



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.06.16

(21) Номер заявки
201991075

(22) Дата подачи заявки
2017.11.08

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(54) АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ, КОТОРЫЕ ПРОЯВЛЯЮТ АНТАГОНИЗМ В ОТНОШЕНИИ ЛЕПТИНОВОГО РЕЦЕПТОРА

(31) **62/419,062**

(32) **2016.11.08**

(33) **US**

(43) **2019.10.31**

(86) **PCT/US2017/060690**

(87) **WO 2018/089532 2018.05.17**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**РЕГЕНЕРОН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,
ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
**Громада Джеспер, Стевис Панайотис,
Алтареджос Джудит (US)**

(74) Представитель:
**Угрюмов В.М., Глухарёва А.О.,
Гизатуллина Е.М., Строкова О.В.,
Лебедев В.В., Костюшенкова М.Ю.,
Гизатуллин Ш.Ф., Парамонова К.В.
(RU)**

(56) FAZELI M ET AL: "Identification of a monoclonal antibody against the leptin receptor that acts as an antagonist and blocks human monocyte and T cell activation", JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V.,

AMSTERDAM, NL, vol. 312, no. 1-2, 30 May 2006 (2006-05-30), pages 190-200, XP028017555, ISSN: 0022-1759, DOI: 10.1016/J.JIM.2006.03.011 [retrieved on 2006-05-30] cited in the application abstract

BYRON CARPENTER ET AL: "Structure of the Human Obesity Receptor Leptin-Binding Domain Reveals the Mechanism of Leptin Antagonism by a Monoclonal Antibody", STRUCTURE, vol. 20, no. 3, 1 March 2012 (2012-03-01), pages 487-497, XP055041755, ISSN: 0969-2126, DOI: 10.1016/j.str.2012.01.019 abstract page 489; figure 2 page 495, right-hand column, paragraph 2

PETER MOLEK ET AL: "Screening of synthetic phage display scFv libraries yields competitive ligands of human leptin receptor", BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 452, no. 3, 1 September 2014 (2014-09-01), pages 479-483, XP055328791, AMSTERDAM, NL ISSN: 0006-291X, DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.08.087 abstract page 479, right-hand column, last paragraph - page 480, left-hand column, paragraph 2 page 481, right-hand column, paragraph 2 - page 482, left-hand column, paragraph 1 figure 2

US-B1-6977240

ROBERT H. MAK ET AL: "Exploiting the therapeutic potential of leptin signaling in cachexia", CURRENT OPINION IN SUPPORTIVE AND PALLIATIVE CARE, vol. 8, no. 4, 1 December 2014 (2014-12-01), pages 352-357, XP055436046, ISSN: 1751-4258, DOI: 10.1097/SPC.0000000000000092 the whole document

WO-A1-2017066204

(57) Настоящее изобретение относится к антителам и антигенсвязывающим фрагментам антител, которые связываются с лептиновым рецептором (LEPR), и способам их применения. Согласно определенным вариантам осуществления настоящего изобретения предусмотрены антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, которые связываются с LEPR и проявляют антагонизм в отношении передачи сигнала LEPR. Согласно определенным вариантам осуществления настоящего изобретения предусмотрены антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, которые связываются с LEPR в присутствии и при отсутствии лептина. Согласно другим вариантам осуществления настоящего изобретения предусмотрены антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, которые проявляют частичный агонизм в отношении передачи сигнала LEPR. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению являются применимыми для лечения различных состояний, включая в себя без ограничения следующее: кахексия при застойной сердечной недостаточности, легочная кахексия и раковая кахексия, аутоиммунные нарушения, такие как воспалительное заболевание кишечника, красная волчанка, рассеянный склероз, псориаз, сердечно-сосудистые заболевания, повышенное артериальное давление, нейродегенеративные нарушения, депрессия, рак, такой как почечноклеточная

карцинома, меланома, рак молочной железы, и другие заболевания и нарушения, ассоциированные или вызванные сниженной передачей сигнала лептина.

040524 B1

040524 B1

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

Лептин представляет собой полипептидный гормон, преимущественно экспрессируемый жировой тканью и участвующий в регуляции обмена веществ, энергетического баланса и потребления пищи. Активность лептина опосредуется взаимодействием с лептиновым рецептором и передачей сигналов посредством него. Лептиновый рецептор (также известный как "LEPR", "WSX", "ОВ-рецептор", "ОВ-R" и "CD295") представляет собой однопроводный трансмембранный рецептор семейства цитокиновых рецепторов класса I с большим (состоящим из 818 аминокислот) внеклеточным доменом. Повышенная экспрессия лептина, лептинового рецептора Ob-R или их обоих может способствовать множественным нарушениям, включая в себя без ограничения следующее: анорексия или другие психические расстройства пищевого поведения, кахексия при хроническом заболевании почек, другие кахексии, такие как кахексия при застойной сердечной недостаточности, легочная кахексия, лучевая кахексия и раковая кахексия, аутоиммунные нарушения, такие как воспалительное заболевание кишечника, красная волчанка, рассеянный склероз, псориаз, сердечно-сосудистые заболевания, повышенное артериальное давление, депрессия, неалкогольный стеатоз печени, нейродегенеративные расстройства, депрессия, рак, такой как почечно-лечная карцинома, меланома и рак молочной железы.

Предлагаемые терапевтические подходы для решения проблемы высокого уровня передачи сигналов лептина включают в себя применение следующего: пептидные антагонисты лептинового рецептора и антагонистические мутанты, такие как растворимые варианты лептинового рецептора, конкурентные антагонисты LEPR, такие как антитело 9F8 (Fazeli et al. (2006) J Immunological Methods 312, 190- 200) или наноантитела, нацеленные на лептиновый рецептор (McMurphy et al., PLOS One (2014) 9(2):e89895), домены фибронектина III, орексигенные вещества (например, грелин и NPY), блокада нижележащих медиаторов лептина (например, рецептора меланокортина 4) и/или изменение образа жизни. Тем не менее, такие подходы в целом показали ограниченную эффективность. Таким образом, в настоящей области существует потребность в альтернативных подходах к лечению устойчивости к лептину и других состояний, ассоциированных с повышенными содержаниями лептина в сыворотке и/или избыточной передачей сигнала LEPR.

Перечень последовательностей

Официальная копия перечня последовательностей подана одновременно с описанием изобретения в электронном виде посредством EFS-Web в виде отформатированного в соответствии с ASCII (Американским стандартным кодом обмена информацией) перечня последовательностей с названием файла 2017_11_08_10271WO01_SEQ_LIST_ST25.TXT, датой создания 8 ноября 2017 г. и размером, составляющим 87,4 KB. Перечень последовательностей, содержащийся в этом отформатированном согласно ASCII документе, является частью настоящего описания изобретения и тем самым полностью включен в настоящий документ посредством ссылки.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

Настоящее изобретение относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые связываются с лептиновым рецептором человека (LEPR). Антитела согласно настоящему изобретению представляют собой антагонистические антитела; т.е. связывание антител к LEPR согласно настоящему изобретению с LEPR приводит к блокаде или отрицательной регуляции передачи сигнала посредством лептинового рецептора в клетках. Соответственно, согласно различным вариантам осуществления антагонистические антитела согласно настоящему изобретению проявляют слабую частичную агонистическую активность. Напротив, антитела согласно настоящему изобретению являются применимыми, например, для отрицательной регуляции биологической активности лептина у субъекта. В связи с этим, антитела и антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению являются применимыми в терапевтическом лечении заболеваний и нарушений, ассоциированных с повышенной передачей сигнала лептина.

Антитела согласно настоящему изобретению могут являться полноразмерными (например, антитело IgG1 или IgG4) или могут содержать только антигенсвязывающую часть (например, Fab, F(ab')₂ или фрагмент scFv) и могут быть модифицированы, чтобы повлиять на функциональность, например, для устранения остаточных эффекторных функций (Reddy et al., 2000, J. Immunol. 164:1925-1933).

Иллюстративные антагонистические антитела к LEPR согласно настоящему изобретению приведены в табл. 1 и 2 в настоящем документе. В табл. 1 представлены идентификаторы аминокислотной последовательности переменных областей тяжелой цепи (HCVR), переменных областей легкой цепи (LCVR), определяющих комплементарность областей тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и определяющих комплементарность областей легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) иллюстративных антагонистических антител к LEPR. В табл. 2 представлены идентификаторы последовательности нуклеиновой кислоты HCVR, LCVR, HCDR1, HCDR2 HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 иллюстративных антагонистических антител к LEPR.

Настоящее изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связываются с LEPR, содержащим HCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в табл. 1, или, по существу, сходной с ними последовательности, которая характеризуется по меньшей мере 90%,

ных последовательностей HCDR3/LCDR3 выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8/16, 24/16, 32/16, 40/16, 48/16, 56/16, 64/16, 72/16, 80/16 и 80/88.

Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связываются с LEPR, содержащим набор из шести CDR (т.е. HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащийся в пределах любого из иллюстративных антител к LEPR, перечисленных в табл. 1. Согласно определенным вариантам осуществления набор аминокислотных последовательностей HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 выбран из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 6, 8, 12, 14, 16; 20, 22, 24, 12, 14, 16; 28, 30, 32, 12, 14, 16; 36, 38, 40, 12, 14, 16; 52, 54, 56, 12, 14, 16; 60, 62, 64, 12, 14, 16; 68, 70, 72, 12, 14, 16; и 76, 78, 80, 84, 86, 88.

Согласно сходному варианту осуществления настоящее изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связываются с LEPR, содержащим набор из шести CDR (т.е. HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащийся в пределах пары аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, как определено любым из иллюстративных антител к LEPR, перечисленных в табл. 1. Например, согласно настоящему изобретению предусмотрены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с LEPR, содержащие набор аминокислотных последовательностей HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащийся в пределах пары аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 18/10, 26/10, 34/10, 42/10, 50/10, 58/10, 66/10 и 74/82. Способы и техники идентификации CDR в пределах аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR хорошо известны в настоящей области техники и их можно использовать для идентификации CDR в пределах заданных аминокислотных последовательностей HCVR и/или LCVR, раскрытых в настоящем документе. Иллюстративные соглашения, которые можно использовать для идентификации границ CDR, включают в себя, например, определение согласно Kabat, определение согласно Chothia и определение AbM. В общих чертах, определение согласно Kabat основано на изменчивости последовательности, определение согласно Chothia основано на расположении областей структурной петли, а определение AbM является компромиссом между подходами Kabat и Chothia. См., например, Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani et al., J. Mol. Biol. 273:927-948 (1997); и Martin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:9268-9272 (1989). Общеизвестные базы данных также доступны для идентификации последовательностей CDR в пределах антитела.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим антитела к LEPR или их части. Например, настоящее изобретение относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в табл. 1; согласно определенным вариантам осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты HCVR, перечисленных в табл. 2, или, по существу, сходной с ними последовательности, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности в отношении них.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в табл. 1; согласно определенным вариантам осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты LCVR, перечисленных в табл. 2, или, по существу, сходной с ними последовательности, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности в отношении них.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей HCDR1, перечисленных в табл. 1; согласно определенным вариантам осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты HCDR1, перечисленных в табл. 2, или, по существу, сходной с ними последовательности, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности в отношении них.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей HCDR2, перечисленных в табл. 1; согласно определенным вариантам осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты HCDR2, перечисленных в табл. 2, или, по существу, сходной с ними последовательности, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности в отношении них.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей HCDR3, перечисленных в табл. 1; согласно определенным вариантам осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты HCDR3, перечисленных в

табл. 2, или, по существу, сходной с ними последовательности, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности в отношении них.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей LCDR1, перечисленных в табл. 1; согласно определенным вариантам осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты LCDR1, перечисленных в табл. 2, или, по существу, сходной с ними последовательности, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности в отношении них.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей LCDR2, перечисленных в табл. 1; согласно определенным вариантам осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты LCDR2, перечисленных в табл. 2, или, по существу, сходной с ними последовательности, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности в отношении них.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей LCDR3, перечисленных в табл. 1; согласно определенным вариантам осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты LCDR3, перечисленных в табл. 2, или, по существу, сходной с ними последовательности, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности в отношении них.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим HCVR, причем HCVR содержит набор из трех CDR (т.е. HCDR1, HCDR2, HCDR3), причем набор аминокислотных последовательностей HCDR1, HCDR2, HCDR3 является таким, как определено любым из иллюстративных антител к LEPR, перечисленных в табл. 1.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим LCVR, причем LCVR содержит набор из трех CDR (т.е. LCDR1, LCDR2, LCDR3), причем набор аминокислотных последовательностей LCDR1, LCDR2, LCDR3 является таким, как определено любым из иллюстративных антител к LEPR, перечисленных в табл. 1.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим как HCVR, так и LCVR, причем HCVR содержит аминокислотную последовательность согласно любой из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в табл. 1, и при этом LCVR содержит аминокислотную последовательность согласно любой из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в табл. 1. Согласно определенным вариантам осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты HCVR, перечисленных в табл. 2, или, по существу, сходной с ними последовательности, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности в отношении них, и полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты LCVR, перечисленных в табл. 2, или, по существу, сходной с ними последовательности, которая характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности в отношении них. Согласно определенным вариантам осуществления согласно этому аспекту настоящего изобретения молекула нуклеиновой кислоты кодирует HCVR и LCVR, причем как HCVR, так и LCVR происходят из одного и того же антитела к LEPR, перечисленного в табл. 1.

Настоящее изобретение также относится к рекомбинантным экспрессионным векторам, способным экспрессировать полипептид, содержащий вариабельную область тяжелой или легкой цепи антитела к LEPR. Например, согласно настоящему изобретению предусмотрены рекомбинантные экспрессионные векторы, содержащие любую из молекул нуклеиновой кислоты, упомянутых выше, т.е. молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих любую из последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, как представлено в табл. 1. Кроме того, в пределах объема настоящего изобретения предусмотрены клетки-хозяева, в которые были введены такие векторы, а также способы получения антител или их частей путем культивирования клеток-хозяев при условиях, обеспечивающих получение антител или фрагментов антител, и выделения антител и фрагментов антител, полученных таким образом.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей рекомбинантное антитело человека или его фрагмент, которые специфически связываются с LEPR, и фармацевтически приемлемый носитель. Согласно сходному аспекту настоящее изобретение относится к композиции, которая представляет собой комбинацию антитела к LEPR и второго терапевтического средства. Согласно одному варианту осуществления второе терапевтическое средство представляет собой любое средство, которое благоприятно сочетается с антителом к LEPR.

Согласно еще одному аспекту настоящее изобретение относится к терапевтическим способам отрицательной регуляции или устранению передачи сигнала LEPR с использованием антитела к LEPR или антигенсвязывающей части антитела согласно настоящему изобретению. Терапевтические способы согласно этому аспекту настоящего изобретения предусматривают введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела согласно настоящему изобретению, нуждающемуся в этом субъекту. Предусмотренное для лечения нарушение представляет собой любое заболевание или состояние, которое улучшается, интенсивность которого уменьшается, подавляется или предотвращается за счет отрицательной регуляции или устранения передачи сигнала LEPR или блокирования активности лептина.

Другие варианты осуществления станут очевидными из обзора последующего подробного описания.

Краткое описание фигур

На фиг. 1 показано процентное изменение потребления пищи у мышей, которые получили лечение с помощью 30 мг/кг антител к LEPR H4N17322P2, H4N18457P2 или H4N18464 или с помощью изотипического контрольного антитела.

На фиг. 2 показано среднее процентное изменение массы тела мышей, которые получили лечение с помощью 30 мг/кг антител к LEPR H4N17322P2, H4N18457P2 или H4N18464 или с помощью изотипического контрольного антитела.

На фиг. 3 показана средняя масса жировой ткани мышей, которые получили лечение с помощью 30 мг/кг антител к LEPR H4N17322P2, H4N18457P2 или H4N18464 или с помощью изотипического контрольного антитела.

Подробное раскрытие настоящего изобретения

Прежде чем будет описано настоящее изобретение, следует понимать, что настоящее изобретение не ограничено конкретными способами и описанными экспериментальными условиями, поскольку такие способы и условия могут варьироваться. Также следует понимать, что используемая в настоящем документе терминология предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения, поскольку объем настоящего изобретения будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно подразумевается специалистом в настоящей области техники, к которой относится настоящее изобретение. Используемый в настоящем документе термин "приблизительно" при использовании в отношении конкретного приведенного числового значения означает, что значение может отличаться от приведенного значения не более чем на 1%. Например, используемое в настоящем документе выражение "приблизительно 100" включает в себя 99 и 101 и все значения между ними (например, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4 и т.д.).

Несмотря на то, что любые способы и материалы, подобные или эквивалентные тем, которые описаны в настоящем документе, можно использовать при практическом применении или испытании настоящего изобретения, ниже описаны предпочтительные способы и материалы. Все упомянутые в настоящем описании патенты, заявки на выдачу патента и непатентные публикации полностью включены в настоящий документ посредством ссылки.

