酸序列，或者包含编码所述抗体或其片段中包含的重链 CDR、轻链 CDR、轻链可变区、重链可变区、重链或轻链的核苷酸序列。

再一方面，本发明提供包含上文所述的核酸分子的载体。所述载体可以为真核表达载体、原核表达载体、人工染色体及噬菌体载体等。

又一方面，本发明提供包含上文所述的核酸分子或载体的宿主细胞，或者被上文所述的核酸分子或载体转化或转染的宿主细胞。宿主细胞可以是任何原核或真核细胞，例如细菌或昆虫、真菌、植物或动物细胞。

本发明提供的抗体或其片段可以利用本领域已知的任何方法获得。例如，在允许本发明提供的宿主细胞表达所述抗体的重链可变区和/或轻链可变区或者所述抗体的重链和/或轻链以组装成所述抗体的情况下，培养所述宿主细胞。任选地，所述方法还包括回收产生的抗体的步骤。

另一方面，本发明还提供一种组合物，所述组合物包含本发明所述的抗体或其片段、核酸分子、载体和/或宿主细胞。优选地，所述组合物为药物组合物，其还任选地包含药学上可接受的载体、辅料或赋形剂。

本发明提供的抗体或其片段、核酸分子、载体、宿主细胞和/或组合物具有增加受试者的食欲、食物摄入、体重、肌肉质量等中的一种或多种的活

性，同时也具有抗肿瘤的作用。因此，本发明还提供以下技术方案。

再一方面，本发明还提供所述抗体或其片段、核酸分子、载体、宿主细胞和/或组合物在制备用于治疗疾病或病症的药物中的用途，所述疾病或病症是由GDF15的表达介导的或与所述GDF15的表达相关；和/或，所述疾病或病症为肿瘤（例如癌症）、心力衰竭、慢性肾病、厌食、少肌症或恶病质。

因此相应地，本发明还提供一种治疗疾病或病症的方法，所述方法包括给有此需要的受试者施用本发明提供的抗体或其片段、核酸分子、载体、宿主细胞和/或组合物，所述疾病或病症是由 GDF15 的表达介导的或与所述 GDF15 的表达相关；和/或，所述疾病或病症为肿瘤（例如癌症）、心力衰竭、慢性肾病、厌食、少肌症或恶病质。

优选地，所述受试者为哺乳类动物；更优选地，所述受试者为人。

本发明还提供一种检测或诊断疾病或病症的方法，所述方法包括使本发明的抗体分子或其片段、核酸分子、载体、宿主细胞和/或组合物与来自受试者的样品相接触，所述疾病或病症是由 GDF15 的表达介导的或与所述 GDF15 的表达相关；或者，所述疾病或病症为肿瘤（例如癌症）、心力衰竭、慢性肾病、厌食、少肌症或恶病质。优选地，所述受试者为哺乳类动物；更优选地，所述受试者为人。

此外，本发明提供包含所述抗体或其片段、核酸分子、载体、宿主细胞和/或组合物的试剂盒。所述试剂盒用于上文所述的治疗或者检测或诊断。可选地，所述试剂盒还可包括使用说明书。

本发明提供了一种人 GDF15 的新型抗体，其可以以高亲和力和特异性结合人 GDF15，阻断 GDF15 与其受体 GFRAL 的相互作用。实验证明，本发明提供的抗体相比于已知同类抗体，具有更高的 GDF15 亲和力和特异性、更长的体内半衰期、更优的阻断效果。

附图说明

以下，结合附图来详细说明本发明的实施方案，其中：

图 1 显示了杂交瘤细胞培养上清与人 GDF15 结合的 ELISA 检测结果。

图 2 显示了杂交瘤细胞培养上清与猴 GDF15 结合的 ELISA 检测结果。

图 3 显示了杂交瘤细胞培养上清阻断 GDF15 与其受体 GFRAL 结合的 ELISA 检测结果。

图 4 显示了抗体与人 GDF15 结合的 ELISA 检测结果。

图 5 显示了抗体与猴 GDF15 结合的 ELISA 检测结果。

图 6 显示了抗体阻断 GDF15 与其受体 GFRAL 结合的 ELISA 检测结果

图 7 显示了抗体在 PBS 和血浆中放置后与人 GDF15 结合的 ELISA 检测结果。

图 8 显示了抗体阻断 GDF15 与其受体 GFRAL 结合的竞争性 ELISA 检测结果。

图 9 显示了在表达 GFRAL 的报告细胞上检测抗体阻断 GDF15 功能的检测结果。

图 10 显示了在表达 GFRAL 的报告细胞上检测抗体中和 GDF15 的检测结果；其中 10-1: Ponsegromab; 10-2: 53E5(hz)。

图 11 显示了抗体与 GDF15、GDF1、GDF3 的结合特异性的检测结果。

图 12 显示了抗体与 PBMC 的结合特异性的检测结果。

图 13 显示了抗体在小鼠体内的 PK 实验结果；其中 13-1: AV380-hIgG1; 13-2: Ponsegromab; 13-3: 53E5(hz)。

图 14 显示了在小鼠中检测的抗体的恶病质抑制效果。

图 15 显示了在小鼠中检测的抗体中和 GDF15 的效果。

实施发明的最佳方式

以下参照具体的实施例来说明本发明。本领域技术人员能够理解，这些实施例仅用于说明本发明，其不以任何方式限制本发明的范围。

下述实施例中的实验方法，如无特殊说明，均为常规方法。下述实施例中所用的原料、试剂材料等，如无特殊说明，均为市售购买产品。

实施例 1 杂交瘤细胞的制备

用包含 GDF15 蛋白 (Genbank 登记号 NM_004864.3) 的胞外区与小鼠 IgG2a-FC (Genbank 登记号 AAH31470.1) 的融合蛋白作为免疫原免疫小鼠。佐剂采用 Quick Antibody-Mouse 5W 水溶性佐剂，加强免疫以后 2 周测效价，选取效价高的小鼠进行免疫冲击，3 天之后取小鼠血清；小鼠解剖后取脾脏，分离脾细胞。