Определения

Используемое в настоящем документе выражение "лептиновый рецептор", "LEPR" и тому подобное относится к лептиновому рецептору человека, содержащему аминокислотную последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 89 (см. также UniProtKB/Swiss-Prot, учетный номер P48357). Альтернативные названия для LEPR, используемые в научной литературе, включают в себя "OB-рецептор", "OB-R" и "CD295". LEPR также называется "WSX" (см., например, патент США № 7524937). Выражение "LEPR" включает в себя как мономерные, так и мультимерные (например, димерные) молекулы LEPR. Используемое в настоящем документе выражение "мономерный LEPR человека" означает белок LEPR или его часть, которые не содержат или не обладают какими-либо доменами мультимеризации и которые существуют при нормальных условиях в виде одиночной молекулы LEPR без прямого физического соединения с другой молекулой LEPR. Иллюстративная мономерная молекула LEPR представляет собой молекулу, которая в настоящем документе называется "hLEPR.mmh", содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 90 (см., например, пример 3 в настоящем документе). Используемое в настоящем документе выражение "димерный LEPR человека" означает конструктор, содержащий две молекулы LEPR, соединенные друг с другом посредством линкера, ковалентной связи, нековалентной связи или посредством домена мультимеризации, такого как Fc-домен антитела. Иллюстративная димерная молекула LEPR представляет собой молекулу, которая в настоящем документе называется "hLEPR.mFc", содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 91 (см., например, пример 3 в настоящем документе), или молекулу, которая в настоящем документе называется "hLEPR.hFc", содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 92. Используемые в настоящем документе выражения, такие как "антитело к LEPR", "антитело, которое специфически связывается с LEPR", "LEPR-специфический связывающий белок" и тому подобное, если специально не указано иное,

относятся к молекулам, которые связываются с полноразмерным LEPR человека, мономерным LEPR человека, димерным LEPR человека или другими конструктами, которые содержат внеклеточный домен LEPR или состоят из него.

Подразумевается, что все ссылки на белки, полипептиды и белковые фрагменты в настоящем документе относятся к относящейся к человеку версии соответствующего белка, полипептида или белкового фрагмента, если только явно не указано, что они принадлежат к виду, не относящемуся к человеку. Таким образом, выражение "LEPR" означает LEPR человека, если не указано, что он принадлежит к виду, не относящемуся к человеку, например "LEPR мыши", "LEPR обезьяны" и т.д.

Используемое в настоящем документе выражение "экспрессируемый на клеточной поверхности LEPR" означает один или несколько белков LEPR или их внеклеточный домен, которые экспрессируются на поверхности клетки *in vitro* или *in vivo*, так что, по меньшей мере, часть белка LEPR экспонируется на внеклеточной стороне клеточной мембраны и является доступной для антигенсвязывающей части антитела. "Экспрессируемый на клеточной поверхности LEPR" может содержать или состоять из белка LEPR, экспрессируемого на поверхности клетки, которая при обычных условиях (например, в нативном состоянии или в состоянии дикого типа) экспрессирует белок LEPR. Альтернативно, "экспрессируемый на клеточной поверхности LEPR" может содержать или состоять из белка LEPR, экспрессируемого на поверхности клетки, которая при обычных условиях не экспрессирует LEPR человека на своей поверхности, но была искусственно сконструирована, чтобы экспрессировать LEPR на своей поверхности.

Используемые в настоящем документе выражения, такие как "антитело к LEPR" или "антитело, которое связывается с лептиновым рецептором человека", включают в себя как моновалентные антитела с единственной специфичностью, а также биспецифические антитела, содержащие первое плечо, которое связывается с LEPR, и второе плечо, которое связывается со вторым (целевым) антигеном, причем плечо к LEPR содержит любую из последовательностей HCVR/LCVR или CDR, как представлено в табл. 1 в настоящем документе.

Используемый в настоящем документе термин "антитело" означает любую антигенсвязывающую молекулу или молекулярный комплекс, содержащие по меньшей мере одну определяющую комплементарность область (CDR), которая специфически связывается или взаимодействует с конкретным антигеном (например, LEPR). Термин "антитело" включает в себя молекулы иммуноглобулина, содержащие четыре полипептидные цепи, две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные между собой дисульфидными связями, а также их мультимеры (например, IgM). Каждая тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи (которая сокращенно в настоящем документе представлена как HCVR или V_H) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена, C_H1, C_H2 и C_H3. Каждая легкая цепь содержит переменную область легкой цепи (которая сокращенно в настоящем документе представлена как LCVR или V_L) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один домен (C_L1). Области V_H и V_L можно дополнительно подразделить на области гипервариабельности, которые называются определяющими комплементарность областями (CDR), которые чередуются с областями, которые являются более консервативными, которые называются каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от амино-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Согласно различным вариантам осуществления настоящего изобретения FR антитела к LEPR (или его антигенсвязывающей части) могут являться идентичными последовательностям зародышевой линии человека или могут являться естественно или синтетически модифицированными. Аминокислотную консенсусную последовательность можно определить на основании параллельного анализа двух или больше CDR.

Используемый в настоящем документе термин "антитело" также включает в себя антигенсвязывающие фрагменты полных молекул антитела. Используемые в настоящем документе термины "антигенсвязывающая часть" антитела, "антигенсвязывающий фрагмент" антитела и тому подобное включают в себя любой встречающийся в природе, полученный ферментативно, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, который специфически связывается с антигеном с образованием комплекса. Антигенсвязывающие фрагменты антитела можно получить, например, из полных молекул антитела с использованием любых подходящих стандартных техник, таких как протеолитическое расщепление или рекомбинантные техники генной инженерии, предусматривающие манипуляции с ДНК и экспрессию ДНК, кодирующую переменные и необязательно константные домены антитела. Такая ДНК известна и/или легко доступна, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК (включая в себя, например, фаговые библиотеки антител), или же ее можно синтезировать. ДНК можно секвенировать и воздействовать на нее химически или с использованием техник молекулярной биологии, например, для расположения одного или нескольких переменных и/или константных доменов в подходящую конфигурацию или для введения кодонов, создания цистеиновых остатков, модификации, добавления или удаления аминокислот и т.д.

Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают в себя следующее: (i) фрагменты Fab; (ii) фрагменты F(ab')₂; (iii) фрагменты Fd; (iv) фрагменты Fv; (v) одноцепочечные молекулы Fv (scFv); (vi) фрагменты dAb; и (vii) минимальные распознающие звенья, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гипервариабельную область антитела (например, выделенная оп-

ределяющая комплементарность область (CDR), такая как пептид CDR3) или пептид с ограниченной конформационной свободой FR3-CDR3-FR4. Другие сконструированные молекулы, такие как домен-специфические антитела, однодоменные антитела, антитела с удаленными доменами, химерные антитела, CDR-привитые антитела, диатела, триатела, тетратела, миниантитела, наноантитела (например моновалентные наноантитела, бивалентные наноантитела и т.д.), иммунофармацевтические средства на основе модульного белка малого размера (SMTP) и вариабельные домены IgNAR акулы, также предусмотренны используемым в настоящем документе выражением "антигенсвязывающий фрагмент".

Антигенсвязывающий фрагмент антитела, как правило, будет содержать по меньшей мере один вариабельный домен. Вариабельный домен может характеризоваться любым размером или аминокислотным составом и, как правило, будет содержать по меньшей мере одну CDR, которая является смежной или расположена в одной рамке считывания с одной или несколькими каркасными последовательностями. В антигенсвязывающих фрагментах, содержащих домен V_H , ассоциированный с доменом V_L , домены V_H и V_L могут быть расположены относительно друг друга в любом подходящем расположении. Например, вариабельная область может являться димерной и может содержать димеры V_H - V_H , V_H - V_L или V_L - V_L . Альтернативно, антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный домен V_H или V_L .

Согласно определенным вариантам осуществления антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать по меньшей мере один вариабельный домен, ковалентно связанный по меньшей мере с одним константным доменом. Неограничивающие, иллюстративные конфигурации вариабельных и константных доменов, которые можно обнаружить в пределах антигенсвязывающего фрагмента антитела согласно настоящему изобретению, включают в себя следующее: (i) V_H - C_H1 ; (ii) V_H - C_H2 ; (iii) V_H - C_H3 ; (iv) V_H - C_H1 - C_H2 ; (v) V_H - C_H1 - C_H2 - C_H3 ; (vi) V_H - C_H2 - C_H3 ; (vii) V_H - C_L ; (viii) V_L - C_H1 ; (ix) V_L - C_H2 ; (x) V_L - C_H3 ; (xi) V_L - C_H1 - C_H2 ; (xii) V_L - C_H1 - C_H2 - C_H3 ; (xiii) V_L - C_H2 - C_H3 и (xiv) V_L - C_L . В любой конфигурации вариабельных и константных доменов, включая в себя любую из иллюстративных конфигураций, перечисленных выше, вариабельные и константные домены могут быть либо напрямую связаны друг с другом, либо могут быть связаны с помощью полной или частичной шарнирной или линкерной области. Шарнирная область может состоять по меньшей мере из 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или больше) аминокислот, что дает в результате гибкое или полугибкое соединение между смежными вариабельными и/или константными доменами в одной полипептидной молекуле. Более того, антигенсвязывающий фрагмент антитела согласно настоящему изобретению может содержать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) любой из конфигураций вариабельных и константных доменов, перечисленных выше, в нековалентной ассоциации друг с другом и/или с одним или несколькими мономерными доменами V_H или V_L (например, с помощью дисульфидной(ых) связи(ей)).

Как и в случае с полными молекулами антитела, антигенсвязывающие фрагменты могут являться моноспецифическими или мультиспецифическими (например, биспецифическими). Мультиспецифический антигенсвязывающий фрагмент антитела, как правило, будет содержать по меньшей мере два различных вариабельных домена, причем каждый вариабельный домен способен специфически связываться с отдельным антигеном или с различным эпитопом на одном и том же антигене. Любой формат мультиспецифических антител, включая в себя иллюстративные форматы биспецифических антител, раскрытые в настоящем документе, можно адаптировать для применения в контексте антигенсвязывающего фрагмента антитела согласно настоящему изобретению с использованием стандартных техник, доступных в настоящей области техники.

Согласно определенным вариантам осуществления настоящего изобретения антитела к LEPR согласно настоящему изобретению представляют собой антитела человека. Подразумевается, что используемый в настоящем документе термин "антитело человека" включает в себя антитела с вариабельными и константными областями, происходящими из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Антитела человека согласно настоящему изобретению могут включать в себя аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека (например, мутации, введенные с помощью случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или соматической мутации *in vivo*), например, в CDR и, в частности, CDR3. Тем не менее, подразумевается, что используемый в настоящем документе термин "антитело человека" не включает в себя антитела, в которых последовательности CDR, происходящие из зародышевой линии другого вида млекопитающих, такого как мышь, были привиты на каркасные последовательности человека.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитела согласно настоящему изобретению могут представлять собой рекомбинантные антитела человека. Подразумевается, что используемый в настоящем документе термин "рекомбинантное антитело человека" включает в себя все антитела человека, которые получают, экспрессируют, создают или выделяют с помощью рекомбинантных способов, такие как антитела, экспрессируемые с использованием рекомбинантного экспрессионного вектора, трансфицированного в клетку-хозяина (описано дополнительно ниже), антитела, выделенные из рекомбинантной, комбинаторной библиотеки антител человека (описано дополнительно ниже), антитела, выделенные из организма животного (например, мыши), которое является трансгенным в отношении генов иммуноглобулина человека (см., например, Taylor et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295) или антитела, полу-

ченные, экспрессированные, созданные или выделенные с помощью любых других средств, которые включают в себя сплайсинг последовательностей генов иммуноглобулина человека с другими последовательностями ДНК. Такие рекомбинантные антитела человека содержат переменные и константные области, происходящие из последовательности иммуноглобулина зародышевой линии человека. Тем не менее, согласно определенным вариантам осуществления такие рекомбинантные антитела человека подвергают *in vitro* мутагенезу (или, если используют животное, которое является трансгенным в отношении последовательностей Ig человека, *in vivo* соматическому мутагенезу) и, таким образом, аминокислотные последовательности областей V_H и V_L рекомбинантных антител представляют собой последовательности, которые, наряду с тем, что они происходят из последовательностей V_H и V_L зародышевой линии человека и относятся к последовательностям V_H и V_L зародышевой линии человека, могут не существовать в природе в пределах репертуара антител зародышевой линии человека *in vivo*.

Настоящее изобретение относится к антителам с одной или несколькими мутациями в шарнирной области, области C_H2 или C_H3 , которые могут являться желательными, например, при получении, для улучшения выхода требуемой формы антител.

Антитела согласно настоящему изобретению могут представлять собой выделенные антитела. Используемый в настоящем документе термин "выделенное антитело" означает антитело, которое идентифицировали и отделили и/или извлекли по меньшей мере из одного компонента его природного окружения. Например, антитело, которое отделили или удалили по меньшей мере из одного компонента организма или из ткани или клетки, в которых антитело существует в природе или производится в природе, представляет собой "выделенное антитело" для целей настоящего изобретения. Выделенное антитело также включает в себя антитело *in situ* в рекомбинантной клетке. Выделенные антитела представляют собой антитела, подвергнутые по меньшей мере одной стадии очистки или выделения. Согласно определенным вариантам осуществления выделенное антитело может, по существу, не содержать другой клеточный материал и/или химические соединения.

Согласно настоящему изобретению предусмотрены варианты антител к LEPR, раскрытых в настоящем документе, содержащие одну или несколько аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасные области и/или области CDR переменных доменов тяжелой и легкой цепей по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии, из которых происходят антитела. Такие мутации можно легко установить путем сравнения аминокислотных последовательностей, раскрытых в настоящем документе, с последовательностями зародышевой линии, доступными, например, из общедоступных баз данных последовательностей антител. Согласно настоящему изобретению предусмотрены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые происходят из любой из аминокислотных последовательностей, раскрытых в настоящем документе, причем одна или несколько аминокислот в пределах одной или нескольких каркасных областей и/или областей CDR мутированы на соответствующий(е) остаток(остатки) последовательности зародышевой линии, из которой происходит антитело, или на соответствующий(е) остаток(остатки) другой последовательности зародышевой линии человека или на консервативную аминокислотную замену соответствующего(их) остатка(ов) зародышевой линии (такие изменения последовательности обобщенно в настоящем документе называются "мутациями зародышевой линии"). Средний специалист в настоящей области техники, начиная с последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепей, раскрытых в настоящем документе, может легко получить различные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или несколько отдельных мутаций зародышевой линии или их комбинации. Согласно определенным вариантам осуществления все остатки каркасной области и/или области CDR в пределах доменов V_H и/или V_L подвергают обратной мутации до остатков, встречающихся в исходной последовательности зародышевой линии, из которой происходит антитело. Согласно другим вариантам осуществления только определенные остатки подвергают обратной мутации до исходной последовательности зародышевой линии, например только мутированные остатки, встречающиеся в пределах первых 8 аминокислот FR1 или в пределах последних 8 аминокислот FR4, или только мутированные остатки, встречающиеся в пределах CDR1, CDR2 или CDR3. Согласно другим вариантам осуществления один или несколько остатков каркасной области и/или области CDR подвергают мутации на соответствующий(ие) остаток(остатки) отличающейся последовательности зародышевой линии (т.е. последовательности зародышевой линии, которая отличается от последовательности зародышевой линии, из которой антитело происходит изначально). Более того, антитела согласно настоящему изобретению могут содержать любую комбинацию из двух или больше мутаций зародышевой линии в пределах каркасных областей и/или областей CDR, например, причем определенные индивидуальные остатки мутированы на соответствующий остаток конкретной последовательности зародышевой линии, при этом другие определенные остатки, которые отличаются от исходной последовательности зародышевой линии сохраняются или подвергаются мутации на соответствующий остаток отличающейся последовательности зародышевой линии. После получения антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или несколько мутаций зародышевой линии, можно легко испытать в отношении одного или нескольких требуемых свойств, таких как улучшенная специфичность связывания, увеличенная аффинность связывания, усиленные или усиленные антагонистические или агонистические биологические свойства (в зависимости от конкретной ситуации), сниженная

иммуногенность и т.д. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, полученные этим общим способом, предусмотрены настоящим изобретением.

Согласно настоящему изобретению также предусмотрены антитела к LEPR, содержащие варианты любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, раскрытых в настоящем документе, с одной или несколькими консервативными заменами. Например, согласно настоящему изобретению предусмотрены антитела к LEPR с аминокислотными последовательностями HCVR, LCVR и/или CDR, например, с 10 или меньше, 8 или меньше, 6 или меньше, 4 или меньше и т.д. консервативными аминокислотными заменами по отношению к любой из набора аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, представленного в табл. 1 в настоящем документе. Согласно определенным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к антителам к LEPR, содержащим варианты аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR по отношению к последовательностям, представленным в табл. 1 в настоящем документе (например, содержащим консервативные аминокислотные замены), причем такие варианты антител, тем не менее, проявляют одну или несколько функций и/или свойств иллюстративных антител к LEPR, раскрытых в настоящем документе.

Термин "эпитоп" относится к антигенной детерминанте, которая взаимодействует со специфическим сайтом связывания с антигеном в вариабельной области молекулы антитела, известной как паратоп. Отдельный антиген может содержать больше одного эпитопа. Таким образом, различные антитела могут связываться с различными областями на антигене и могут характеризоваться различными биологическими эффектами. Эпитопы могут являться либо конформационными, либо линейными. Конформационный эпитоп образован пространственно смежными аминокислотами из различных сегментов неразветвленной полипептидной цепи. Линейный эпитоп образован смежными аминокислотными остатками в полипептидной цепи. В определенных случаях эпитоп может включать в себя фрагменты сахаридов, фосфорилированные группы или сульфонильные группы на антигене.

Согласно настоящему изобретению предусмотрены антитела к LEPR и их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат аминокислотные последовательности, которые являются, по существу, сходными или, по существу, идентичными одной или нескольким аминокислотным последовательностям вариабельного домена или CDR, встречающихся в любом из иллюстративных антител к LEPR, раскрытых в настоящем документе.

Применительно к полипептидам термин "существенное сходство" или "по существу, сходные" означает, что две пептидные последовательности, при оптимальном выравнивании, например, с помощью программ GAP или BESTFIT с использованием штрафов за введение пропусков по умолчанию, характеризуются по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей, даже более предпочтительно по меньшей мере 98% или 99% идентичностью последовательностей. Предпочтительно положения остатков, которые не являются идентичными, отличаются консервативными аминокислотными заменами. "Консервативная аминокислотная замена" представляет собой замену, в которой аминокислотный остаток замещен другим аминокислотным остатком, содержащим боковую цепь (группу R) со сходными химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). Как правило, консервативная аминокислота заменяется, по существу, не будет изменять функциональные свойства белка. В случаях, где две или больше аминокислотных последовательностей отличаются друг от друга консервативными заменами, идентичность последовательностей в процентах или степень сходства в процентах можно скорректировать в сторону увеличения, чтобы скорректировать консервативную природу замены. Средства для осуществления этой регуляции хорошо известны специалистам в настоящей области техники. См., например, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331, включенной в настоящий документ посредством ссылки. Примеры групп аминокислот, которые содержат боковые цепи со сходными химическими свойствами, включают в себя (1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; (2) алифатически-гидроксильные боковые цепи: серин и треонин; (3) амидсодержащие боковые цепи: аспарагин и глутамин; (4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; (5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; (6) кислотные боковые цепи: аспартат и глутамат, и (7) серосодержащие боковые цепи: цистеин и метионин. Предпочтительными группами консервативных аминокислотных замен являются следующие: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин. Альтернативно, консервативной заменой является любое изменение, характеризующееся положительным значением в матрице логарифмического правдоподобия PAM250, раскрытой в Gonnet et al. (1992) *Science* 256: 1443-1445, включенной в настоящий документ посредством ссылки. "Умеренно консервативная" замена представляет собой любое изменение, характеризующееся неотрицательным значением в логарифмической матрице правдоподобия PAM250.

Сходство последовательностей для полипептидов, которое также называют идентичностью последовательностей, как правило, измеряют с использованием программного обеспечения для анализа последовательностей. Программное обеспечение для анализа белка сопоставляет сходные последовательности с использованием показателей сходства, присвоенных различным заменам, делециям и другим модификациям, включая в себя консервативные аминокислотные замены. Например, программное обеспечение GCG содержит программы, такие как Gap и Bestfit, которые можно использовать с параметрами по

умолчанию для определения гомологии последовательностей или идентичности последовательностей между близко родственными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды из разных видов организмов или между белком дикого типа и его мутантом. См., например, GCG версии 6.1. Полипептидные последовательности также можно сравнить с использованием FASTA с использованием параметров по умолчанию или рекомендуемых параметров, программа в GCG версии 6.1. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) обеспечивает выравнивания и идентичность последовательностей в процентах областей наилучшего перекрытия между запрашиваемой последовательностью и последовательностями поиска (Pearson (2000) ранее). Другим предпочтительным алгоритмом при сравнении последовательностей согласно настоящему изобретению с базой данных, содержащей большое количество последовательностей из различных организмов, является компьютерная программа BLAST, особенно BLASTP или TBLASTN, с использованием параметров по умолчанию. См., например, Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 и Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-402, каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылки.

Антитела к LEPR, содержащие Fc-варианты.

Согласно определенным вариантам осуществления настоящего изобретения предусмотрены антитела к LEPR, содержащие Fc-домен, содержащие одну или несколько мутаций, которые усиливают или уменьшают связывание антитела с рецептором FcRn, например, при кислом значении pH по сравнению с нейтральным значением pH. Например, согласно настоящему изобретению предусмотрены антитела к LEPR, содержащие мутацию в области C_H2 или C_H3 Fc-домена, причем мутация(и) увеличивает(ют) аффинность Fc-домена по отношению к FcRn в кислой среде (например, в эндосоме, где pH находится в диапазоне от приблизительно 5,5 до приблизительно 6,0). Такие мутации могут приводить к увеличению периода полужизни антитела в сыворотке при введении животному. Неограничивающие примеры таких Fc-модификаций включают в себя, например, следующее: модификация в положении 250 (например, E или Q); 250 и 428 (например, L или F); 252 (например, L/Y/F/W или T), 254 (например, S или T) и 256 (например, S/R/Q/E/D или T); или модификация в положении 428 и/или 433 (например, H/L/R/S/P/Q или K) и/или 434 (например, H/F или Y); или модификация в положении 250 и/или 428; или модификация в положении 307 или 308 (например, 308F, V308F) и 434. Согласно одному варианту осуществления модификация содержит следующее: модификация 428L (например, M428L) и 434S (например, N434S); модификация 428L, 259I (например, V259I) и 308F (например, V308F); модификация 433K (например, H433K) и 434 (например, 434Y); модификация 252, 254 и 256 (например, 252Y, 254T и 256E); модификация 250Q и 428L (например, T250Q и M428L); и модификация 307 и/или 308 (например, 308F или 308P).

Например, согласно настоящему изобретению предусмотрены антитела к LEPR, содержащие Fc-домен, содержащий одну или несколько пар или групп мутаций, выбранных из группы, состоящей из: 250Q и 248L (например, T250Q и M248L); 252Y, 254T и 256E (например, M252Y, S254T и T256E); 428L и 434S (например, M428L и N434S); и 433K и 434F (например, H433K и N434F). Все возможные комбинации приведенных выше мутаций Fc-домена и другие мутации в пределах переменных доменов антитела, раскрытых в настоящем документе, предусмотрены объемом настоящего изобретения.

Антитела к LEPR согласно настоящему изобретению могут содержать модифицированный Fc-домен со сниженной эффекторной функцией. Используемый в настоящем документе термин "модифицированный Fc-домен со сниженной эффекторной функцией" означает любую Fc-часть иммуноглобулина, которую подвергли модификации, мутации, усечению и т.д. по отношению к встречающемуся в природе Fc-домену дикого типа так, чтобы молекула, содержащая модифицированный Fc, проявляла снижение тяжести или степени по меньшей мере одного эффекта, выбранного из группы, состоящей из следующего: уничтожение клеток (например, ADCC и/или CDC), активация комплемента, фагоцитоз и опсонизация, по отношению к молекуле сравнения, содержащей встречающуюся в природе версию Fc-части дикого типа. Согласно определенным вариантам осуществления "модифицированный Fc-домен со сниженной эффекторной функцией" представляет собой Fc-домен со сниженным или ослабленным связыванием с Fc-рецептором (например, FcγR).

Согласно определенным вариантам осуществления настоящего изобретения модифицированный Fc-домен представляет собой вариантный Fc IgG1 или вариантный Fc IgG4, содержащий замену в шарнирной области. Например, модифицированный Fc для применения в контексте настоящего изобретения может содержать вариантный Fc IgG1, в котором по меньшей мере одна аминокислота шарнирной области Fc IgG1 заменена соответствующей аминокислотой из шарнирной области Fc IgG2. Альтернативно, модифицированный Fc для применения в контексте настоящего изобретения может содержать вариантный Fc IgG4, в котором по меньшей мере одна аминокислота шарнирной области Fc IgG4 заменена соответствующей аминокислотой из шарнирной области Fc IgG2.

Неограничивающие, иллюстративные модифицированные Fc-области, которые можно использовать в контексте настоящего изобретения, представлены в публикации заявки на выдачу патента США № 2014/0243504, полное раскрытие которой включено в настоящий документ посредством ссылки, а также любые функционально эквивалентные варианты модифицированных Fc-областей, представленных в ней.

Другие модифицированные Fc-домены и Fc-модификации, которые можно использовать в контек-

сте настоящего изобретения, включают в себя любую из модификаций, представленных в заявке на выдачу патента США № US 2014/0171623; патенте США № US 8697396; заявке на выдачу патента США № US 2014/0134162; международной патентной публикации № WO 2014/043361, полное раскрытие которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Способы конструирования антител или других антигенсвязывающих слитых белков, содержащих модифицированный Fc-домен, как описано в настоящем документе, известны в настоящей области техники.

Биологические характеристики антител.

Согласно настоящему изобретению предусмотрены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с LEPR человека и проявляют антагонизм в отношении передачи сигнала LEPR. Такие антитела могут в настоящем документе называться "антагонистические антитела." В контексте настоящего изобретения "антагонист передачи сигнала LEPR" означает антитело или его фрагмент, которые связываются с LEPR и ингибируют внутриклеточный эффект, который при нормальных условиях является результатом взаимодействия лептина с LEPR в клетках, которые экспрессируют LEPR. Согласно различным вариантам осуществления антагонистические антитела согласно настоящему изобретению ингибируют функцию агонистов LEPR и/или функцию частичных агонистов LEPR. Согласно определенным вариантам осуществления "антагонистическое действие в отношении передачи сигнала LEPR" означает ингибирование стимулированной лептином транскрипционной активации STAT3, что можно обнаружить с использованием любого способа, который может измерять или идентифицировать, напрямую или опосредованно, активность STAT3, например, с использованием меченой версии STAT3, экспрессированной в репортерной клеточной линии. Например, согласно настоящему изобретению предусмотрены антагонистические антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые отрицательно регулируют передачу сигнала LEPR в клеточном анализе с использованием репортерных генов, как описано в примере 6, или, по существу, сходном анализе. Согласно настоящему изобретению также предусмотрены антагонистические антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые демонстрируют полное ингибирование индуцированной лептином передачи сигнала LEPR со значениями IC_{50} в диапазоне от 723 пМ до 1,8 нМ в анализе согласно примеру 6 или, по существу, аналогичном анализе. Клеточные анализы связывания, которые обнаруживают связывание антител с клетками, экспрессирующими LEPR, такие как анализ, описанный в примере 5 в настоящем документе, продемонстрировали связывание с клетками HEK293/hLEPR-GPI с отношениями связывания, которые в 824-3187 раз отличались от значения без лептина и в 398-3106 раз отличались от значения в присутствии 1 мкМ лептина. Обнаружено, что антитела согласно настоящему изобретению связываются с LEPR даже в присутствии избытка лептина в концентрации 1 мкМ, что указывает на то, что антитела к LEPR согласно настоящему изобретению связываются с сайтами на hLEPR, которые не перекрываются с сайтами связывания лептина. Согласно настоящему изобретению также предусмотрены антитела к LEPR, которые проявляют антагонизм в отношении передачи сигнала лептина, но также стимулируют частичную передачу сигнала LEPR при отсутствии лептина; такие антитела также в настоящем документе называются "частичные агонисты" или "антитела, которые проявляют агонизм в отношении передачи сигнала LEPR".

Согласно определенным иллюстративным вариантам осуществления настоящего изобретения предусмотрены антитела к LEPR, которые связываются с димерным LEPR человека (hLEPR.hFc, SEQ ID NO: 92) в присутствии и при отсутствии лептина, при этом ни одно из антител согласно настоящему изобретению не продемонстрировало больше чем 40% блокаду взаимодействия LEPR:лептин, например, с использованием формата анализа, как определено в примере 4 в настоящем документе, или, по существу, сходного анализа.

Согласно настоящему изобретению предусмотрены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с мономерным LEPR человека с высокой аффинностью. Например, согласно настоящему изобретению предусмотрены антитела к LEPR, которые связываются с мономерным LEPR человека (например, hLEPR.mmh, SEQ ID NO: 90) со значением K_D , составляющим меньше чем приблизительно 10 нМ, как измерено с помощью поверхностного плазмонного анализа при 25°C, или меньше чем приблизительно 25 нМ, как измерено с помощью поверхностного плазмонного анализа при 37°C, например с использованием формата анализа, как определено в примере 3 в настоящем документе, или, по существу, сходного анализа. Согласно определенным вариантам осуществления предусмотрены антитела к LEPR, которые связываются с мономерным LEPR человека при 25°C со значением K_D , составляющим меньше чем приблизительно 12 нМ, меньше чем приблизительно 11 нМ, меньше чем приблизительно 10 нМ, меньше чем приблизительно 9 нМ, меньше чем приблизительно 8 нМ, меньше чем приблизительно 7 нМ, меньше чем приблизительно 6 нМ, меньше чем приблизительно 5 нМ, меньше чем приблизительно 4 нМ, меньше чем приблизительно 3 нМ, меньше чем приблизительно 2 нМ, меньше чем приблизительно 1 нМ, меньше чем приблизительно 900 пМ, меньше чем приблизительно 800 пМ, меньше чем приблизительно 700 пМ, меньше чем приблизительно 600 пМ, меньше чем приблизительно 500 пМ, меньше чем приблизительно 400 пМ, меньше чем приблизительно 300 пМ, меньше чем приблизительно 200 пМ или меньше чем приблизительно 100 пМ, как измерено с помощью поверхностного плазмонного анализа, например с использованием формата анализа, как определено в примере 3 в настоящем документе, или, по существу, сходного анализа.

Согласно настоящему изобретению также предусмотрены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с мономерным LEPR человека (например, hLEPR.mmh, SEQ ID NO: 90) со значением диссоциативного периода полужизни ($t^{1/2}$), составляющим больше чем приблизительно 5 мин, как измерено с помощью поверхностного плазмонного анализа при 25°C, или больше чем приблизительно 1 мин, как измерено с помощью поверхностного плазмонного анализа при 37°C, например с использованием формата анализа, как определено в примере 3 в настоящем документе, или, по существу, сходного анализа. Согласно определенным вариантам осуществления предусмотрены антитела к LEPR, которые связываются с мономерным LEPR человека при 25°C со значением $t/4$, составляющим больше чем приблизительно 5 мин, больше чем приблизительно 10 мин, больше чем приблизительно 20 мин, больше чем приблизительно 40 мин, больше чем приблизительно 50 мин или дольше, как измерено с помощью поверхностного плазмонного анализа, например с использованием формата анализа, как определено в примере 3 в настоящем документе, или, по существу, сходного анализа.

Согласно настоящему изобретению также предусмотрены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с димерным LEPR человека (например, hLEPR.mFc, SEQ ID NO: 91) с высокой аффинностью. Например, согласно настоящему изобретению предусмотрены антитела к LEPR, которые связываются с димерным LEPR человека (например, hLEPR.mFc, SEQ ID NO: 91) со значением K_D , составляющим меньше чем приблизительно 4 нМ, как измерено с помощью поверхностного плазмонного анализа при 25 или 37°C, например с использованием формата анализа, как определено в примере 3 в настоящем документе, или, по существу, сходного анализа. Согласно определенным вариантам осуществления предусмотрены антитела к LEPR, которые связываются с димерным LEPR человека при 25°C со значением K_D , составляющим меньше чем приблизительно 15 нМ, меньше чем приблизительно 10 нМ, меньше чем приблизительно 9,0 нМ, меньше чем приблизительно 8,0 нМ, меньше чем приблизительно 7,0 нМ, меньше чем приблизительно 6,0 нМ, меньше чем приблизительно 5,0 нМ, меньше чем приблизительно 4,0 нМ, меньше чем приблизительно 3,0 нМ, меньше чем приблизительно 2,0 нМ, меньше чем приблизительно 1,0 нМ, меньше чем приблизительно 900 пМ, меньше чем приблизительно 800 пМ, меньше чем приблизительно 700 пМ, меньше чем приблизительно 600 пМ, меньше чем приблизительно 500 пМ, меньше чем приблизительно 400 пМ, меньше чем приблизительно 300 пМ, меньше чем приблизительно 200 пМ, или меньше чем приблизительно 100 пМ, как измерено с помощью поверхностного плазмонного анализа, например с использованием формата анализа, как определено в примере 3 в настоящем документе, или, по существу, сходного анализа.

Согласно настоящему изобретению также предусмотрены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с димерным LEPR человека (например, hLEPR.mFc, SEQ ID NO: 91) со значением диссоциативного периода полужизни ($t^{1/2}$), составляющим больше чем приблизительно 10 мин, как измерено с помощью поверхностного плазмонного анализа при 25 или 37°C, например с использованием формата анализа, как определено в примере 3 в настоящем документе, или, по существу, сходного анализа. Согласно определенным вариантам осуществления предусмотрены антитела к LEPR, которые связываются с димерным LEPR человека при 25°C со значением $t^{1/2}$, составляющим больше чем приблизительно 15 мин, приблизительно 20 мин, больше чем приблизительно 30 мин, больше чем приблизительно 40 мин, больше чем 50 мин, больше чем приблизительно 60 мин, больше чем приблизительно 70 мин, больше чем 80 мин, больше чем 90 мин, больше чем 100 мин или дольше, как измерено с помощью поверхностного плазмонного анализа, например с использованием формата анализа, как определено в примере 3 в настоящем документе, или, по существу, сходного анализа.