将脾细胞与培养的骨髓瘤细胞进行融合，铺 96 孔板，同时加入选择性

培养基进行筛选，7天后换液，10天后进行ELISA检测，选择OD值大于阴性对照10倍以上的再进行流式细胞仪检测。

挑选双阳的细胞，通过细胞有限稀释法进行亚克隆铺板，挑选单克隆细胞。将挑选出的单克隆细胞，取培养上清，进行ELISA检测及流式细胞术检测，挑选双阳的细胞扩大培养。Protein G重力柱亲和层析纯化细胞上清，获得杂交瘤抗体。

实施例2 杂交瘤抗体与人GDF15结合的ELISA检测

把包含人GDF15蛋白（Genbank登记号NM_004864.3）的胞外区与人的IgG1-FC（Genbank登记号CAC20454.1）的融合蛋白用包被液稀释至1μg/ml，然后以50μl/孔加入酶标板孔中，置4℃过夜。弃去孔内的液体，同时用洗涤液洗板3次，每次3-5分钟，拍干。每孔加入200μl封闭液4℃过夜。用洗涤液洗板3次，此时包被板可在-20℃或4℃保存备用。

向孔中分别加入待检抗体（来自杂交瘤的纯化后抗体，命名见表1）、阳性参考抗体AV380-mIgG1（序列来自Aveo Oncology；重链和轻链可变区分别见SEQ ID NO.1和SEQ ID NO.2；重链和轻链恒定区分别见SEQ ID NO.3和SEQ ID NO.4）以及空白对照（PBS），抗体按照20ug/mL起始，3.16倍稀释，10个梯度。在37℃孵育1小时，洗涤，拍干。然后向每孔中加入酶标二抗，为1:10000稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠IgG（SIGMA，货号A9044-2ml），每孔100μl，37℃孵育2小时，洗涤，拍干。向每孔中加入新鲜配制的底物显色液TMB 100μl，37℃孵育30分钟。

AV380-mIgG1序列如下：

重链可变区 VH（SEQ ID NO.1）：

EVLLQQSGPELVKPGASVKIPCKASGYTFTDYNMDWVKQSHGKSLEWIG
QINPNNGGIFFNQKFKGKATLTVDKSSNTAFMEVRSLTSED TAVYYCARE
AITTVGAMDYWGQGTSVTVSS

轻链可变区 VL（SEQ ID NO.2）：

DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRTSEN LHNYLAWYQQKQKGKSPQLLVYD
AKTLADGVPSRFSGSGSGTQYSLKINS LQPEDFGSYCYCHFWSSPYTFGG
GTKLEIK

重链恒定区（SEQ ID NO.3）：

AKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSG
VHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPR
DCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQF
SWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVN
SAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPED
ITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLVQKSNWEAGNTFT
CSVLHEGLHNHHTEKSLSHSPGK

轻链恒定区 (SEQ ID NO.4):

RADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQN
GVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVK
SFNRNEC

加入 2mol/L H₂SO₄ 终止反应，在酶联免疫阅读器上读取 OD 值。结果见表 1-1、表 1-2 和图 1 中的 1-1 和 1-2。

表 1-1 杂交瘤抗体与人 GDF15 结合的 ELISA 检测结果

样品	EC50 (μg/ml)
AV380-mIgG1	0.03134
50G3	0.05563
53E5	0.04546
53D10	0.06025
53A8	0.03780

表 1-2 杂交瘤抗体与人 GDF15 结合的 ELISA 检测结果

样品	EC50 (μg/ml)
AV380-mIgG1	0.02958
2A2	0.04602
34G9	0.1094

实施例 3 杂交瘤抗体与猴 GDF15 (cynoGDF15)结合的 ELISA 检测
实验过程参照实施例 2, 不同之处在于, 将融合蛋白替换为包含猴 GDF15

蛋白 (Genbank 登记号 EHH29815.1) 的胞外区与人的 IgG1-FC (Genbank 登记号 CAC20454.1) 的融合蛋白。结果见表 2-1、表 2-2 和图 2 中的 2-1 和 2-2。

表 2-1 杂交瘤抗体与猴 GDF15 结合的 ELISA 检测结果

样品	EC50 (μg/ml)
AV380-mIgG1	0.01459
50G3	0.07697
53E5	0.04539
53D10	0.05550
53A8	0.06765

表 2-2 杂交瘤抗体与猴 GDF15 结合的 ELISA 检测结果

样品	EC50 (μg/ml)
AV380-mIgG1	0.02577
2A2	0.08271
34G9	0.1574

实施例 4 杂交瘤抗体阻断 GDF15 与其受体 GFRAL 结合的 ELISA 检测

把包含 GFRAL 蛋白 (Genbank 登记号 NM_207410.2) 的胞外区与人的 IgG1-FC (Genbank 登记号 CAC20454.1) 的融合蛋白用包被液稀释至 1μg/ml, 然后以 50μl/孔加入酶标板孔中, 置 4℃过夜。弃去孔内的液体, 同时用洗涤液洗 3 次, 每次 3-5 分钟, 拍干。每孔加入 200μl 封闭液 4℃过夜。用洗涤液洗 3 次, 此时包被板可在 -20℃或 4℃保存备用。

向孔中分别加入待检抗体、阳性参考抗体 AV380-mIgG1 以及空白对照 (PBS), 抗体按照 20μg/mL 起始, 3.16 倍稀释, 10 个梯度。同时加入 GDF15-mFC 蛋白 (GDF15: Genbank 登记号 NM_004864.3; mFC: Genbank 登记号 AAH31470.1), 按照 20ng/孔, 与待测抗体混匀。在 37℃孵育 1 小时, 洗涤, 拍干。然后向每孔中加入酶标二抗, 为 1:10000 稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠 IgG (SIGMA, 货号 A9044-2ml), 每孔 50-100μl, 37℃孵

育 2 小时，洗涤，拍干。向每孔中加入新鲜配制的底物显色液 TMB 100 μ l，37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟。加入 2mol/L H₂SO₄ 终止反应，在酶联免疫阅读仪上读取 OD 值。