Согласно настоящему изобретению также предусмотрены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с LEPR в комплексе с лептином человека (выражение "LEPR в комплексе с лептином человека" также может быть представлено выражением "лептин:LEPR"). Например, согласно настоящему изобретению предусмотрены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые способны связываться с предварительно образованным комплексом, содержащим hLEPR и лептин человека. Другими словами, согласно определенным вариантам осуществления взаимодействие между антителами к LEPR и LEPR не ингибируется присутствием лептина в комплексе с LEPR; аналогично, взаимодействие между лептином и LEPR согласно настоящему аспекту настоящего изобретения не ингибируется присутствием антитела к LEPR. Иллюстративный формат анализа для определения того, связывается ли антитело или его антигенсвязывающий фрагмент с LEPR в комплексе с лептином человека, представлен в примере 4 в настоящем документе.

Согласно настоящему изобретению также предусмотрены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с экспрессируемым на клеточной поверхности LEPR в присутствии и/или при отсутствии лептина человека. Экспрессируемый на клеточной поверхности LEPR означает LEPR или его часть (например, внеклеточную часть LEPR), экспрессируемые на поверхности клетки, или в природных условиях, или в сконструированной клеточной линии, так чтобы антитело или его антигенсвязывающий фрагмент были способны связываться с молекулой LEPR. Согласно определенным вариантам осуществления экспрессируемый на клеточной поверхности LEPR включает в себя рекомбинантные комплексы, содержащие внеклеточный домен LEPR, соединенный с клеткой посредством метки или якоря (например, якоря GPI, как проиллюстрировано в примере 6 в настоящем документе). Согласно на-

стоящему аспекту настоящего изобретения предусмотрены антитела, которые способны связываться с экспрессируемым на клеточной поверхности LEPR при отсутствии лептина, а также способны связываться с экспрессируемым на клеточной поверхности LEPR в присутствии лептина (т.е. при условиях, когда лептин способен связываться с экспрессируемым на клеточной поверхности LEPR). Иными словами, согласно определенным вариантам осуществления взаимодействие между антителами к LEPR и экспрессируемым на клеточной поверхности LEPR не ингибируется присутствием лептина в комплексе с экспрессируемым на клеточной поверхности LEPR. Антитела согласно настоящему аспекту настоящего изобретения способны образовывать трехчленный комплекс на поверхности клетки, содержащий антитело, экспрессируемый на клеточной поверхности LEPR и лептин. Иллюстративный формат анализа для определения того, способно ли антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываться с экспрессируемым на клеточной поверхности LEPR в присутствии и при отсутствии лептина человека, представлен в примере 5 в настоящем документе.

Антитела согласно настоящему изобретению могут обладать одной или несколькими вышеупомянутыми биологическими характеристиками или любой их комбинацией. Предполагается, что приведенный выше перечень биологических характеристик антител согласно настоящему изобретению не является исчерпывающим. Другие биологические характеристики антител согласно настоящему изобретению станут очевидны среднему специалисту в настоящей области техники из обзора настоящего раскрытия, включая в себя демонстрационные примеры в настоящем документе.

Картинирование эпитопов и родственные технологии.

Эпитоп, с которым связываются антитела согласно настоящему изобретению, может состоять из отдельной непрерывной последовательности из 3 или больше (например, 3,4,5,6,7,8,9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или больше) аминокислот белка LEPR. Альтернативно, эпитоп может состоять из множества несмежных аминокислот (или аминокислотных последовательностей) LEPR. Согласно некоторым вариантам осуществления эпитоп расположен на лептинсвязывающем домене LEPR или вблизи него. Согласно другим вариантам осуществления эпитоп расположен на области, удаленной от лептинсвязывающего домена LEPR, например в положении на поверхности LEPR, на котором антитело, будучи связанным с таким эпитопом, не препятствует связыванию лептина с LEPR.

Различные техники, известные средним специалистам в настоящей области техники, можно использовать для идентификации аминокислот в пределах эпитопа, распознаваемого конкретным антителом. Иллюстративные техники включают в себя, например, анализ с помощью аланин-сканирующего мутагена, пептидный блоттинг и анализ расщепления пептидов. Кроме того, можно использовать такие способы, как вырезание эпитопов, экстракция эпитопов и химическая модификация антигенов (Tomer (2000) *Protein Science* 9:487-496). Другим способом, который можно применять для идентификации аминокислот в полипептиде, с которым взаимодействует антитело, является водородно-дейтериевый обмен, обнаруживаемый посредством масс-спектрометрии. В общих чертах, способ водородно-дейтериевого обмена предусматривает мечение дейтерием представляющего интерес белка с последующим связыванием антитела с меченным дейтерием белком. Затем комплекс белок-антитело переносят в воду, чтобы позволить произойти обмену водорода на дейтерий на всех остатках, за исключением остатков, защищенных антителом (которые остаются меченными дейтерием). После диссоциации антитела целевой белок подвергают протеазному расщеплению и масс-спектрометрическому анализу, таким образом выявляя меченные дейтерием остатки, которые соответствуют конкретным аминокислотам, с которыми взаимодействует антитело. См., например, Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267(2):252-259; Engen and Smith(2001)*Anal.Chem.* 73:256A-265A. Рентгеноструктурный анализ антитела в комплексе с его антигеном также можно использовать для идентификации аминокислот в пределах полипептида, с которым взаимодействует антитело.

Настоящее изобретение дополнительно включает в себя антитела к LEPR, которые связываются с тем же эпитопом, что и любое из конкретных иллюстративных антител, описанных в настоящем документе (например, антител, содержащих любую из аминокислотных последовательностей, как представлено в табл. 1 в настоящем документе). Аналогично, согласно настоящему изобретению также предусмотрены антитела к LEPR, которые конкурируют за связывание с LEPR с любым из конкретных иллюстративных антител, описанных в настоящем документе (например, антител, содержащих любую из аминокислотных последовательностей, как представлено в табл. 1 в настоящем документе).

Можно определить, связывается ли антитело с тем же эпитопом, что и эталонное антитело к LEPR, или конкурирует ли за связывание с эталонным антителом к LEPR с использованием общепринятых способов, известных в настоящей области техники и проиллюстрированных в настоящем документе. Например, для определения того, связывается ли исследуемое антитело с тем же эпитопом, что эталонное антитело к LEPR согласно настоящему изобретению, эталонному антителу позволяют связаться с белком LEPR. Далее оценивают способность исследуемого антитела связываться с молекулой LEPR. Если исследуемое антитело способно связываться с LEPR после насыщающего связывания с эталонным антителом к LEPR, можно сделать вывод, что исследуемое антитело связывается с другим эпитопом, чем эталонное антитело к LEPR. С другой стороны, если исследуемое антитело не способно связываться с молекулой LEPR после насыщающего связывания с эталонным антителом к LEPR, то исследуемое антитело

может связываться с тем же эпитопом, что и эпитоп, с которым связывается эталонное антитело к LEPR согласно настоящему изобретению. Дополнительные общепринятые эксперименты (например, анализы мутаций в пептиде и анализы связывания) затем можно провести для подтверждения того, действительно ли наблюдаемое отсутствие связывания исследуемого антитела связано со связыванием с тем же эпитопом, что и у эталонного антитела, или же стерическое блокирование (или другое явление) отвечает за отсутствие наблюдаемого связывания. Эксперименты такого рода можно выполнить с использованием ELISA, RIA, Biacore, проточной цитометрии или любого другого количественного или качественного анализа связывания антител, доступного в настоящей области техники. Согласно определенным вариантам осуществления настоящего изобретения два антитела связываются с одним и тем же (или перекрывающимся) эпитопом, если, например, 1-, 5-, 10-, 20- или 100-кратный избыток одного антитела ингибирует связывание другого по меньшей мере на 50%, но предпочтительно на 75, 90 или даже на 99% согласно измерению в анализе конкурентного связывания (см., например, Junghans et al. (1990) *Cancer Res.* 50:1495-1502). Альтернативно, считается, что два антитела связываются с одним и тем же эпитопом, если, по существу, все аминокислотные мутации в антигене, которые снижают или устраняют связывание одного антитела, снижают или устраняют связывание другого. Считается, что два антитела характеризуются "перекрывающимися эпитопами", если только подгруппа аминокислотных мутаций, которые снижают или устраняют связывание одного антитела, снижают или устраняют связывание другого.

Для определения того, конкурирует ли антитело за связывание (или перекрестно конкурирует за связывание) с эталонным антителом к LEPR, описанную выше методику связывания проводят в двух ориентациях. В первой ориентации эталонному антителу позволяют связаться с белком LEPR при насыщающих условиях с последующей оценкой связывания исследуемого антитела с молекулой LEPR. Во второй ориентации исследуемому антителу позволяют связаться с молекулой LEPR при насыщающих условиях с последующей оценкой связывания эталонного антитела с молекулой LEPR. Если, в обеих ориентациях, только первое (насыщающее) антитело способно связываться с молекулой LEPR, то можно сделать вывод о том, что исследуемое антитело и эталонное антитело конкурируют за связывание с LEPR. Среднему специалисту в настоящей области техники понятно, что антитело, которое конкурирует за связывание с эталонным антителом, может необязательно связываться с тем же эпитопом, что и эталонное антитело, но может стерически блокировать связывание эталонного антитела за счет связывания с перекрывающимся или смежным эпитопом.

Получение антител человека.

Антитела к LEPR согласно настоящему изобретению могут представлять собой полностью человеческие антитела. Способы получения моноклональных антител, включая в себя полностью человеческие моноклональные антитела, известны в настоящей области техники. Любые такие известные способы можно использовать в контексте настоящего изобретения для получения антител человека, которые специфически связываются с LEPR человека.

С использованием технологии, например, VELOCIMMUNE™ или любого другого сходного известного способа для создания полностью человеческих моноклональных антител вначале выделяют высокоаффинные химерные антитела к LEPR с вариабельной областью человека и константной областью мыши. Как и в разделе экспериментов ниже, антитела охарактеризованы и выбраны для требуемых характеристик, включая в себя аффинность, активность блокирования лиганда, селективность, эпитоп и т.д. При необходимости константные области мыши заменяют требуемой константной областью человека, например IgG1 или IgG4 дикого типа или модифицированным IgG1 или IgG4 для создания полностью человеческого антитела к LEPR. В то время как выбранная константная область может варьироваться в зависимости от конкретного применения, характеристики высокой аффинности связывания антигена и целевой специфичности находятся в вариабельной области. В определенных случаях полностью человеческие антитела к LEPR выделяют непосредственно из антигенполижительных В-клеток.

Биоэквиваленты.

Антитела к LEPR и фрагменты антител согласно настоящему изобретению охватывают белки с аминокислотными последовательностями, которые могут отличаться от аминокислотных последовательностей описанных антител, но которые сохраняют способность связываться с LEPR человека. Такие варианты антител и фрагменты антител содержат одну или несколько вставок, делеций или замен аминокислот по сравнению с исходной последовательностью, но проявляют биологическую активность, которая является, по существу, эквивалентной активности описанных антител. Аналогично, последовательности ДНК, кодирующие антитело к LEPR, согласно настоящему изобретению охватывают последовательности, которые содержат одну или несколько вставок, делеций или замен нуклеотидов по сравнению с раскрытой последовательностью, но которые кодируют антитело к LEPR или фрагмент антитела, которые являются, по существу, биоэквивалентом по отношению к антителу к LEPR или фрагменту антитела согласно настоящему изобретению. Примеры таких вариантных аминокислотных последовательностей и последовательностей ДНК обсуждаются выше.

Два антигенсвязывающих белка, или антитела, считаются биоэквивалентными, если, например, они представляют собой фармацевтические эквиваленты или фармацевтические альтернативы, скорость и степень абсорбции которых не показывают значительного различия при введении в одной и той же мо-

лярной дозе в аналогичных условиях эксперимента, либо в виде одной дозы, либо в виде нескольких доз. Некоторые антитела будут считаться эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, если они эквивалентны по степени их абсорбции, но не по скорости их абсорбции, и все же их можно считать биоэквивалентными, поскольку такие различия в скорости абсорбции являются преднамеренными и отражены на этикетке, не имеют существенного значения для достижения эффективных концентраций лекарственного средства в организме, например, при постоянном применении, и считаются с медицинской точки зрения незначительными для конкретного исследуемого лекарственного средства.

Согласно одному варианту осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если отсутствуют клинически значимые различия в их безопасности, чистоте и эффективности.

Согласно одному варианту осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если пациент может переключаться один или несколько раз между эталонным продуктом и биологическим продуктом без ожидаемого увеличения риска неблагоприятных эффектов, включая в себя клинически значимое изменение иммуногенности или пониженную эффективность, по сравнению с продолжением терапии без такого переключения.

Согласно одному варианту осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если оба они действуют посредством общего механизма или механизмов действия для условия или условий использования, в той степени, в которой такие механизмы являются известными.

Биоэквивалентность можно продемонстрировать с помощью способов *in vivo* и *in vitro*. Измерения биоэквивалентности включают в себя, например, (a) тест *in vivo* у людей или других млекопитающих, в котором концентрацию антитела или его метаболитов измеряют в крови, плазме, сыворотке или другой биологической жидкости как функцию времени; (b) тест *in vitro*, который был коррелирован с данными о биодоступности *in vivo* у человека и является обоснованно прогностическим в отношении этих данных; (c) тест *in vivo* у людей или других млекопитающих, в котором соответствующий острый фармакологический эффект антитела (или его мишени) измеряют как функцию времени; и (d) хорошо контролируемое клиническое испытание, которое устанавливает безопасность, эффективность или биодоступность или биоэквивалентность антитела.

Биоэквивалентные варианты антител к LEPR согласно настоящему изобретению можно сконструировать, например, путем осуществления различных замен остатков или последовательностей или удаления концевых или внутренних остатков или последовательностей, не являющихся необходимыми для биологической активности. Например, остатки цистеина, не являющиеся необходимыми для биологической активности, можно удалить или заменить другими аминокислотами для предотвращения образования ненужных или неправильных внутримолекулярных дисульфидных мостиков при ренатурации. В других контекстах биоэквивалентные антитела могут включать в себя варианты антител к LEPR, содержащие аминокислотные замены, которые модифицируют характеристики гликозилирования антител, например мутации, которые устраняют или удаляют гликозилирование.

Видовая селективность и видовая перекрестная реактивность.

Настоящее изобретение согласно определенным вариантам осуществления относится к антителам к LEPR, которые связываются с LEPR человека, но не с LEPR других видов. Согласно настоящему изобретению также предусмотрены антитела к LEPR, которые связываются с LEPR человека и с LEPR одного или нескольких не относящихся к человеку видов. Например, антитела к LEPR согласно настоящему изобретению могут связываться с LEPR человека и могут связываться или не связываться, в зависимости от обстоятельств, с одним или несколькими из следующего: LEPR мыши, крысы, морской свинки, хомяка, песчанки, свиньи, кошки, собаки, кролика, козы, овцы, коровы, лошади, верблюда, яванского макака, мартышки, макаки-резус или шимпанзе. В соответствии с определенными иллюстративными вариантами осуществления настоящего изобретения предусмотрены антитела к LEPR, которые специфически связывают LEPR человека и LEPR яванского макака (например, *Macaca fascicularis*). Другие антитела к LEPR согласно настоящему изобретению связываются с LEPR человека, но не связываются или слабо связываются с LEPR яванского макака.

Мультиспецифические антитела.

Антитела согласно настоящему изобретению могут являться моноспецифическими или мультиспецифическими (например, биспецифическими). Мультиспецифические антитела могут являться специфическими в отношении различных эпитопов на одном целевом полипептиде или могут содержать антигенсвязывающие домены, специфические в отношении более одного целевого полипептида. См., например, Tutt et al. (1991) J. Immunol. 147:60-69; Kufer et al. (2004) Trends Biotechnol. 22:238-244. Антитела к LEPR согласно настоящему изобретению могут быть связаны с другой функциональной молекулой или коэкспрессироваться с другой функциональной молекулой, например другим пептидом или белком. Например, антитело или его фрагмент может являться функционально связанным (например, путем химической связи, генетического слияния, нековалентной ассоциации или иным образом) с одной или несколькими другими молекулярными сущностями, такими как другое антитело или фрагмент антитела, с получением биспецифического или мультиспецифического антитела со второй специфичностью связывания.

Согласно настоящему изобретению предусмотрены биспецифические антитела, в которых одно

плечо иммуноглобулина связывается с LEPR человека, в другое плечо иммуноглобулина является специфическим в отношении второго антигена. LEPR-связывающее плечо может содержать любую из аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR или CDR, как представлено в табл. 1 в настоящем документе.

Иллюстративный формат биспецифических антител, который можно использовать в контексте настоящего изобретения, предусматривает применение первого домена C_H3 иммуноглобулина (Ig) и второго домена C_H3 Ig, причем первый и второй домены C_H3 Ig отличаются друг от друга по меньшей мере одной аминокислотой, и при этом, по меньшей мере, различие на одну аминокислоту снижает связывание биспецифического антитела с белком А по сравнению с биспецифическим антителом, в котором отсутствует различие по аминокислотам. Согласно одному варианту осуществления первый домен C_H3 Ig связывается с белком А, а второй домен C_H3 Ig содержит мутацию, которая снижает или устраняет связывание с белком А, такую как модификация H95R (согласно нумерации экзонов IMGT; H435R согласно нумерации EU). Второй C_H3 может дополнительно содержать модификацию Y96F (согласно IMGT; Y436F согласно EU). Дополнительные модификации, которые можно обнаружить в пределах второго C_H3, включают в себя: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M и V82I (согласно IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M и V422I согласно EU) в случае антител IgG1; N44S, K52N и V82I (IMGT; N384S, K392N и V422I согласно EU) в случае антител IgG2; и Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q и V82I (согласно IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q и V422I согласно EU) в случае антител IgG4. Варианты описанного выше формата биспецифических антител предусмотрено объемом настоящего изобретения.

Другие иллюстративные биспецифические форматы, которые можно использовать в контексте настоящего изобретения, включают в себя без ограничения, например, основанные на scFv биспецифические форматы или биспецифические форматы - диатела, слияния IgG-scFv, двойной вариабельный домен (DVD)-Ig, квадрама, выступы-во-впадины, общая легкая цепь (например, общая легкая цепь с выступами-во-впадины и т.д.), CrossMab, CrossFab, антитело, содержащее домен, сконструированный с помощью замены цепей (SEED), лейциновая "молния", Duobody, IgG1/IgG2, Fab (DAF)-IgG двойного действия и Mab² биспецифические форматы (см., например, Klein et al. (2012) mAbs 4:6, 1-11, и ссылки, процитированные в ней, для обзора приведенных выше форматов). Биспецифические антитела также можно сконструировать с использованием конъюгирования пептида с нуклеиновой кислотой, например, в котором неприродные аминокислоты с отличающейся химической реакционной способностью используют для создания сайт-специфических конъюгатов антитела с олигонуклеотидом, которые затем подвергаются самосборке в мультимерные комплексы с заданным составом, валентностью и геометрией. (См., например, Kazane et al., J. Am. Chem. Soc. (Epub: Dec. 4, 2012)).

Терапевтический состав и введение.

Настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим антитела к LEPR или их антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению. Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению вводят в состав с подходящими носителями, вспомогательными веществами и другими средствами, которые обеспечивают улучшенную транспортировку, доставку, переносимость и тому подобное. Множество приемлемых составов можно найти в рецептурном справочнике, известном всем химикам-фармацевтам: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Эти составы включают в себя, например, порошки, пасты, мази, желе, воски, масла, липиды, содержащие липиды (катионные или анионные) везикулы (такие как LIPOFECTIN™, Life Technologies, Carlsbad, CA), ДНК-конъюгаты, безводные абсорбирующие пасты, эмульсии масло-в-воде и вода-в-масле, эмульсии карбовакс (полиэтиленгликоли с различными молекулярными массами), полутвердые гели и полутвердые смеси, содержащие карбовакс. См. также Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311.

Вводимая пациенту доза антитела может варьироваться в зависимости от возраста и размеров пациента, целевого заболевания, состояний, пути введения и тому подобного. Предпочтительную дозу, как правило, рассчитывают в зависимости от массы тела или площади поверхности тела. У взрослого пациента, благоприятным является внутривенное введение антитела согласно настоящему изобретению, как правило, в однократной дозе, составляющей приблизительно 0,01 - приблизительно 20 мг/кг массы тела, более предпочтительно приблизительно 0,02 - приблизительно 7, приблизительно 0,03 - приблизительно 5 или приблизительно 0,05 - приблизительно 3 мг/кг массы тела. В зависимости от тяжести состояния частота и продолжительность лечения могут быть скорректированы. Эффективные дозировки и схемы введения антител к LEPR можно определить опытным путем, например прогрессирование пациента можно подвергать мониторингу путем периодической оценки, и дозу можно корректировать соответствующим образом. Более того, межвидовой пересчет дозировок можно выполнить с использованием хорошо известных способов в настоящей области техники (например, Mordenti et al. (1991) Pharmaceut. Res. 5:1351).

Известны различные системы доставки, которые можно использовать для введения фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, например инкапсуляция в липосомы, микрокапсулы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать мутантные вирусы, опосредо-

ванный рецептором эндоцитоз (см., например, Wu et al. (1987) J. Biol. Chem. 262:4429-4432). Способы введения включают в себя без ограничения внутривенные, внутримышечные, интраперитонеальные, внутривенные, подкожные, интраназальные, эпидуральные и пероральные пути. Композицию можно вводить любым удобным путем, например путем инфузии или болюсной инъекции, путем абсорбции через эпителиальные или слизистые оболочки (например, через слизистую оболочку полости рта, слизистую оболочку прямой кишки и кишечника и т.д.) и можно вводить вместе с другими биологически активными средствами. Введение может являться системным или местным.

Фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению можно доставлять подкожно или внутривенно с помощью стандартной иглы и шприца. Кроме того, в отношении подкожной доставки, устройство доставки шприц-ручка легко находит применение при доставке фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению. Такое устройство доставки шприц-ручка может являться многоразовым или одноразовым. В многоразовом устройстве доставки шприц-ручка, как правило, используют сменный картридж, который содержит фармацевтическую композицию. Как только вся фармацевтическая композиция в картридже введена и картридж пуст, пустой картридж можно легко выбросить и заменить новым картриджем, который содержит фармацевтическую композицию. После этого устройство доставки шприц-ручку можно повторно использовать. В одноразовом устройстве доставки шприц-ручке нет сменного картриджа. Напротив, одноразовое устройство доставки шприц-ручка поставляется предварительно заполненным фармацевтической композицией, содержащейся в резервуаре внутри устройства. Как только резервуар опорожняется от фармацевтической композиции, все устройство выбрасывают.

Многочисленные многоразовые устройства доставки шприцы-ручки и автоинъекторы находят применение в подкожной доставке фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению. Примеры включают в себя без ограничения следующее: AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK), шприц-ручка DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Burghdorf, Switzerland), шприц-ручка HUMALOG MIX 75/25™, шприц-ручка HUMALOG™, шприц-ручка HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Indianapolis, Ind.), NOVOPEN™ I, II и III (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), шприц-ручка BD™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, N.J.), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ и OPTICLIK™ (sanofi-Aventis, Frankfurt, Germany), называя лишь несколько из них. Примеры одноразовых устройств доставки шприц-ручка, находящихся свое применение в подкожной доставке фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, включают в себя без ограничения следующее: шприц-ручка SOLOSTAR™ (sanofi-aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) и KWIKPEN™ (Eli Lilly), автоинъектор SURECLICK™ (Amgen, Thousand Oaks, Calif.), PENLET™ (Haselmeier, Stuttgart, Germany), EPIPEN (Dey, L.P.) и шприц-ручка HUMIRA™ (Abbott Labs, Abbott Park, Ill.), называя лишь несколько из них.

В определенных ситуациях фармацевтическую композицию можно доставлять в системе контролируемого высвобождения. Согласно одному варианту осуществления можно использовать насос (см. Langer, ранее; Sefton (1987) CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201). Согласно другому варианту осуществления можно использовать полимерные материалы; см., Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.) (1974) CRC Pres., Boca Raton, Florida. Согласно еще одному варианту осуществления системе контролируемого высвобождения можно поместить в непосредственной близости от мишени композиции, таким образом, понадобится лишь доля системной дозы (см., например, Goodson (1984) в Medical Applications of Controlled Release, ранее, vol. 2, pp. 115-138). Другие системы контролируемого высвобождения обсуждаются в обзоре Langer (1990) Science 249:1527-1533.

Инъекционные препараты могут включать в себя лекарственные формы для внутривенных, подкожных, внутривенных и внутримышечных инъекций, капельных инфузий и т.д. Эти инъекционные препараты можно получить общеизвестными способами. Например, инъекционные препараты можно получить, например, путем растворения, суспендирования или эмульгирования описанного выше антигена или его соли в стерильной водной среде или масляной среде, обычно используемых для инъекций. В качестве водной среды для инъекций существует, например, физиологический солевой раствор, изотонический раствор, содержащий глюкозу и другие вспомогательные средства и т.д., которые можно использовать в комбинации с подходящим солюбилизующим средством, таким как спирт (например, этанол), многоатомный спирт (например, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль), неионогенное поверхностно-активное вещество (например, полисорбат 80, HCO-50 (полиоксиэтиленовый (50 моль) аддукт гидрогенизированного касторового масла)) и т.д. В качестве масляной среды используют, например, кунжутное масло, соевое масло и т.д., которые можно использовать в комбинации с солюбилизующим средством, таким как бензилбензоат, бензиловый спирт и т.д. Полученной таким образом инъекцией предпочтительно заполняют соответствующую ампулу.

Фармацевтические композиции для перорального или парентерального применения, описанные выше, преимущественно получают в виде лекарственных форм в стандартной дозе, которая соответствует дозе активных ингредиентов. Такие лекарственные формы в стандартной дозе включают в себя, например, таблетки, пилюли, капсулы, инъекции (ампулы), суппозитории и т.д. Количество содержащегося

вышеупомянутого антитела, как правило, составляет от приблизительно 5 до приблизительно 500 мг на лекарственную форму в стандартной дозе; особенно в форме инъекций предпочтительно, чтобы указанное антитело содержалось в количестве, составляющем от приблизительно 5 до приблизительно 100 мг и от приблизительно 10 до приблизительно 250 мг для других лекарственных форм.

Терапевтические применения антител.

Согласно настоящему изобретению предусмотрены способы, предусматривающие введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтической композиции, содержащей антагонистическое антитело к LEPR (например, антитело к LEPR, содержащее любую из последовательностей HCVR/LCVR или CDR, как представлено в табл. 1 в настоящем документе). Терапевтическая композиция может содержать любое из антител к LEPR, раскрытых в настоящем документе, или их антигенсвязывающие фрагменты, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

Антитела согласно настоящему изобретению являются применимыми, среди прочего, для лечения, профилактики и/или уменьшения интенсивности любого заболевания или нарушения, ассоциированного или опосредованного повышенными содержаниями лептина (гиперлептинемией) и/или повышенной экспрессией лептинового рецептора OB-R, что приводит к избыточной передаче сигнала LEPR. Согласно различным вариантам осуществления заболевание или нарушение выбрано без ограничения из следующего: анорексия или другие психические расстройства пищевого поведения, кахексия при хроническом заболевании почек, другие кахексии, такие как кахексия при застойной сердечной недостаточности, легочная кахексия, лучевая кахексия и раковая кахексия, аутоиммунные нарушения, такие как воспалительное заболевание кишечника, красная волчанка, рассеянный склероз, псориаз, сердечно-сосудистые заболевания, повышенное артериальное давление, депрессия, нейродегенеративные нарушения, рак, такой как почечноклеточная карцинома, меланома и рак молочной железы.

Согласно настоящему изобретению также предусмотрены антитела к LEPR и их антигенсвязывающие фрагменты, которые являются применимыми для антагонистического действия в отношении передачи сигнала LEPR в клетках, тканях и органах, экспрессирующих нормальные или высокие содержания лептина. Используемый в настоящем документе мутант LEPR, который проявляет усиленную передачу сигнала в присутствии лептина (по сравнению с LEPR дикого типа), называется "мутант LEPR с усиленной передачей сигнала". Иллюстративная мутация LEPR с усиленной передачей сигнала представляет собой LEPR-Q223R (Chagnon et al. (2009) *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 85(1):29-34). Таким образом, согласно настоящему изобретению предусмотрены антитела к LEPR и их антигенсвязывающие фрагменты, которые являются применимыми для лечения, профилактики и/или уменьшения интенсивности заболеваний и нарушений, вызванных или ассоциированных с мутантами с усиленной передачей сигнала LEPR.

В контексте способов лечения, описанных в настоящем документе, антитела к LEPR можно вводить в качестве монотерапии (т.е. в виде единственного терапевтического средства) или в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами (примеры которых описаны в другом месте настоящего документа).

Виды комбинированной терапии и составы.

Согласно настоящему изобретению предусмотрены композиции и терапевтические составы, содержащие любое из антител к LEPR, описанных в настоящем документе, в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтически активными компонентами, и способы лечения, предусматривающие введение таких комбинаций нуждающимся в этом субъектам.

Антагонистические антитела к LEPR согласно настоящему изобретению можно совместно составлять и/или вводить в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтически активными компонентами, такими как, например, фармацевтические продукты, прописанные для лечения следующего: кахексия при застойной сердечной недостаточности, легочная кахексия и раковая кахексия, аутоиммунные нарушения, такие как воспалительное заболевание кишечника, красная волчанка, рассеянный склероз, псориаз, сердечно-сосудистые заболевания, повышенное артериальное давление, нейродегенеративные нарушения, депрессия, рак, такой как почечноклеточная карцинома, меланома, рак молочной железы, и другие заболевания и нарушения, ассоциированные или вызванные сниженной передачей сигнала лептина. Примеры таких дополнительных терапевтически активных компонентов включают в себя без ограничения, например, следующее: ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента (например, ACE, ACE-I, бенazeприл, каптоприл, эналаприл, фозиноприл, лизиноприл, мозексиприл, периндоприл, квинаприл, рамаприл, трандолаприл), блокаторы рецепторов ангиотензина (например, ARB), миорелаксанты гладких мышц (гидралазин), нитраты длительного действия (например, изосорбид динитрат, например, с ACE-I и ARB или без них), диуретики (например, петлевые диуретики, тиазидоподобные диуретики и калийсберегающие диуретики), лечение железодефицитной анемии (например, парентеральное железо), бронхолитики длительного или короткого действия (например, β_2 агонисты, такие как арформотерол, буфенин, кленбутерол, допексамин, эпинефрин, фентотерол, формотерол, изоэтарин, изопреналин, изопротеренол, левосальбутамол, орципреналин, пирбутерол, прокаторол, ритодрин, сальбутамол, альбутерол, тербуталин, тиотропий), антихолинергические средства (например, гиосциамин, атропин, фенотербитал, скополамин, дицикломин, фенотербитал, мепензолат и их комбинации, такие

как атропин, гиосциамин, фенобарбитал и скополамин), кортикостероиды (например, гидрокортизон, гидрокортизон-17-валерат, гидрокортизон-17-бутират, преднизон, преднизолон, триамцинолона ацетонид, триамцинолоновый спирт, бетаметазон, дексаметазон, флуокортолон, флунизолид, будесонид), антибиотики длительного действия (например, макролиды, такие как эритромицин, азитромицин и метилксантины, такие как теофиллин), нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП) (например, аспирин, цецекоксиб, диклофенак, дифлунизал, этодолак, ибупрофен, индометацин, кетопрофен, напроксен, оксапрозин, пироксикам, сальсатал, сулиндак, толметин и т.д.), 5-аминосалициловые кислоты (5-ASA) (например, месалазин), иммунодепрессанты (например, преднизон, ингибиторы TNF, азатиоприн, метотрексат, 6-меркаптопурин), лекарственные средства для рецидивирующе-ремиттирующего рассеянного склероза (например, интерферон бета-1a, интерферон бета-1b, глатирамер ацетат, митоксантрон, натализумаб, финголимод, терифлуномид, диметилфумарат, алемтузумаб, даклизумаб, моноклональные антитела к CD20, такие как ритуксимаб, окрелизумаб и офатумумаб), местные средства для лечения псориаза (например, местные средства, такие как парааминобензойная кислота, кокосовое масло, каменноугольная смола, дитранол, кортикостероиды, такие как дезоксиметазон, флуоцинонид, витамин D₃ и другие аналоги витамина D, псорален и системные средства, такие как метотрексат, циклоспорин, гидроксикарбамид, фумараты, такие как диметилфумарат и ретиноиды), антагонисты TNF- α (например, инфликсимаб, адалимумаб, голимумаб и цертолизумаб пегол), лекарственные средства для псориаза, нацеленные на Т-клетки (например, эфализумаб и алефацепт), лекарственные средства для гипертензии и сердечно-сосудистых заболеваний (например, аспирин, статины, такие как аторвастатин, флувастатин, ловастатин, мавастатин, питавастатин, правастатин, розувастатин, симвастатин и их комбинации, такие как симвастатин+эзетимиб, ловастатин+ниацин и аторвастатин+амлодипин), лекарственные средства для нейродегенеративных расстройств (например, димебон и богатый пролином пептид (PRP)-1), антидепрессанты (например, сертралин, циталопрам, флуоксетин, эсциталопрам, тразодон, венлафаксин, бупропион, дулоксетин, пароксетин, амитриптилин, венлафацин, десвенлафаксин и нортриптилин) и противораковые лекарственные средства (например, сорафениб, JX-594, интерлейкин-2, ипилимумаб (Yervoy), ниволумаб (Opdivo), пембролизумаб (Keytruda), вемурафениб (Zelboraf), дабрафениб (Tafinlar), траметиниб (Mekinist), антрациклины, такие как доксорубин (Adriamycin®), эпирубицин (Ellence®), таксаны, такие как паклитаксел (Taxol®) и доцетаксел (Taxotere®), 5-фторурацил (5-FU), циклофосфамид (Cytoxan®), карбоплатин (Paraplatin®) или их комбинация).

Схемы введения.

Согласно определенным вариантам осуществления настоящего изобретения множественные дозы антагонистического антитела к LEPR (или фармацевтической композиции, содержащей комбинации антагонистического антитела к LEPR и любого из дополнительных терапевтически активных средств, упомянутых в настоящем документе) можно вводить субъекту в течение определенного периода времени. Способы согласно настоящему аспекту настоящего изобретения предусматривают последовательное введение субъекту множественных доз антитела к LEPR согласно настоящему изобретению. Используемый в настоящем документе термин "последовательное введение" означает, что каждую дозу антитела к LEPR вводят субъекту в разные моменты времени, например в разные дни, разделенные заданным интервалом (например, часами, днями, неделями или месяцами). Согласно настоящему изобретению предусмотрены способы, которые предусматривают последовательное введение пациенту одной начальной дозы антитела к LEPR с последующей одной или несколькими вторичными дозами антитела к LEPR и необязательно последующей одной или несколькими третичными дозами антитела к LEPR.