结果见表 3-1、表 3-2 和图 3 中的 3-1 和 3-2。

表 3-1. 杂交瘤抗体阻断 GDF15 与其受体 GFRAL 结合的 ELISA 检测结果

样品	IC50 (μ g/ml)
AV380-mIgG1	0.1977
50G3	0.2318
53E5	0.1862
53D10	0.2126
53A8	0.2046

表 3-2. 杂交瘤抗体阻断 GDF15 与其受体 GFRAL 结合的 ELISA 检测结果

样品（以杂交瘤细胞编号示出）	IC50 (μ g/ml)
AV380-mIgG1	0.1395
2A2	0.08984
34G9	0.09157

上述鼠抗的可变区序列如下（其中重链和轻链 CDR 以加粗和下划线示出，其根据 Kabat 定义方法得到）：

A1（鼠抗 53E5）

>53E5-H（VH/HCDR-1/HCDR-2/HCDR-3：SEQ ID NO.7/23/24/25）

QVQLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLST**TSGMGVGV**WIRQPSGKGLEWL
AHILWDDVKRYNPALKSRLTISKDSSNSQIFLKIASVDTADTATYYCVQ
MAWDWFAYWGQGTLVTVSA

>53E5-L（VL/LCDR-1/LCDR-2/LCDR-3：SEQ ID NO.8/26/27/28）

DIVMTQAQKFMSTSVEDRVSVT**CKASQNVDTNVA**WYQQKPGQSPKALI
 Y**SASYSRSSG**VPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYFC**QQYHSYPT**FG
 GGTKLEIK

A2 (鼠抗 53A8)

>53A8-H (VH/HCDR-1/HCDR-2/HCDR-3: SEQ ID NO.9/23/29/25)

QVQLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLST**TSGMGVGV**WIRQPSGKGLEWL
AHIRWDDVKRYNPALKSRLTISKDTSSSQIFLKIASVDTADTATYYCAQ
MAWDWFAYWGQGTLLTVSA

>53A8-L (VL/LCDR-1/LCDR-2/LCDR-3: SEQ ID NO.10/30/31/32)

DIVMTQAQKFMSTSVGDRVSVTC**KASQNVDTDVA**WYQQKPGQSPKALI
Y**SASYRYS**GVPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQSEDLAEYFC**HQYNSYPT**FG
GGTKLEIK

A3 (鼠抗 34G9)

>34G9-H (VH/HCDR-1/HCDR-2/HCDR-3: SEQ ID NO.11/33/34/35)

QVQLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLNT**TAGMTVG**WIRQPSGKGLEWL
AHIWWNDDKYNPALKSRLTISKDTSSNQIFLEIASVVTADTATYYCTR
IATMNYAMDYWGQGTSTVTVSS

>34G9-L (VL/LCDR-1/LCDR-2/LCDR-3: SEQ ID NO.12/36/37/38)

DIVMTQAPASLAVSLGQRATISC**RASQSVSTSSFSYMH**WYQQKPGQPPK
LLIK**YASNLES**GVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDTATYYC**QHSWEIP**
YTFGGGTTKLEIK

A4 (鼠抗 2A2)

>2A2-H (VH/HCDR-1/HCDR-2/HCDR-3: SEQ ID NO.13/39/40/41)

QVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLT**TSGMGVD**WIRQSSGKGLEWL
AHIYWDDDKRYNPSSLKSRLTISKDTSSNQVFLKITSVDTADTATYYCAR
RAWDAMDYWGQGTSTFTVSS

>2A2-L (VL/LCDR-1/LCDR-2/LCDR-3: SEQ ID NO.14/42/31/43)

DIVMTQAQKFMSTSVGDRVSVTC**KARQNVGTNVA**WYQQKPGQSPKAL
IY**SASYRYS**GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYFC**QQYNSYPYT**
FGGTTKLEIK

A5 (鼠抗 50G3)

>50G3-H (VH/HCDR-1/HCDR-2/HCDR-3: SEQ ID NO.15/23/44/45)
 QVTLKESGPGILKPSQTLSTCSFSGFSLSTTSGMGVGVWIRQPSGKGLEWL
 AHIWWNDDDKYNPSLKSHLTISKDTSRNQVFLMITSVDTADTATYYCA
 RGAYDFFDYWGQGTTTLTVSS

>50G3-L (VL/LCDR-1/LCDR-2/LCDR-3: SEQ ID NO.16/26/31/46)
 DIVMTQAQNFMTSVGDRVSVTCKASQNVDTNVAWYQQKPGQSPKALI
 YSASYRYSGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSDDLADYFCQQYNTYPYT
 FGGGTKLEIK

A6 (鼠抗 53D10)

>53D10-H (VH/HCDR-1/HCDR-2/HCDR-3: SEQ ID NO.17/47/48/49)
 QVTLKESGPGIVQPSQPFRLTCTFSGFSLSTTSGIGITWIRQPSGKGLEWLA
TIWWDDDDNRYNPSLKSRSLTVSKDTSNNQAFLNIITVETADTAIYYCVQS
AWDWFAYWGQGLVTVSA

>53D10-L (VL/LCDR-1/LCDR-2/LCDR-3: SEQ ID NO.18/50/51/52)
 DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKSGQSPKALI
 YSASYRNSGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVESEDLAEYFCQQYNSHPVTF
 GGGGTKLEIK

实施例 5 鼠抗与人 GDF15 结合的亲和力检测

实验方法:

1. 选用同种属的 Capture Surface Dip。
 2. 取 96 孔板，每孔加入 200 μ l SD 缓冲液 (1 $\times$ PBS + 0.02% Tween20 + 0.1% BSA)，放入 ForteBio Octet 中，预循环。
 3. 固定抗体，抗体浓度采用 10 μ g/ml。
 4. GDF15 (百普赛斯，GD5-H5149) 分别稀释 200nm、100nm、50nm、25nm、12.5nm、6.25nm 6 个梯度，加入相应孔中。
 5. 上机检测。
- 结果见表 4。

表 4. 鼠抗与人 GDF15 结合的亲和力检测结果

抗体	KD(M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)
----	-------	-----------	-----------