Термины "начальная доза", "вторичные дозы" и "третичные дозы" относятся к временной последовательности введения антитела к LEPR согласно настоящему изобретению. Таким образом, "начальная доза" представляет собой дозу, которую вводят в начале схемы лечения (ее также называют "исходной дозой", "насыщающей дозой", "начальной дозой" и тому подобное); "вторичные дозы" представляют собой дозы, которые вводят после начальной дозы; и "третичные дозы" представляют собой дозы, которые вводят после вторичных доз. Начальная, вторичная и третичная дозы могут содержать одинаковое количество антитела к LEPR, но, как правило, могут отличаться друг от друга с точки зрения частоты введения. Тем не менее, согласно определенным вариантам осуществления количество антитела к LEPR, содержащегося в начальной, вторичной и/или третичной дозах, варьируется относительно друг друга (например, его корректируют выше или ниже в зависимости от ситуации) в течение курса лечения. Согласно определенным вариантам осуществления две или больше (например, 2, 3, 4 или 5) доз вводят в начале схемы лечения в виде "насыщающих доз", после которых вводят последующие дозы, которые вводят реже (например, "поддерживающие дозы").

Диагностические и аналитические применения антител.

Антитела к LEPR согласно настоящему изобретению также можно использовать для обнаружения и/или измерения LEPR или LEPR-экспрессирующих клеток в образце, например, для диагностических целей. Например, антитело к LEPR или его фрагмент можно использовать для диагностики состояния или заболевания, характеризующегося aberrантной экспрессией (например, избыточной экспрессией, недостаточной экспрессией, отсутствием экспрессии и т.д.) LEPR. Иллюстративные диагностические

анализы в отношении LEPR могут включать в себя, например, приведение в контакт образца, полученного от пациента, с антителом к LEPR согласно настоящему изобретению, причем антитело к LEPR метят обнаруживаемой меткой или репортерной молекулой. Альтернативно, немеченое антитело к LEPR можно использовать в диагностических целях в комбинации со вторичным антителом, которое само является меченным обнаруживаемой меткой. Обнаруживаемая метка или репортерная молекула может представлять собой радиоактивный изотоп, такой как ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S или ^{125}I ; флуоресцентный или хемилюминесцентный фрагмент, такой как изотиоцианат флуоресцеина или родамин; или фермент, такой как щелочная фосфатаза, бета-галактозидаза, пероксидаза хрена или люцифераза. Конкретные иллюстративные анализы, которые можно использовать для обнаружения или измерения LEPR в образце, включают в себя иммуоферментный анализ (ELISA), радиоиммуноанализ (RIA) и сортировку клеток с активированной флуоресценцией (FACS).

Образцы, которые можно использовать в диагностических анализах LEPR в соответствии с настоящим изобретением, включают в себя любой образец ткани или жидкости, полученный от пациента, который содержит определяемые количества белка LEPR или его фрагментов при нормальных или патологических условиях. Как правило, содержания LEPR в конкретном образце, полученном от здорового пациента (например, пациента, не страдающего заболеванием или состоянием, связанным с аномальными содержаниями или активностью LEPR), будут измерять для первоначального установления исходного, или стандартного содержания LEPR. Затем это исходное содержание LEPR можно сравнить с содержаниями LEPR, измеренными в образцах, полученных от лиц, у которых подозревают наличие заболевания или состояния, связанного с LEPR.

Примеры

Следующие примеры предоставлены таким образом, чтобы специалисты в настоящей области техники имели полное раскрытие и описание того, как реализовать и применить способы и композиции согласно настоящему изобретению, и не предназначены для ограничения объема того, что авторы настоящего изобретения считают своим изобретением. Были предприняты усилия для обеспечения точности по отношению к используемым числам (например, количествам, температуре и т.д.), но следует учитывать некоторые экспериментальные ошибки и отклонения. Если не указано иное, части даны по массе, молекулярная масса представляет собой среднюю молекулярную массу, температура представлена в градусах Цельсия, а давление равно атмосферному или близко к нему.

Пример 1. Создание антигенсвязывающих белков, которые специфически связываются с лептиновым рецептором (LEPR).

Антитела к LEPR получали путем иммунизации мыши VELOCIMMUNE® (т.е. сконструированной мыши, содержащей ДНК, кодирующую вариabельные области тяжелой и каппа легкой цепи иммуноглобулина человека) с помощью иммуногена, содержащего внеклеточный домен LEPR. Иммунный ответ антитела подвергали мониторингу с помощью LEPR-специфического иммуноанализа. Полностью человеческие антитела к LEPR выделяли и очищали с использованием ранее описанных техник.

Определенные биологические свойства иллюстративных антител к LEPR, полученных в соответствии со способами согласно примеру, описаны подробно в примерах, представленных ниже.

Пример 2. Аминокислотные последовательности и последовательности нуклеиновой кислоты вариabельных областей тяжелой и легкой цепей.

В табл. 1 представлены идентификаторы аминокислотной последовательности вариabельных областей тяжелой и легкой цепей и CDR выбранных антител к LEPR согласно настоящему изобретению. Соответствующие идентификаторы последовательностей нуклеиновой кислоты представлены в табл. 2.

Таблица 1. Идентификаторы аминокислотной последовательности

Обозначение антитела	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H4N17322P2	2	4	6	8	10	12	14	16
H4N18437P2	18	20	22	24	10	12	14	16
H4N18439P2	26	28	30	32	10	12	14	16
H4N18440P2	34	36	38	40	10	12	14	16
H4N18457P2	42	44	46	48	10	12	14	16
H4N18462P2	50	52	54	56	10	12	14	16
H4N18464P2	58	60	62	64	10	12	14	16
H4N18466P2	66	68	70	72	10	12	14	16
H4N18508P2	74	76	78	80	82	84	86	88

Таблица 2. Идентификаторы последовательностей
нуклеиновой кислоты

Обозначение антитела	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H4N17322P2	1	3	5	7	9	11	13	15
H4N18437P2	17	19	21	23	9	11	13	15
H4N18439P2	25	27	29	31	9	11	13	15
H4N18440P2	33	35	37	39	9	11	13	15
H4N18457P2	41	43	45	47	9	11	13	15
H4N18462P2	49	51	53	55	9	11	13	15
H4N18464P2	57	59	61	63	9	11	13	15
H4N18466P2	65	67	69	71	9	11	13	15
H4N18508P2	73	75	77	79	81	83	85	87

Антитела, как правило, в настоящем документе называют согласно следующей номенклатуре: приставка Fc (например, "H4N", "H1M", "H2M" и т.д.) с последующим числовым идентификатором (например, "17322", "18457" и т.д.), за которым следует суффикс "P" или "N". Таким образом, в соответствии с этой номенклатурой антитело в настоящем документе может называться, например, "H4N17322P2", "H4N18457P2" и т.д. Приставки Fc в обозначениях антител, используемых в настоящем документе (H4N, H1M и H2M), указывают на конкретный изотип Fc-области антитела. Например, антитело "H4N" содержит Fc IgG4 человека, тогда как антитело "H1M" содержит Fc IgG1 мыши (все вариабельные области являются полностью человеческими, что обозначено первой "H" в обозначении антитела). Среднему специалисту в настоящей области техники понятно, что антитело с конкретным изотипом Fc можно превратить в антитело с другим изотипом Fc (например, антитело с Fc IgG1 мыши можно превратить в антитело с IgG4 человека и т.д.), но в любом случае вариабельные домены (включая в себя CDR), которые указаны с помощью числовых идентификаторов, показанных в табл. 1 и 2, будут оставаться прежними, и, как предполагают, связывающие свойства являются идентичными или, по существу, сходными независимо от природы Fc-домена.

Антитело сравнения. Антитело сравнения, используемое в следующих примерах, относится к Fab 9F8, описанному в Fazeli et al. (2006) J Immunol Methods 312:190-200 и Carpenter et al. (2012) Structure 20(3):487-97.

Пример 3. Полученные с помощью поверхностного плазменного анализа значения аффинности связывания и кинетические константы моноклональных антител к LEPR человека.

Константы равновесия диссоциации (значения K_D) для связывания антигена с очищенными моноклональными антителами к LEPR согласно настоящему изобретению определяли с использованием биосенсора поверхностного плазмонного анализа в режиме реального времени с использованием прибора Biacore 4000. Все исследования связывания проводили в подвижном буфере, содержащем 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA и 0,05% об./об. Поверхностно-активного вещества Tween-20, pH 7,4 (подвижный буфер HBS-ET) при 25 и 37°C. Поверхность сенсора Biacore вначале дериватизировали путем аминного сочетания с моноклональным мышинным антителом к Fc человека (GE, № по кат. BR-1008-39) для захвата моноклональных антител к LEPR. Реагенты LEPR, исследуемые в отношении связывания с моноклональными антителами к LEPR, включали в себя рекомбинантный внеклеточный домен LEPR человека, экспрессированный с С-концевой тус-тус-гексагистидиновой меткой (hLEPR.MMN; SEQ ID NO: 90), рекомбинантный внеклеточный домен LEPR яванского макака, экспрессированный с С-концевой тус-тус-гексагистидиновой меткой (mfLEPR.MMN; SEQ ID NO: 93), рекомбинантный внеклеточный домен LEPR мыши, экспрессированный с С-концевой тус-тус-гексагистидиновой меткой (mLEPR.MMN; SEQ ID NO: 94), рекомбинантный внеклеточный домен крысы LEPR, экспрессированный с С-концевой тус-тус-гексагистидиновой меткой (rLEPR.MMN; SEQ ID NO: 95), и рекомбинантный внеклеточный домен LEPR человека, экспрессированный с С-концевой меткой Fc IgG2a мыши (hLEPR.mFc; SEQ ID NO: 91). Конструкты LEPR, которые включают в себя метки MMN, представляют собой мономерные конструкты LEPR, и конструкты LEPR, включающие в себя метку mFc, представляют собой димерные конструкты LEPR. Различные концентрации реагентов LEPR вначале получали в подвижном буфере HBS-ET в конечных концентрациях, находящихся в диапазоне от 100 нМ до 3,7 нМ в 3-кратных серийных разведениях, и затем их вводили на захваченную моноклональными антителами к LEPR поверхность в течение 4 мин с объемной скоростью потока, составляющей 30 мкл/мин. Диссоциацию связанного с моноклональным антителом реагента LEPR подвергали мониторингу в течение 10 мин в подвижном буфере HBS-ET. Кинетические константы скорости ассоциации (k_a) и диссоциации (k_d) определяли путем аппроксимации сенсограмм связывания в режиме реального времени к 1:1 модели связывания с ограничением переноса массы с использованием программного обеспечения для подбора аппроксимирующей кривой Scrubber 2.0c. Константы равновесия диссоциации для связывания (K_D) и дис-

социативные периоды полужизни ($t_{1/2}$) рассчитывали из кинетических констант скорости следующим образом:

$$K_D (M) = \frac{k_d}{k_a}, \text{ и } t_{1/2} (\text{мин}) = \frac{\ln(2)}{60 \times k_d}$$

Параметры кинетики связывания для связывания hLEPR-ММН, mLEPR-ММН, hLEPR.mFc, mLEPR-ММН или rLEPR-ММН с различными моноклональными антителами к LEPR согласно настоящему изобретению при 25 и 37°C показаны в табл. 3-13.

Таблица 3. Параметры кинетики связывания антител к LEPR, связывающихся с hLEPR-ММН при 25°C

Захваченное mAb	Уровень захвата mAb (ЕО, единицы ответа)	100 нМ связан. hLEPR-ММН (ЕО)	k_a (1/моль*с)	k_d (1/с)	K_D (М)	$t_{1/2}$ (мин)
H4N17322P2	178 ± 1,2	66	4,38E+04	2,24E-04	5,11E-09	52
H4N18437P2	171 ± 0,5	56	5,74E+04	3,75E-03	6,53E-08	3,1
H4N18439P2	156 ± 0,7	21	1,07E+04	1,13E-03	1,06E-07	10
H4N18440P2	170 ± 0,5	71	4,23E+04	4,97E-04	1,18E-08	23
H4N18457P2	166 ± 0,9	119	2,55E+05	2,52E-03	9,89E-09	5
H4N18462P2	175 ± 0,6	34	6,79E+04	7,65E-03	1,13E-07	1,5
H4N18464P2	160 ± 0,4	60	1,24E+05	1,13E-03	9,09E-09	10
H4N18466P2	161 ± 0,5	24	2,64E+04	5,11E-03	1,94E-07	2,3
H4N18508P2	180 ± 1,5	127	1,76E+05	1,67E-03	9,53E-09	7
Антитело сравнения	380 ± 8,2	26	4,48E+04	7,46E-05	1,66E-09	155
Изотипическое контрольное антитело	171 ± 0,4	4	NB*	NB*	NB*	NB*

NB* указывает на то, что связывание не наблюдалось в текущих условиях эксперимента.

Таблица 4. Параметры кинетики связывания антител к LEPR, связывающихся с hLEPR-ММН при 37°C

Захваченное mAb	Уровень захвата mAb (ЕО)	100 нМ связан. hLEPR-ММН (ЕО)	k_a (1/моль*с)	k_d (1/с)	K_D (М)	$t_{1/2}$ (мин)
H4N17322P2	225 ± 3	99	6,95E+04	8,12E-04	1,17E-08	14
H4N18437P2	213 ± 3	55	1,14E+05	8,84E-03	7,76E-08	1,3
H4N18439P2	180 ± 1,5	19	2,32E+04	4,69E-03	2,02E-07	2,5
H4N18440P2	207 ± 1,2	95	6,34E+04	1,73E-03	2,73E-08	7
H4N18457P2	198 ± 1,6	108	3,45E+05	8,55E-03	2,48E-08	1,4
H4N18462P2	204 ± 2,1	31	4,58E+04	1,14E-02	2,48E-07	1,0
H4N18464P2	185 ± 1,2	68	1,54E+05	3,15E-03	2,05E-08	3,7
H4N18466P2	184 ± 1,3	26	4,55E+04	6,74E-03	1,48E-07	1,7
H4N18508P2	204 ± 1,4	117	2,69E+05	6,88E-03	2,55E-08	1,7
Антитело сравнения	315 ± 7,6	37	5,39E+04	4,81E-04	8,92E-09	24
Изотипическое контрольное антитело	193 ± 1,5	6	NB*	NB*	NB*	NB*

NB* указывает на то, что связывание не наблюдалось в текущих условиях эксперимента.

Как показано в табл. 3, при 25°C все моноклональные антитела к LEPR согласно настоящему изобретению связывались с hLEPR-ММН со значениями K_D , находящимися в диапазоне от 5,11 до 194 нМ. Как показано в табл. 4, при 37°C все моноклональные антитела к LEPR согласно настоящему изобрете-

нию связывались с hLEPR-ММН со значениями K_D , находящимися в диапазоне от 11,7 до 248 нМ.

Таблица 5. Параметры кинетики связывания антител к LEPR, связывающихся с mfLEPR-ММН при 25°C

Захваченное mAb	Уровень захвата mAb (ЕО)	100 нМ связан. mfLEPR R-ММН (ЕО)	k_a (1/моль*с)	k_d (1/с)	K_D (М)	$t_{1/2}$ (мин)
H4H17322P2	177 ± 0,5	102	7,02E+04	2,92E-04	4,16E-09	40
H4H18437P2	171 ± 0,3	70	6,87E+04	4,05E-03	5,89E-08	2,9
H4H18439P2	155 ± 0,5	22	1,57E+04	1,52E-03	9,63E-08	8
H4H18440P2	170 ± 0,9	67	4,95E+04	2,68E-03	5,41E-08	4,3
H4H18457P2	165 ± 0,4	133	2,73E+05	3,31E-03	1,22E-08	3,5
H4H18462P2	174 ± 0,4	42	7,42E+04	1,33E-02	1,79E-07	0,9
H4H18464P2	159 ± 0,4	15	3,82E+04	2,31E-03	6,04E-08	5,0
H4H18466P2	161 ± 0,5	30	4,50E+04	6,69E-03	1,48E-07	1,7
H4H18508P2	178 ± 0,4	145	2,04E+05	1,63E-03	8,00E-09	7
Антитело сравнения	359 ± 4,8	1	NB*	NB*	NB*	NB*
Изотипическое контрольное антитело	171 ± 0,4	0	NB*	NB*	NB*	NB*

NB* указывает на то, что связывание не наблюдалось в текущих условиях эксперимента.

Таблица 6. Параметры кинетики связывания антител к LEPR, связывающихся с mfLEPR-ММН при 37°C

Захваченное mAb	Уровень захвата mAb (ЕО)	100 нМ связан. mfLEPR R-ММН (ЕО)	k_a (1/моль*с)	k_d (1/с)	K_D (М)	$t_{1/2}$ (мин)
H4H17322P2	218 ± 1,7	142	1,43E+05	1,10E-03	7,72E-09	10
H4H18437P2	207 ± 1,4	58	8,69E+04	1,27E-02	1,47E-07	0,9
H4H18439P2	178 ± 1,4	14	4,69E+04	7,92E-03	1,69E-07	1,5
H4H18440P2	204 ± 1	66	7,15E+04	7,24E-03	1,01E-07	1,6
H4H18457P2	195 ± 1,4	117	3,47E+05	1,04E-02	3,00E-08	1,1
H4H18462P2	199 ± 1,1	28	1,29E+05	3,37E-02	2,61E-07	0,3
H4H18464P2	183 ± 0,6	13	3,92E+04	8,41E-03	2,15E-07	1,4
H4H18466P2	181 ± 0,9	27	8,43E+04	1,38E-02	1,64E-07	0,8
H4H18508P2	200 ± 1	125	2,85E+05	7,89E-03	2,77E-08	1,5
Антитело сравнения	298 ± 3,2	-1	NB*	NB*	NB*	NB*
Изотипическое контрольное антитело	190 ± 1	1	NB*	NB*	NB*	NB*

NB* указывает на то, что связывание не наблюдалось в текущих условиях эксперимента.

Как показано в табл. 5, при 25°C все моноклональные антитела к LEPR согласно настоящему изобретению связывались с mfLEPR-ММН со значениями K_D , находящимися в диапазоне от 4,16 до 179 нМ. Как показано в табл. 6, при 37°C все моноклональные антитела к LEPR согласно настоящему изобретению связывались с mfLEPR-ММН со значениями K_D , находящимися в диапазоне от 7,72 до 261 нМ.

Таблица 7. Параметры кинетики связывания антител к LEPR, связывающихся с hLEPR-mFc при 25°C

Захваченное mAb	Уровень захвата mAb (ЕО)	100 нМ связан. hLEPR-mFc (ЕО)	k_a (1/моль*с)	k_d (1/с)	K_D (М)	$t_{1/2}$ (мин)
H4N17322P2	176 ± 0,4	74	6,45E+04	1,14E-04	1,77E-09	102
H4N18437P2	169 ± 1,1	70	1,02E+05	5,36E-04	5,27E-09	22
H4N18439P2	155 ± 0,2	53	4,87E+04	1,80E-04	3,69E-09	64
H4N18440P2	169 ± 0,5	140	1,54E+05	6,82E-05	4,43E-10	169
H4N18457P2	165 ± 0,8	149	4,91E+05	4,23E-04	8,63E-10	27
H4N18462P2	173 ± 0,5	68	9,08E+04	2,96E-04	3,26E-09	39
H4N18464P2	159 ± 0,4	84	2,11E+05	1,88E-04	8,91E-10	61
H4N18466P2	160 ± 0,2	37	3,97E+04	4,72E-04	1,19E-08	24
H4N18508P2	178 ± 0,4	138	2,21E+05	2,99E-04	1,35E-09	39
Антитело сравнения	344 ± 4,9	36	1,56E+05	1,45E-05	9,28E-11	798
Изотипическое контрольное антитело	170 ± 0,7	-2	NB*	NB*	NB*	NB*

NB* указывает на то, что связывание не наблюдалось в текущих условиях эксперимента.

Таблица 8. Параметры кинетики связывания антител к LEPR, связывающихся с hLEPR-mFc при 37°C

Захваченное mAb	Уровень захвата mAb (ЕО)	100 нМ связан. hLEPR-mFc (ЕО)	k_a (1/моль*с)	k_d (1/с)	K_D (М)	$t_{1/2}$ (мин)
H4N17322P2	214 ± 1,8	105	1,33E+05	4,40E-04	3,31E-09	26
H4N18437P2	202 ± 1,1	88	1,29E+05	5,56E-04	4,30E-09	21
H4N18439P2	176 ± 0,7	67	6,09E+04	9,23E-04	1,51E-08	13
H4N18440P2	200 ± 1,4	181	2,12E+05	1,12E-04	5,27E-10	103
H4N18457P2	193 ± 1	166	5,56E+05	7,04E-04	1,27E-09	16
H4N18462P2	196 ± 0,9	84	1,28E+05	5,43E-04	4,26E-09	21
H4N18464P2	182 ± 0,4	105	4,04E+05	5,17E-04	1,28E-09	22
H4N18466P2	179 ± 1	52	5,87E+04	5,20E-04	8,86E-09	22
H4N18508P2	198 ± 1	146	4,71E+05	1,02E-03	2,16E-09	11
Антитело сравнения	288 ± 2,5	50	1,50E+05	7,74E-05	5,14E-10	149
Изотипическое контрольное антитело	188 ± 0,8	1	NB*	NB*	NB*	NB*

NB* указывает на то, что связывание не наблюдалось в текущих условиях эксперимента.

Как показано в табл. 7, при 25°C, все моноклональные антитела к LEPR согласно настоящему изобретению связывались с hLEPR-mFc со значениями K_D , находящимися в диапазоне от 443 пМ до 11,9 нМ. Как показано в табл. 8, при 37°C все моноклональные антитела к LEPR согласно настоящему изобретению связывались с hLEPR-mFc со значениями K_D , находящимися в диапазоне от 527 пМ до 15,1 нМ.

Таблица 9. Параметры кинетики связывания моноклональных антител к LEPR, связывающихся с mLEPR-ММН при 25°C

Захваченное mAb	Уровень захвата mAb (ЕО)	100 нМ связан. mLEPR-ММН (ЕО)	k_a (1/моль*с)	k_d (1/с)	K_D (М)	$t_{1/2}$ (мин)
H4N17322P2	176	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4N18437P2	169	6	1,58E+04	4,18E-03	2,64E-07	2,8
H4N18439P2	155	-2	NB*	NB*	NB*	NB*
H4N18440P2	169	-3	NB*	NB*	NB*	NB*
H4N18457P2	164	1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4N18462P2	173	2	NB*	NB*	NB*	NB*
H4N18464P2	159	-1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4N18466P2	160	1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4N18508P2	177	25	2,78E+05	6,07E-02	2,18E-07	0,19
Антитело сравнения	334 ± 2,5	2	NB*	NB*	NB*	NB*
Изотипическое контрольное антитело	169	-2	NB*	NB*	NB*	NB*

NB* указывает на то, что связывание не наблюдалось в текущих условиях эксперимента.

Таблица 10. Параметры кинетики связывания антител к LEPR, связывающихся с mLEPR-ММН при 37°C

Захваченное mAb	Уровень захвата mAb (ЕО)	100 нМ связан. mLEPR-ММН (ЕО)	k_a (1/моль*с)	k_d (1/с)	K_D (М)	$t_{1/2}$ (мин)
H4N17322P2	212	-1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4N18437P2	201	6	1,15E+04	1,33E-02	1,16E-06	0,9
H4N18439P2	175	-1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4N18440P2	200	-1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4N18457P2	191	-1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4N18462P2	194	3	IC*	IC*	IC*	IC*
H4N18464P2	181	1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4N18466P2	178	3	NB*	NB*	NB*	NB*
H4N18508P2	196	17	5,12E+05	1,05E-01	2,05E-07	0,11
Антитело сравнения	283 ± 1,1	0	NB*	NB*	NB*	NB*
Изотипическое контрольное антитело	187	0	NB*	NB*	NB*	NB*

NB* указывает на то, что связывание не наблюдалось в текущих условиях эксперимента,

IC* указывает на то, что наблюдаемое связывание являлось неопределенным и не могло соответствовать данным в отношении связывания в режиме реального времени в текущих условиях эксперимента.

Как показано в табл. 9, при 25°C два из 9 моноклональных антител к LEPR согласно настоящему изобретению связывались с mLEPR-ММН со значениями K_D , составляющими 218 и 264 нМ. Как показано в табл. 10, при 37°C два из 9 моноклональных антител к LEPR согласно настоящему изобретению связывались с mLEPR-ММН со значениями K_D , составляющими 205 нМ и 1,16 мкМ.

Таблица 11. Параметры кинетики связывания антител к LEPR, связывающихся с rLEPR-ММН при 25°C

Захваченное mAb	Уровень захвата mAb (ЕО)	100 нМ связан. rLEPR-ММН (ЕО)	k_a (1/моль*с)	k_d (1/с)	K_D (М)	$t_{1/2}$ (мин)
H4N17322P2	176 ± 0,9	10	IC*	IC*	IC*	IC*
H4N18437P2	169 ± 0,2	13	4,21E+04	1,38E-02	3,28E-07	0,8
H4N18439P2	155 ± 0,2	-1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4N18440P2	169 ± 0,4	-2	NB*	NB*	NB*	NB*
H4N18457P2	164 ± 0,5	18	2,83E+04	2,06E-02	7,30E-07	0,6
H4N18462P2	173 ± 0,2	5	3,21E+04	1,08E-02	3,36E-07	1,1
H4N18464P2	159 ± 0	-1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4N18466P2	160 ± 0,6	5	2,10E+04	1,98E-02	9,43E-07	0,6
H4N18508P2	177 ± 0,1	22	1,39E+05	4,76E-02	3,41E-07	0,24
Антитело сравнения	328 ± 1,6	1	NB*	NB*	NB*	NB*
Изотипическое контрольное антитело	170 ± 0,2	-1	NB*	NB*	NB*	NB*

NB* указывает на то, что связывание не наблюдалось в текущих условиях эксперимента,

IC* указывает на то, что наблюдаемое связывание являлось неопределенным и не могло соответствовать данным в отношении связывания в режиме реального времени в текущих условиях эксперимента.

Таблица 12. Параметры кинетики связывания антител к LEPR, связывающихся с rLEPR-ММН при 37°C

Захваченное mAb	Уровень захвата mAb (ЕО)	100 нМ связан. rLEPR-ММН (ЕО)	k_a (1/моль*с)	k_d (1/с)	K_D (М)	$t_{1/2}$ (мин)
H4N17322P2	212 ± 0,3	9	9,32E+04	3,28E-02	3,52E-07	0,4
H4N18437P2	200 ± 0	10	3,07E+04	1,93E-02	6,29E-07	0,6
H4N18439P2	175 ± 0,8	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4N18440P2	200 ± 0,1	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4N18457P2	192 ± 0,3	16	3,02E+04	1,75E-02	5,80E-07	0,7
H4N18462P2	194 ± 0,9	5	IC*	IC*	IC*	IC*
H4N18464P2	181 ± 0,1	1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4N18466P2	177 ± 0,7	6	3,26E+04	2,52E-02	7,71E-07	0,5
H4N18508P2	196 ± 1,6	17	2,71E+05	4,57E-02	1,68E-07	0,25
Антитело сравнения	279 ± 0,4	-1	NB*	NB*	NB*	NB*
Изотипическое контрольное антитело	186 ± 0,1	0	NB*	NB*	NB*	NB*

NB* указывает на то, что связывание не наблюдалось в текущих условиях эксперимента,

IC* указывает на то, что наблюдаемое связывание являлось неопределенным и не могло соответствовать данным в отношении связывания в режиме реального времени в текущих условиях эксперимента.

Как показано в табл. 11, при 25°C пять из 9 моноклональных антител к LEPR согласно настоящему изобретению связывались с rLEPR-ММН со значениями K_D , находящимися в диапазоне от 328 нМ до

943 нМ. Как показано в табл. 12, при 37°C пять из 9 моноклональных антител к LEPR согласно настоящему изобретению связывались с rLEPR-ММН со значениями K_D , находящимися в диапазоне от 168 до 771 нМ.

Пример 4. Антитела к LEPR согласно настоящему изобретению не блокируют связывание hLEPR-hFc с лептином человека.

Способность моноклональных антител к LEPR согласно настоящему изобретению блокировать связывание димерного LEPR человека с его природным лигандом, лептином человека, измеряли с использованием конкурентного сэндвич-формата ELISA.

Для ELISA лептин человека (hLeptin; R&D Systems, № по кат. 398-LP-01M) наносили в концентрации, составляющей 5 мкг/мл в PBS на 96-луночный титрационный микропланшет в течение ночи при 4°C. Неспецифические сайты связывания впоследствии блокировали с использованием 0,5% (мас./об.) раствора BSA в PBS. Постоянное количество части белка LEPR, внеклеточного домена, который экспрессировали с С-концевой меткой Fc человека (hLEPR.hFc; SEQ ID NO: 92), составляющее 10 нМ, титровали с антителами к LEPR, белком - лептином человека (hLeptin) или изотипическим контрольным антителом, находящимися в диапазоне от 8,5 нМ до 500 нМ в серийном разведении. Эти комплексы антитело-белок или белок-белок затем инкубировали в течение 1,5 ч при комнатной температуре (RT). Комплексы затем переносили в титрационные микропланшеты, покрытые лептином человека и инкубировали в течение 2 часов при RT, лунки отмывали и связанный с планшетом hLEPR-hFc обнаруживали с помощью поликлонального антитела к IgG человека, конъюгированного с пероксидазой хрена (Jackson ImmunoResearch Inc, № по кат. 109-035-098). Образцы проявляли с помощью раствора TMB (BD Biosciences, № по кат. 555214; субстрат А и В, смешанные в соотношении 1:1 согласно инструкциям производителя) для получения колориметрической реакции и затем нейтрализовали с помощью 1 М серной кислоты до измерения поглощения при 450 нм на устройство для прочтения планшетов Victor X5. Анализ данных проводили с использованием сигмоидальной модели зависимости ответа от дозы в программном обеспечении Prism™ (GraphPad). Процент блокады при максимальной концентрации исследуемого антитела рассчитывали в качестве показателя способности антител блокировать связывание 10 нМ hLEPR-hFc с лептином человека на планшете. В расчете сигнал связывания 10 нМ hLEPR-hFc без присутствия антитела называли 100% связывание или 0% блокирование; и исходный сигнал буфера отдельно без присутствия hLEPR-hFc называли 0% связывание или 100% блокирование. Данные в отношении блокирования в концентрации 500 нМ антитела обобщенно представлены в табл. 13.

Таблица 13. Определенное с помощью ELISA
блокирование антителами к LEPR связывания
hLEPR-hFc с лептином человека

Антитело	Блокирование антителами в концентрации 500 нМ связывания 10 нМ hLEPR-hFc с лептином человека (% блокады)
H4N18440P2	3
H4N18466P2	2
H4N18457P2	4
H4N18437P2	9
H4N18464P2	-5
H4N17322P2	13
H4N18439P2	-1
H4N18462P2	14
H4N18508P2	40
Контроли	
Изотипическое контрольное антитело	-3
Лептин человека	99
Антитело сравнения	99
Изотипический контроль IgG2a мыши	32

Как показано в табл. 13, ни одно из антител к LEPR согласно настоящему изобретению не продемонстрировало >40% блокады связывания hLEPR-hFc с поверхностью, покрытой лептином человека. Тем не менее, антитело сравнения и лептин человека, в качестве положительного контроля, были способны блокировать 99% связывания hLEPR-hFc с поверхностью, покрытой лептином человека. Изотипи-

ческое контрольное антитело не продемонстрировало измеряемого блокирования в концентрациях вплоть до 500 нМ.

Пример 5. Определенное с помощью анализа FACS связывание с клетками HEK293/Мусх2-hLEPR(экто)-GPI (экспрессирующими эктодомен hLEPR, прикрепленный посредством GPI).

Лептиновый рецептор, LEPR, представляет собой однопроходный трансмембранный рецептор семейства цитокиновых рецепторов I класса с большим, составляющим 818 аминокислот в длину, внеклеточным доменом (Tartaglia (1997) *J. Biol. Chem.* 7:272(10):6093-6). LEPR может связываться с лептином, белком, преимущественно экспрессируемым жировой тканью, который участвует в регуляции потребления пищи и метаболизма (Friedman (2014) *J Endocrinol* 223(1):T1-8). Существуют различные изоформы LEPR, дающие растворимые или мембраносвязанные формы рецептора, и мембраносвязанные формы различаются по длине своего внутриклеточного домена. Изоформа с самым длинным внутриклеточным доменом в высокой степени экспрессируется в гипоталамусе, важном сайте действия лептина в отношении ожирения (Friedman and Halaas (1998) *Nature* 395(6704):763-70). LEPR локализуется преимущественно в протопластах и в меньшей степени на клеточной поверхности. LEPR подвергается индуцированной лигандом интернализации, добавляя дополнительный уровень регуляции передачи сигналов лептина (Sweeney (2002) *Cell Signal* 14(8):655-63).

Для оценки связывания с клетками антител к LEPR согласно настоящему изобретению создавали клеточную линию HEK293 для стабильной экспрессии внеклеточного домена LEPR человека (hLEPR; аминокислоты 22-839 из учетного номера № P48357, изоформа B) с N-концевой меткой мус-мус и C-концевой пептидной последовательностью человеческой карбоксипептидазы М, которая направляет добавление гликозилфосфатидилинозитола (GPI) (Marcic et al. (2000) *J Biol Chem.* 275(21): 16110-8) так, чтобы белок мог прикрепиться посредством GPI к мембране. Поскольку hLEPR в клеточной линии не обладает внутриклеточным доменом, он не интернализуется при связывании лиганда, что значительно увеличивает количество LEPR, доступного для связывания антитела и/или лиганда. Селекцию клеточной линии проводили в DMEM, содержащей 10% FBS, NEAA, пенициллин/стрептомицин и 500 мкг/мл G418, затем сортировали в отношении высокого уровня экспрессии рецептора с использованием антитела к Мус. Полученную в результате стабильную клеточную линию, которая названа HEK293/hLEPR-GPI, поддерживали в среде DMEM, содержащей 10% FBS, NEAA и пенициллин/стрептомицин.