AV380-mIgG1	9.70E-11	1.20E+06	1.17E-04
50G3	1.62E-10	2.02E+06	3.28E-04
53E5	8.50E-11	2.29E+06	1.94E-04
53D10	9.72E-11	2.24E+06	2.17E-04
53A8	1.40E-10	2.28E+06	3.18E-04
2A2	1.46E-10	1.47E+06	2.14E-04
34G9	8.95E-11	8.05E+05	7.20E-05

实施例 6 鼠抗的人源化改造

为 A1 (鼠抗 53E5) 选取了人源的序列 IGHV4-39 和 IGKV1-39, 分别作为重链与轻链人源化改造的模板。对 A1 单抗进行同源建模, 进行 Fab 区域的结构模拟。进行同源建模计算, 最后得到预测的 A1 的 Fab 结构。

通过对预测的 Fab 结构及重链与 IGHV4-39 序列进行比对分析, 将该 VH 中除了 CDR 区及 2V、24F、50L、51A、69L、73K、75S、78S、80I、98V、99Q 保留原始鼠的氨基酸外, 其它的鼠的氨基酸全部替换成相应的 IGHV4-39 模板人的氨基酸。

通过对预测的 Fab 结构及轻链与 IGKV1-39 序列进行比对分析, 将该 VL 中除了 CDR 区及 42Q、43S、46A 保留原始鼠的氨基酸外, 其它的鼠的氨基酸全部替换成相应的 IGKV1-39 模板人的氨基酸。

得到的人源化序列如下 (其中重链和轻链 CDR 以加粗和下划线示出, 其根据 KABAT 定义方法得到):

>53E5-H人源化序列 (VH/HCDR-1/HCDR-2/HCDR-3: SEQ ID NO.19/23/24/25)

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTFSGFSLSTSGMGVGVWIRQPPGKGLEWL
AHILWDDVKRYNPALKSRLTISKDSSKSQISLKLSSVTAADTAVYYCVQ
MAWDWFAYWGQGTITVTVSS

>53E5-L人源化序列 (VL/LCDR-1/LCDR-2/LCDR-3: SEQ ID NO.20/26/27/28)
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVDTNVAWYQQKPGQSPKALIYS
ASYRSSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYHSYPTFGQGT
RLEIK

为 A2 (鼠抗 53A8) 选取了人源的序列 IGHV4-39 和 IGKV1-39, 分别

作为重链与轻链人源化改造的模板。对 A2 单抗进行同源建模，进行 Fab 区域的结构模拟。进行同源建模计算，最后得到预测的 A2 的 Fab 结构。

通过对预测的 Fab 结构及重链与 IGHV4-39 序列进行比对分析，将该 VH 中除了 CDR 区及 2V、24F、50L、51A、69L、73K、78S、80I、99Q 为原始鼠的氨基酸外，其它的鼠的氨基酸全部替换成相应的 IGHV4-39 模板人的氨基酸。

通过对预测的 Fab 结构及轻链与 IGKV1-39 序列进行比对分析，将该 VL 中除了 CDR 区及 42Q、43S、46A 保留原始鼠的氨基酸外，其它的鼠的氨基酸全部替换成相应的 IGKV1-39 模板人的氨基酸。

得到的人源化序列如下（其中重链和轻链 CDR 以加粗和下划线示出，其根据 KABAT 定义方法得到）：

>53A8-H人源化序列（VH/HCDR-1/HCDR-2/HCDR-3：SEQ ID NO.21/23/29/25）

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTFSGFSLSTSGMGVGVIRQPPGKGLEWL
AHIRWDDVKRYNPALKSRLTISKDTSKSQISLKLSSVTAADTAVYYCAQ
MAWDWFAYWGQGTTVTVSS

>53A8-L人源化序列（VL/LCDR-1/LCDR-2/LCDR-3：SEQ ID NO.22/30/31/32）

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVDTDVAWYQQKPGQSPKALIYS
ASYRYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCHQYNSYPTFGQGT
RLEIK

以 SEQ ID NO.5 所示序列作为重链恒定区，SEQ ID NO.6 所示序列作为轻链恒定区，对于上述人源化序列，重新设计引物，合成相应的抗体重链和轻链的编码基因，连入真核表达载体中，重组载体转化大肠杆菌感受态细胞，37℃培养过夜，挑单克隆菌株测序鉴定。挑选序列正确的菌株，获得重组载体，转染哺乳动物表达细胞 293F，于 37℃、5% CO₂ 表达培养 7 天。收取上清，从中纯化获得人源化抗体，命名为“鼠抗名(hz)”。

>CH1-CH3 重链恒定区（SEQ ID NO.5）

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK
SCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHE

DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>CL1 轻链恒定区 (SEQ ID NO.6)

RTVAAPSVMFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYYPREAKVQWKVDNALQSG
NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK
SFNRGEC

实施例 7 人源化抗体与人 GDF15 结合的 ELISA 检测

实验过程参照实施例 2，不同之处在于，包被蛋白为 GDF15-HIS（百普赛斯，CAT#:GD5-H5149），包被板的每孔中加入待检抗体（人源化抗体）、阴性参考抗体（hIgG1）以及阳性参考抗体 Pongegromab（Pfizer；Drug Bank：D11909）和 AV380-hIgG1（将 AV380-mIgG1 的重链和轻链恒定区替换为人 IgG 的恒定区即 SEQ ID NO.5 和 SEQ ID NO.6）。结果见表 5 和图 4。

表 5 人源化抗体与人 GDF15 结合的 ELISA 检测结果

样品	EC50 (μg/ml)	OD450.Max
53E5(hz)	0.08331	1.053
53A8(hz)	0.08266	1.051
AV380-hIgG1	0.08233	1.066
Pongegromab	0.09599	1.100

实施例 8 人源化抗体与猴 GDF15 (cynoGDF15)结合的 ELISA 检测

实验过程参照实施例 2，不同之处在于，包被蛋白为 cynoGDF15-mFC（GDF15：Genbank 登记号 EHH29815.1；mFC：Genbank 登记号 AAH31470.1），包被板的每孔中加入待检抗体（人源化抗体）、阴性参考抗体（hIgG1）以及阳性参考抗体 Pongegromab 和 AV380-hIgG1。结果见表 6 和图 5。

表 6 人源化抗体与猴 GDF15 结合的 ELISA 检测结果

样品	EC50 (μg/ml)	OD450.Max
53E5(hz)	0.08159	1.032
53A8(hz)	0.07749	1.03
AV380-hIgG1	0.07407	1.000
Ponsegromab	0.06973	1.067

实施例 9 人源化抗体阻断 GDF15 蛋白与其受体 GFRAL 结合的 ELISA 检测

实验过程参照实施例 4, 不同之处在于, 包被板的每孔中加入待检抗体(人源化抗体)、阴性参考抗体(hIgG1)以及阳性参考抗体 Ponsegromab 和 AV380-hIgG1。结果见表 7 和图 6。

表 7. 人源化抗体阻断 GDF15 与其受体 GFRAL 结合的 ELISA 检测结果

样品	IC50 (μg/ml)	OD450.Max
53E5(hz)	0.2525	1.049
53A8(hz)	0.2831	1.104
AV380-hIgG1	0.2311	10.965
Ponsegromab	0.5037	1.019

实施例 10 人源化抗体与人 GDF15 结合的亲和力检测

实验过程参照实施例 5, 不同之处在于, GDF15 抗体替换为待检抗体(人源化抗体)、阴性参考抗体(hIgG1)以及阳性参考抗体 Ponsegromab 和 AV380-hIgG1。结果见表 8。

表 8. 人源化抗体与人 GDF15 结合的亲和力检测结果

抗体	KD(M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)
53E5(hz)	2.93E-10	9.23E+05	2.71E-04
53A8(hz)	2.66E-10	9.67E+05	2.57E-04
AV380-hIgG1	8.45E-11	8.17E+05	6.91E-05
Ponsegromab	<1.0E-12	7.11E+05	<1.0E-07

实施例 11 人源化抗体的稳定性检测

1. 冻融

取适量抗体，调整浓度至 10mg/mL，-80℃冻存 10min 后，取出放置于冰水混合物中，缓慢融化。重复前述步骤 5 次后，使用 SEC-HPLC 检测蛋白聚集程度，ELISA 检测蛋白结合活性变化。

2. 低 pH 处理

取适量抗体，使用超滤管将抗体保存缓冲液调整为 pH3.6，并把浓度调整至 5mg/mL。放置于室温处理 2-4h 后，使用 SEC-HPLC 检测蛋白聚集程度，ELISA 检测蛋白结合活性变化。

3. 40℃加速实验

取适量抗体，调整浓度至 10mg/mL，置于 40℃处理 1 和 2 周。使用 SEC-HPLC 检测蛋白聚集程度，ELISA 检测蛋白结合活性变化。结果见表 9。

表 9 人源化抗体的稳定性检测结果

抗体	浓度(mg/ml)	SEC-HPLC			ELISA
		HMW (%)	主峰(%)	LW (%)	EC50 (μg/ml)
53E5(hz) (处理前)	10.457	5.5272	94.4728	N	0.05878
53E5(hz) (冻融 5 次)	10.568	4.3366	95.6635	N	0.06476
53E5(hz) (pH3.6)	5.004	4.2869	95.7131	N	0.06991
53E5(hz) (40℃处理 1 周)	10.897	5.3201	94.6799	N	0.06408
53E5(hz) (40℃处理 2 周)	10.784	5.3533	94.6467	N	0.05734
抗体	浓度(mg/ml)	SEC-HPLC			ELISA
		HMW (%)	主峰(%)	LW (%)	EC50 (μg/ml)
53A8(hz) (处理前)	10.645	1.8110	98.1890		0.04121

53A8(hz) (冻融 5 次)	10.619	1.1731	98.8269		0.06728
53A8(hz) (pH3.6)	5.351	1.3127	98.6873		0.06905
53A8(hz) (40°C处理 1 周)	10.847	1.6034	98.3966		0.06426
53A8(hz) (40°C处理 2 周)	10.925	1.4989	98.2745	0.2266	0.02964

4. 血浆稳定性实验

取 200ul 血浆和 PBS，分别加入待测抗体 200μg（终浓度 1mg/ml），封闭好后 37°C 放置 2 周。ELISA 检测蛋白结合活性变化。结果见表 10 和图 7。

表 10 人源化抗体与人 GDF15 结合的 ELISA 检测结果

抗体	EC50 (μg/ml)
53E5(hz) (PBS)	0.1272
53E5(hz) (血浆)	0.03725
53A8(hz) (PBS)	0.1125
53A8(hz) (血浆)	0.04129

实施例 12 人源化抗体阻断 GDF15 与受体 GFRAL 结合的 ELISA 检测

将 GFRAL 胞外区稳定表达在 HEK293 荧光素酶报告细胞株中，其中荧光素酶基因的表达由 SRE 表达元件控制，构建 HEK293 SRE-LUC2-cRET-GFRAL 报告细胞株。

阻断实验 1:

GFRAL-HIS 蛋白（百普赛斯，GFA-H52H3）以 1μg/ml 的浓度溶解在 PBS 中，提前一天包被 ELISA 96 孔平板。第二天，用含 2% BSA 的 PBS 封闭平板。将 53E5(hz)、对照抗体 Ponsegromab 和 AV380-hIgG1 以起始浓度 20μg/ml，3.16 倍梯度稀释 10 个浓度，同时加入 GDF15-mFc 蛋白混合，使其终浓度为 0.3μg/ml，室温孵育 1 小时后，加入包被有 GFRAL-HIS 的 96 孔板中，室温孵育 1 小时后，洗涤，然后加入 HRP-anti-mouse IgG，室温孵育 1 小时后，检测 HRP 酶活性信号 (OD450)，HRP 酶活性信号代表结合到

GFRAL 上的 GDF15-mFc 蛋白的相对含量。绘制 OD450 值和抗体浓度相关曲线, 使用 $\log(\text{激动剂})$ vs. 反应-可变斜率 (四参数) Logistic 模型拟合剂量-效应曲线, 计算 IC50。实验结果显示 53E5(hz) 比对照抗体对 GDF15 有更强的阻断能力。结果见表 11 和图 8。

表 11. 人源化抗体阻断 GDF15 与其受体 GFRAL 结合的竞争性 ELISA 检测结果

样品	IC50 ($\mu\text{g/ml}$)	OD450.Max
AV380-hIgG1	0.2311	0.965
Ponsegromab	0.5037	1.019
53E5(hz)	0.2525	1.049

阻断实验 2:

HEK293 SRE-LUC2-cRET-GFRAL 报告细胞提前 1 天培养在 96 孔板中。第二天, 将 53E5(hz)、对照抗体 Ponsegromab 和 AV380-hIgG1 以起始浓度 $1\mu\text{g/ml}$, 用培养基 3.16 倍梯度稀释 10 个浓度, 同时加入 GDF15-His (百普赛斯, GD5-H5149), 使其终浓度为 5ng/ml , 室温孵育 1 小时后, 加入培养有报告细胞的培养孔中, 刺激荧光素酶的表达。继续培养 6 小时后, 每孔加入 $50\mu\text{L}$ 的 Bright-Glo 试剂溶液, 将培养板振动 3-5 min 使细胞裂解。使用 Multi-mode Microplate Reader 读取冷光值。绘制荧光素酶活性增长倍数 (不加 GDF15 蛋白的孔的酶活性倍数) 和抗体浓度相关曲线, 使用 $\log(\text{激动剂})$ vs. 反应-可变斜率 (四参数) Logistic 模型拟合剂量-效应曲线, 计算 IC50。实验结果显示 53E5(hz) 和对照抗体 Ponsegromab 对 GDF15 的功能有相似的抑制效果。结果见表 12 和图 9。

表 12. 在表达 GFRAL 的报告细胞上检测人源化抗体阻断 GDF15 功能的检测结果

样品	IC50 ($\mu\text{g/ml}$)	Bottom
53E5(hz)	0.02254	1.096
AV380-hIgG1	0.04471	1.033
Ponsegromab	0.03211	1.066

阻断实验 3:

HEK293 SRE-LUC2-cRET-GFRAL 报告细胞提前 1 天培养在 96 孔板中。第二天, 将 53E5(hz)和对照抗体 Ponsegromab 分别用培养基配制浓度为 4、3、2、0.5、0.1 μ g/ml 的溶液, 每个浓度的抗体各取 5 份, 分别加入不同浓度的 GDF15-His (百普赛斯, GD5-H5149), 使其终浓度为 100、31.6、10、3.16、1ng/ml, 室温孵育 1 小时后, 加入培养有报告细胞的培养孔中, 刺激荧光素酶的表达。继续培养 6 个小时后, 每孔加入 50 μ L 的 Bright-Glo 试剂溶液, 将培养板振动 3-5 min 使细胞裂解。使用 Multi-mode Microplate Reader 读取冷光值。绘制荧光素酶活性增长倍数 (不加 GDF15 蛋白的孔的酶活性倍数) 和抗体浓度相关曲线, 使用 log(激动剂) vs. 反应-可变斜率 (四参数) Logistic 模型拟合剂量-效应曲线, 计算 EC50。

实验结果显示 53E5(hz)比对照抗体 Ponsegromab 有更强的中和 GDF15 的效果。结果见图 10 中的 10-1 和 10-2。本实验中, 固定抗体的浓度, 然后和不同浓度的 GDF15 蛋白共孵育, 检测未中和 GDF15 刺激报告细胞的信号, 图中表示的 EC50 为抗体为 0.1 μ g/ml 的数值。

实施例 13 人源化抗体的结合特异性的检测

结合特异性实验 1:

将 GDF15 (百普赛斯, GD5-H5149)、GDF1 (R&D, 6937-GD-010)、GDF3 (R&D, 5754-G3-010) 蛋白分别以 1 μ g/ml 浓度溶解在 PBS 中, 提前一天包被 ELISA 96 孔平板。第二天, 用含 2% BSA 的 PBS 封闭 96 孔平板 1 小时, 去除封闭液后, 以 4 μ g/ml 加入 GDF15 抗体 53E5(hz)、对照抗体 Ponsegromab 和无关 hIgG1, 室温孵育 1 小时后, 洗涤, 然后加入 HRP-anti-human IgG, 室温孵育 1 小时后, 检测 HRP 酶活性信号 (OD450)。OD450 值为抗体结合量的相对信号。实验结果显示抗体 53E5(hz)与 GDF1、GDF3 无特异性结合, 而对照抗体 Ponsegromab 与 GDF1、GDF3 弱结合。结果见图 11。

结合特异性实验 2:

复苏冻存的 PBMC, 在 PBMC 中分别加入 10、1、0.1 μ g/ml 的 GDF15 抗体 53E5(hz)、对照抗体 Ponsegromab 和 AV380-hIgG1, 或 CD3 抗体 OKT3 作为阳性对照, 另取 1 管不加抗体作为阴性对照, 4 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟后, 去除抗体, 加入 PE anti-human IgG 流式分析抗体, 4 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟后, 离心后,

加入抗体稀释液，加入 7AAD 去除死细胞，流式分析抗体结合信号。PBMC 上，PE 的平均荧光强度(MFI)代表抗体结合在细胞上的信号；绘制抗体浓度和 MFI 的曲线。实验结果显示抗体 53E5(hz)与 PBMC 无特异性结合。结果见图 12。

实施例 14 动物体内 PK 实验

10-12 周龄的 BALB/c 雌性小鼠尾静脉注射 GDF15 抗体 53E5(hz)、对照抗体 AV380-hIgG1 与 Ponsegromab，注射剂量为 10mg/kg 和 1mg/kg 小鼠体重。静脉采血时间为 10 分钟、1 小时、6 小时、1 天、3 天、5 天、7 天、14 天，制备血清。待收集完所有时间点的血清后，ELISA 检测血清中的抗体浓度。

具体过程如下，4℃过夜包被 GDF15-HIS 抗原，50ng 每孔，2% BSA 封闭液封闭 2h。将血清样品分别稀释 50 倍和 500 倍；标准品（即注射的抗体）1μg/mL 起始，3.16 倍稀释，12 个浓度。去除封闭液，加入配制的血清样品和标准品，室温孵育 1 小时；洗涤后加入 HRP-anti-human IgG，室温孵育 1 小时；洗涤后，检测 HRP 酶活性信号（OD450）。绘制 OD450 值和标准品浓度曲线，根据拟合的标准曲线计算血清中抗体浓度。绘制抽血时间与血清中抗体浓度相关曲线，计算抗体在小鼠体内半衰期。结果见图 13。

实施例 15 GDF15 抗体体内功能实验

实验 1. 检测 GDF15 抗体抑制恶病质的效率。

8~10 周大的雌性 SCID 小鼠皮下注射 5×10^6 HT1080 细胞（含 50% matrigel），每天测量体重，用游标卡尺每天测量肿瘤大小（肿瘤的长和宽），计算肿瘤体积（ $=0.5 \times \text{长} \times \text{宽} \times \text{高}$ ），小鼠去瘤体重为小鼠带瘤体重减去肿瘤重量（肿瘤重量按体积 $\times 1\text{mg}/\text{mm}^3$ 计算），小鼠体重降到第 0 天体重的 93%时（本实验为第 18 天），将小鼠进行随机分组，每组 10 只，腹腔注射 hIgG（阴性对照）或人源化抗体 53E5(hz)和对照抗体 AV380-hIgG1 与 Ponsegromab，注射剂量为 10mg/kg 小鼠体重，每 3 天注射一次。绘制小鼠去瘤体重和接种肿瘤后的天数相关曲线，结果见图 14。实验结果显示 53E5(hz)和对照抗体 Ponsegromab 有相似的恶病质抑制效果。

实验 2. 检测 GDF-15 抗体体内中和 GDF15 的效率。

BALB/c 普通小鼠第 0 天和第 8 天分别腹腔注射 (I.P.) GDF15-mFc 融合蛋白 (0.25mg/kg 体重), 第 2 天腹腔注射 hIgG (3mg/kg 体重, 阴性对照) 或不同剂量的人源化抗体 53E5(hz)和对照抗体 Ponsegromab (3、1、0.3mg/kg 体重), 每天测量体重。待实验结束时, 绘制小鼠体重和注射 GDF15-mFc 融合蛋白后的天数相关曲线, 结果见图 15。实验结果显示 53E5(hz)和对照抗体 Ponsegromab 在体内抑制 GDF15 功能有相似的效果。

以上对本发明具体实施方式的描述并不限制本发明, 本领域技术人员可以根据本发明作出各种改变或变形, 只要不脱离本发明的精神, 均应属于本发明所附权利要求的范围。

权 利 要 求

1. 一种抗体或其片段，所述抗体或其片段包含重链可变区（VH）和轻链可变区（VL），其中所述重链可变区（VH）和轻链可变区（VL）包含选自以下的互补决定区（CDR）组合（H-CDR1、H-CDR2、H-CDR3；和，L-CDR1、L-CDR2、L-CDR3）：

(1) 依次示于 SEQ ID NO.23（TSGMGVG）、SEQ ID NO.24（HILWDDVKRYNPALKS）、SEQ ID NO.25（MAWDWFAY）的 H-CDR1、H-CDR2、H-CDR3；和，依次示于 SEQ ID NO.26（KASQNVDTNVA）、SEQ ID NO.27（SASYRSS）、SEQ ID NO.28（QQYHSYPT）的 L-CDR1、L-CDR2、L-CDR3；

(2) 依次示于 SEQ ID NO.23（TSGMGVG）、SEQ ID NO.29（HIRWDDVKRYNPALKS）、SEQ ID NO.25（MAWDWFAY）的 H-CDR1、H-CDR2、H-CDR3；和，依次示于 SEQ ID NO.30（KASQNVDTDVA）、SEQ ID NO.31（SASYRYS）、SEQ ID NO.32（HQYNSYPT）的 L-CDR1、L-CDR2、L-CDR3；

(3) 依次示于 SEQ ID NO.33（TAGMTVG）、SEQ ID NO.34（HIWWNDDKYYPALKS）、SEQ ID NO.35（IATMNYAMDY）的 H-CDR1、H-CDR2、H-CDR3；和，依次示于 SEQ ID NO.36（RASQSVSTSSFSYMH）、SEQ ID NO.37（YASNLES）、SEQ ID NO.38（QHSWEIPYT）的 L-CDR1、L-CDR2、L-CDR3；

(4) 依次示于 SEQ ID NO.39（TSGMGVD）、SEQ ID NO.40（HIYWDDDKRYNPALKS）、SEQ ID NO.41（RAWDAMDY）的 H-CDR1、H-CDR2、H-CDR3；和，依次示于 SEQ ID NO.42（KARQNVGTNVA）、SEQ ID NO.31（SASYRYS）、SEQ ID NO.43（QQYNSYPYT）的 L-CDR1、L-CDR2、L-CDR3；

(5) 依次示于 SEQ ID NO.23（TSGMGVG）、SEQ ID NO.44（HIWWNDDKYYPALKS）、SEQ ID NO.45（GAYDFFDY）的 H-CDR1、H-CDR2、H-CDR3；和，依次示于 SEQ ID NO.26（KASQNVDTNVA）、SEQ ID NO.31（SASYRYS）、SEQ ID NO.46（QQYNTYPYT）的 L-CDR1、L-CDR2、L-CDR3；和

(6) 依次示于 SEQ ID NO.47 (TSGIGIT)、SEQ ID NO.48 (TIWWDDDNRYNPSLKS)、SEQ ID NO.49 (SAWDWFAY) 的 H-CDR1、H-CDR2、H-CDR3; 和, 依次示于 SEQ ID NO.50 (KASQNVGTNVA)、SEQ ID NO.51 (SASYRNS)、SEQ ID NO.52 (QQYNShpvt) 的 L-CDR1、L-CDR2、L-CDR3。

2. 根据权利要求 1 所述的抗体或其片段, 其特征在于, 所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 19 或 SEQ ID NO: 21 所示的氨基酸序列或与所述氨基酸序列具有至少 75% 同一性的氨基酸序列; 和/或, 所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 20 或 SEQ ID NO: 22 所示的氨基酸序列或与所述氨基酸序列具有至少 75% 同一性的氨基酸序列。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的抗体或其片段, 其特征在于, 所述重链可变区和轻链可变区分别包含:

(1) SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列或与所述氨基酸序列具有至少 75% 同一性的氨基酸序列; 和, SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列或与所述氨基酸序列具有至少 75% 同一性的氨基酸序列;

(2) SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列或与所述氨基酸序列具有至少 75% 同一性的氨基酸序列; 和, SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列或与所述氨基酸序列具有至少 75% 同一性的氨基酸序列;

(3) SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列或与所述氨基酸序列具有至少 75% 同一性的氨基酸序列; 和, SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列或与所述氨基酸序列具有至少 75% 同一性的氨基酸序列;

(4) SEQ ID NO: 13 所示的氨基酸序列或与所述氨基酸序列具有至少 75% 同一性的氨基酸序列; 和, SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列或与所述氨基酸序列具有至少 75% 同一性的氨基酸序列;

(5) SEQ ID NO: 15 所示的氨基酸序列或与所述氨基酸序列具有至少 75% 同一性的氨基酸序列; 和, SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列或与所述氨基酸序列具有至少 75% 同一性的氨基酸序列;

(6) SEQ ID NO: 17 所示的氨基酸序列或与所述氨基酸序列具有至少 75% 同一性的氨基酸序列; 和, SEQ ID NO: 18 所示的氨基酸序列或与所述

氨基酸序列具有至少 75%同一性的氨基酸序列；

(7) SEQ ID NO: 19 所示的氨基酸序列或与所述氨基酸序列具有至少 75%同一性的氨基酸序列；和，SEQ ID NO: 20 所示的氨基酸序列或与所述氨基酸序列具有至少 75%同一性的氨基酸序列；

(8) SEQ ID NO: 21 所示的氨基酸序列或与所述氨基酸序列具有至少 75%同一性的氨基酸序列；和，SEQ ID NO: 22 所示的氨基酸序列或与所述氨基酸序列具有至少 75%同一性的氨基酸序列。

4. 根据权利要求 1 至 3 中任一项所述抗体或其片段，其特征在于，所述抗体为鼠抗、嵌合抗体或者完全或部分人源化抗体；所述抗原结合片段为半抗体或者所述抗体的 scFv、dsFv、(dsFv)₂、Fab、Fab'、F(ab')₂ 或 Fv 片段；

优选地，所述抗体为单克隆抗体或单链抗体；

优选地，所述抗体或其片段还包含人或鼠的恒定区，优选包含人或鼠的重链恒定区(CH)和/或轻链恒定区(CL)；优选地，所述抗体或其片段包含重链和轻链；更优选地，所述抗体或其片段包含选自 IgG、IgA、IgM、IgD 或 IgE 的重链恒定区和/或 κ 或 λ 型轻链恒定区。

5. 根据权利要求 1 至 4 中任一项所述抗体或其片段，其特征在于，所述抗体为单克隆抗体，优选为鼠、嵌合或人源化的单克隆抗体；进一步优选地，所述单克隆抗体为 IgG，特别是 IgG1。

6. 一种核酸分子，其包含编码权利要求 1 至 5 中任一项所述的抗体或其片段中包含的重链 CDR、轻链 CDR、轻链可变区、重链可变区、重链或轻链的核苷酸序列。

7. 一种载体，其包含权利要求 6 所述的核酸分子。

8. 一种宿主细胞，其包含权利要求 6 所述的核酸分子和/或权利要求 7 所述的载体。

9. 一种组合物，其包含权利要求 1 至 5 中任一项所述的抗体或其片段、权利要求 6 所述的核酸分子、权利要求 7 所述的载体和/或权利要求 8 所述的宿主细胞；

优选地，所述组合物为药物组合物，其还包含任选的药学上可接受的辅料。

10. 权利要求 1 至 5 中任一项所述的抗体或其片段、权利要求 6 所述的核酸分子、权利要求 7 所述的载体、权利要求 8 所述的宿主细胞和/或权利要

求 9 所述的组合物在制备用于治疗疾病或病症的药物中的用途，所述疾病或病症是由 GDF15 的表达介导的或与所述 GDF15 的表达相关；

和/或，所述疾病或病症为肿瘤（例如癌症）、心力衰竭、慢性肾病、厌食、少肌症或恶病质。

11. 一种治疗疾病或病症的方法，所述方法包括给有此需要的受试者施用权利要求 1 至 5 中任一项所述的抗体或其片段、权利要求 6 所述的核酸分子、权利要求 7 所述的载体、权利要求 8 所述的宿主细胞和/或权利要求 9 所述的组合物，所述疾病或病症是由 GDF15 的表达介导的或与所述 GDF15 的表达相关；和/或，所述疾病或病症为肿瘤（例如癌症）、心力衰竭、慢性肾病、厌食、少肌症或恶病质；

优选地，所述受试者为哺乳类动物；更优选地，所述受试者为人。

12. 一种检测或诊断疾病或病症的方法，所述方法包括使权利要求 1 至 5 中任一项所述的抗体或其片段、权利要求 6 所述的核酸分子、权利要求 7 所述的载体、权利要求 8 所述的宿主细胞和/或权利要求 9 所述的组合物与来自受试者的样品相接触，所述疾病或病症是由 GDF15 的表达介导的或与所述 GDF15 的表达相关；或者，所述疾病或病症为肿瘤（例如癌症）、心力衰竭、慢性肾病、厌食、少肌症或恶病质；

优选地，所述受试者为哺乳类动物；更优选地，所述受试者为人。

13. 一种试剂盒，所述试剂盒包含权利要求 1 至 5 中任一项所述的抗体或其片段、权利要求 6 所述的核酸分子、权利要求 7 所述的载体、权利要求 8 所述的宿主细胞和/或权利要求 9 所述的组合物；

可选地，所述试剂盒还包含使用说明书。