Для анализа FACS исходные клетки HEK293 и клетки HEK293/hLEPR-GPI отделяли и высевали на 96-луночные планшеты с v-образным дном с плотностью, составляющей 5×10^5 клеток/луноку в PBS, содержащем 2% FBS (буфер FACS). Чтобы проверить, зависит ли присутствие антител к hLEPR, связывающихся с клетками, от наличия лептина, буфер FACS с 1 мкМ лептина человека или без него (R&D Systems, № по кат. 398-LP) инкубировали с клетками в течение 30 мин при 4°C с последующим добавлением антител к LEPR или контрольных антител в концентрации 10 нМ в буфере FACS. Затем клетки инкубировали в течение 30 мин при 4°C, после чего промывали и затем инкубировали с 16 мкг/мл конъюгированного вторичного антитела Alexa Fluor®-647 (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., № по кат. 109-547-003) в течение 30 мин при 4°C. Затем клетки фиксировали с использованием BD CytoFix™ (Becton Dickinson, № по кат. 554655), фильтровали и анализировали на проточном цитометре HyperCyt (Beckman Coulter). Неокрашенные и вторичные контрольные антитела отдельно также исследовали для всех клеточных линий. Результаты анализировали с использованием программ ForeCyt (IntelliCyt) и FlowJo версии 10, чтобы определить геометрические средние значения флуоресценции для жизнеспособных клеток. Среднее геометрическое значение флуоресценции для каждого образца затем нормализовали к среднему геометрическому значению для неокрашенных клеток для получения относительного связывания для каждого условия, что называется "отношения связывания", и эти отношения связывания занесли в табл. 14 для каждого исследуемого антитела.

Как показано в табл. 14, 9 антител к LEPR согласно настоящему изобретению, исследованных в концентрации 10 нМ, продемонстрировали связывание с клетками HEK293/hLEPR-GPI с отношениями связывания, находящимися в диапазоне от 824-кратного до 3187-кратного без лептина и от 398-кратного до 3590-кратного в присутствии 1 мкМ лептина. На основании сходства этих отношений связывания способность антител к LEPR согласно настоящему изобретению связываться с LEPR, экспрессируемым на клетках, по-видимому, существенно не зависит от присутствия избытка лептина в концентрации 1 мкМ, что позволяет предположить, что сайты связывания антител к LEPR на LEPR не перекрываются с сайтами связывания лептина на LEPR. Антитела к LEPR согласно настоящему изобретению не демонстрировали какого-либо значительного связывания с исходными клетками HEK293 с отношениями связывания с 1 мкМ лептина и без него, находящимися в диапазоне от 1- до 9-кратного. Связывание антитела сравнения с клетками, экспрессирующими GPI-прикрепленный LEPR, было значительно снижено в присутствии лептина. Образцы изотипического контрольного антитела и вторичного антитела отдельно также не продемонстрировали значительного связывания с клеточной линией ни с лептином, ни без него, при этом отношениями связывания находились в диапазоне от 1- до 6-кратного.

Таблица 14. Связывание антител к LEPR в концентрации 10 нМ с клетками HEK293/hLEPR-GPI и исходными клетками HEK293 +/- 1 мкМ лептина человека

	Отношение связывания: нормированное к неокрашенному образцу каждой клеточной линии			
	Без добавленного лептина		1 мкМ лептина	
Антитело	HEK293 исходные	HEK293/ hLEPR-GPI	HEK293 исходные	HEK293/ hLEPR-GPI
H4N17322P2	3	1307	6	1317
H4N18457P2	2	3187	3	3106
H4N18464P2	5	2318	7	3590
H4N18437P2	1	1314	2	1441
H4N18439P2	4	1533	6	2477
H4N18440P2	3	1640	7	2557
H4N18462P2	2	1173	3	759
H4N18466P2	1	824	2	398
H4N18508P2	1	1311	2	1873
Антитело сравнения	6	2349	3	112
Изотипическое контрольное антитело IgG человека	1	6	2	4
Вторичное антитело к IgG человека отдельно	1	3	2	3
Изотипическое контрольное антитело IgG мыши	2	2	3	3
Вторичное антитело к IgG мыши отдельно	2	2	2	2
Неокрашенный	1	1	1	1

Пример 6. Антитела к LEPR согласно настоящему изобретению продемонстрировали полное ингибирование передачи сигнала лептина в присутствии лептина человека.

Разрабатывали биологический анализ для обнаружения транскрипционной активации STAT3 посредством активации LEPR с использованием репортерной клеточной линии, которая стабильно экспрессирует полноразмерный LEPR человека (hLEPR; аминокислоты 1 - 1165 учетного номера NP_002294.2) совместно с люциферазным репортером (STAT3-Luc; Qiagen, № по кат. CLS-6028L) в клеточной линии IMR-32, клеточная линия нейробластомы человека. Полученную стабильную клеточную линию, которая называется IMR-32/STAT3-Luc/hLEPR, выделяли и поддерживали в среде MEM-Earl, дополненной 10% FBS, NEAA, 1 мкг/мл пуромидина, 100 мкг/мл гигромицина В и смесью пенициллина/стрептомицина/L-глутамин (полная среда).

Полученный биоанализ использовали для измерения эффекта антител к LEPR согласно настоящему изобретению на передачу сигнала LEPR в присутствии и при отсутствии лептина. Для биоанализа клетки IMR-32/STAT3-Luc/hLEPR помещали на планшет с плотностью 20000 клеток/100 мкл/лунка для 96-луночного формата в полной среде и затем на следующий день среду заменяли соответствующим объемом среды Opti-MEM, дополненной 1% BSA и 0,1% FBS (аналитический буфер) в течение 30 мин. Для измерения действия антител согласно настоящему изобретению при отсутствии лептина антитела к LEPR или изотипическое контрольное антитело серийно разбавляли полулогарифмически до конечных концентраций в диапазоне от 100 нМ до 300 фМ в аналитическом буфере и затем добавляли к клеткам и затем инкубировали в течение ночи при 37°C в 5% CO₂. Для измерения действия антител согласно настоящему изобретению в присутствии лептина, к клеткам добавили фиксированную концентрацию лептина человека (hLeptin; R&D Systems, № по кат. 398-LP) в 200 пМ в аналитическом буфере, после чего сразу же добавили антитела к LEPR или изотипическое контрольное антитело, которые полулогарифмически серийно разводили до конечных концентраций в диапазоне от 100 нМ до 300 фМ. Затем образцы инкубировали в течение ночи при 37°C в 5% CO₂. Затем к образцам добавляли реагент OneGlo (Promega, № по кат. E6051) и измеряли активность люциферазы на считывающем устройстве Envision Multilable

Plate Reader (Perkin Elmer) в люминесцентном режиме. Получали значения относительных световых единиц (RLU) и результаты анализировали с использованием нелинейной регрессии с помощью программного обеспечения GraphPad Prism (GraphPad). Максимальное значение RLU, полученное из эффекта дозы hLeptin, определяли как 100% активация в анализе IMR-32/STAT3-Luc/hLEPR.

Как показано в табл. 15, в отсутствие лептина человека исследуемые антитела к LEPR продемонстрировали слабую стимуляцию клеток IMR-32/STAT3-Luc/hLEPR с максимальной активацией от 4% до 8%, соответственно, максимальная активация, полученная из эффекта дозы лептина человека. Одно антитело со слабой стимуляцией характеризовалось значением EC_{50} 1,27 нМ, в то время как другое из антител, H4N18440P2, не характеризовалось измеряемым значением EC_{50} . В присутствии 200 пМ лептина человека три из исследуемых антител к LEPR продемонстрировали полное ингибирование лептина в клетках IMR-32/STAT3-Luc/hLEPR со значениями IC_{50} , находящимися в диапазоне от 723 пМ (антитело H4N18457P2) до 1,83 нМ (антитело H4N17322P2) или 2,9 нМ (антитело H4N18464P2). Шесть из исследуемых антител к LEPR не продемонстрировали какого-либо измеряемого ингибирования в присутствии 200 пМ лептина человека. Изотипическое контрольное антитело не продемонстрировало какой-либо измеряемой стимуляции клеток IMR-32/STAT3-Luc/hLEPR в любом из анализов.

Таблица 15. Активация и ингибирование hLEPR антителами к LEPR

Антитело	IMR-32/LEPR без лептина человека		IMR-32/LEPR с 200 пМ лептина человека	
	EC_{50} (М)	% активации	IC_{50} (М)	% ингибирования
H4N18457P2	N/A	N/A	7,23E-10	100
H4N17322P2	1,27E-09	8	1,83E-09	100
H4N18464P2	1,30E-10	6	2,9E-09	100
H4N18437P2	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*
H4N18439P2	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*
H4N18440P2	IC*	4	N/A*	N/A*
H4N18462P2	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*
H4N18466P2	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*
H4N18508P2	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*
Антитело сравнения	N/A*	N/A*	1,03E-09	100

N/A* обозначает отсутствие измеряемого ингибирования и/или активации в анализе,

IC* обозначает неопределенный результат, заключающийся в том, что вычисленное значение EC_{50} не могло быть определено.

Пример 7. Исследуемая с помощью Octet перекрестная конкуренция между различными моноклональными антителами к LEPR.

Конкуренцию связывания между панелью различных моноклональных антител к LEPR определяли с использованием анализа интерферометрии биослоя без меток в реальном времени на биосенсорной платформе Octet HTX (Pall ForteBio Corp.). Весь эксперимент проводили при 25°C в буфере, содержащем 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA и 0,05% об./об. поверхностно-активного вещества Tween-20, 1 мг/мл BSA, pH 7,4 (HBS-EBT) со встряхиванием планшета со скоростью, составляющей 1000 об/мин.

Для оценки того, способны ли два антитела конкурировать друг с другом за связывание с рекомбинантным LEPR человека, экспрессированным с С-концевой тус-тус-гексагистидиновой меткой (hLEPR.MMH; SEQ ID: 90), приблизительно 0,25 нМ hLEPR-ММН вначале захватывали на наконечниках биосенсора Octet, покрытых антителами к пентагистидиновой метке (ForteBio Inc, № по кат. 18-5122), путем погружения наконечников биосенсора в течение 5 мин в лунки, содержащие 20 мкг/мл hLEPR-ММН. Наконечники биосенсора с захваченным антигеном затем насыщали первым моноклональным антителом к LEPR (которое затем называют mAb-1) путем погружения в лунки, содержащие 50 мкг/мл раствора mAb-1, в течение 210 с. Затем наконечники биосенсора последовательно погружали в лунки, содержащие 50 мкг/мл раствора второго моноклонального антитела к LEPR (которое затем называют mAb-2) на 150 с. Наконечники биосенсора отмывали в буфере HBS-EBT между каждой стадией эксперимента. Ответ связывания в режиме реального времени подвергали мониторингу в течение всего эксперимента и ответ связывания в конце каждой стадии регистрировали. Ответ связывания mAb-2 с hLEPR-ММН, предварительно образовавшим комплекс с mAb-1, сравнивали и определяли конкурентное/неконкурентное поведение различных моноклональных антител к LEPR, как показано в табл. 16.

Таблица 16. Перекрестная конкуренция между моноклональными антителами к LEPR

Связывание первого антитела (mAb-1) с захваченным hLEPR-ММН	Второе антитело (mAb-2), которое, как показано, конкурирует с mAb-1
H4N18439P2	H4N18440P2
H4N18440P2	H4N18439P2
H4N18457P2	H4N18462P2 H4N18437P2 H4N18466P2 H4N18508P2
H4N18462P2	H4N18457P2 H4N18437P2 H4N18466P2
H4N18437P2	H4N18457P2 H4N18462P2 H4N18466P2
H4N18466P2	H4N18457P2 H4N18462P2 H4N18437P2
H4N17322P2	Ни одно
H4N18464P2	Ни одно

Как показано в табл. 16, антитела H4N18439P2 и H4N18440P2 конкурируют друг с другом за связывание со своими соответствующими эпитопами. Антитела LEPR H4N18457P2, H4N18462P2, H4N18437P2, H4N18466P2 и H4N18508P2 конкурируют друг с другом за связывание со своими соответствующими эпитопами. Антитела H4N17322P2 и H4N18464P2 не конкурируют за связывание с соответствующими эпитопами H4N18439P2, H4N18440P2, H4N18457P2, H4N18462P2, H4N18437P2 и H4N18466P2.

Пример 8. In vivo испытание эффективности антагонистических антител LEPR у гуманизированных в отношении LEPR мышей.

Эффекты трех конкретных антагонистических антител к LEPR согласно настоящему изобретению, H4N17322P2, H4N18457P2 и H4N18464P2, на потребление пищи, массу тела и ожирение определяли у помещенных в клетки по одному, генетически сконструированных LEPR^{Hu/Hu} мышей, которые экспрессируют лептиновый рецептор, который состоит из последовательности эктодомена LEPR человека вместо последовательности эктодомена LEPR мыши.

Исходное суточное потребление пищи измеряли между 5 днем и 1 днем до начала лечения (дни -5 и -1). За четыре дня до лечения и через 6 дней после лечения (дни -4 и -6) состав тканей тела, включая в себя ожирение, количественно определяли с помощью микрокомпьютерной томографии. В день 0 32 самца LEPR^{Hu/Hu} мышей возрастом от 12 до 13 недель рандомизировали на четыре группы по 8 мышей на основании массы тела за 1 день до лечения (день -1). В день 0 каждая группа получала посредством подкожной инъекции однократную дозу одного из следующего: доза изотипического контрольного антитела, составляющая 30 мг/кг, H4N17322P2, составляющая 30 мг/кг, H4N18457P2, составляющая 30 мг/кг, или H4N18464P2, составляющая 30 мг/кг. Изотипическое контрольное антитело не связывается с каким-либо известным мышинным белком. Потребление пищи и массу тела измеряли в течение продолжительности исследования для каждого животного. На фиг. 1 обобщенно представлено процентное изменение потребления пищи от среднего исходного суточного потребления пищи для каждой группы лечения в каждый момент времени. Процентное изменение массы тела с дня 0 рассчитывали для каждого животного в каждый момент времени. На фиг. 2 обобщенно представлено среднее процентное изменение массы тела для животных в каждой группе лечения. На фиг. 3 обобщенно представлена средняя масса жировой ткани для животных в каждой группе лечения с помощью антитела, количественно определенная с помощью микрокомпьютерной томографии за 6 дней до и через 6 дней после лечения с помощью антитела. Все результаты выражены как среднее $\pm$ SEM.

Как показано на фиг. 1 и 2, мыши, получившие лечение с помощью антагонистических антител к LEPR, продемонстрировали увеличения процентного изменения потребления пищи и процентного изменения массы тела. Это увеличение не наблюдали в случае лечения с помощью изотипического контрольного антитела. Как показано на фиг. 1, мыши, получившие лечение с помощью H4N17322P2 в дозе 30 мг/кг, проявляли значительное увеличение потребления пищи, начиная с первого дня после лечения (день 1) и в последующие моменты времени по сравнению с мышами, которым вводили инъекцию изо-

типического контрольного антитела. Мыши, получившие лечение с помощью H4N18457P2 в дозе 30 мг/кг, проявляли значительное увеличение потребления пищи, начиная с дня 2 и в последующие моменты времени по сравнению с мышами, которым вводили инъекцию изотипического контрольного антитела. Мыши, получившие лечение с помощью H4N18464P2 в дозе 30 мг/кг, проявляли значительное увеличение потребления пищи, начиная с дня 2 и в последующие моменты времени, но не в день 4, по сравнению с мышами, которым вводили инъекцию изотипического контрольного антитела. Как показано на фиг. 2, мыши, получившие лечение с помощью H4N17322P2 в дозе 30 мг/кг, проявляли значительное увеличение процентного изменения массы тела, начиная с 4 дней после лечения (день 4) и в последующие моменты времени по сравнению с мышами, которым вводили инъекцию изотипического контрольного антитела. Мыши, получившие лечение с помощью H4N18457P2 в дозе 30 мг/кг, проявляли значительное увеличение процентного изменения массы тела, начиная с дня 3 и в последующие моменты времени по сравнению с мышами, которым вводили инъекцию изотипического контрольного антитела. Мыши, получившие лечение с помощью H4N18464P2 в дозе 30 мг/кг, проявляли значительное увеличение процентного изменения массы тела, начиная с дня 4 и в последующие моменты времени по сравнению с мышами, которым вводили инъекцию изотипического контрольного антитела. Как показано на фиг. 3, отсутствуют различия в массе жировой ткани между группами до лечения (день -4). Мыши, получившие лечение с помощью антитела H4N17322P2, H4N18457P2 и H4N18464P2 в дозе 30 мг/кг, продемонстрировали значительное увеличение массы жировой ткани через 6 дней после лечения (день 6) по сравнению с изотипическим контрольным антителом. В заключение, лечение с помощью антагонистического антитела LEPR, но не изотипического контрольного антитела, увеличивало потребление пищи, массу тела и ожирение у мышей.

Пример 9. Определение эпитопов LEPR человека, с которыми связываются антитела к LEPR согласно настоящему изобретению.

Для определения эпитопа LEPR человека, с которым связываются антитела к LEPR согласно настоящему изобретению, использовали анализ на основе проточной цитометрии Luminex FLEXMAP (FM3DD, LuminexCorp) для характеристики взаимодействия антител к LEPR с рекомбинантными белковыми доменами LEPR человека. Для анализа приблизительно 3 миллиона карбоксилированных микросфер Microplex[®] (Luminex, № по кат. LC1000A) промывали, встряхивали и обрабатывали ультразвуком в 0,1 М NaPO₄, pH 6,2 (буфер для активации), затем центрифугировали для удаления супернатанта. Микросферы ресуспендировали в 120 мкл буфера для активации и карбоксилатные группы (-COOH) активировали добавлением 15 мкл 50 мг/мл N-гидроксисукцинимид (NHS, Thermo Scientific, № по кат. 24500) с последующим добавлением 15 мкл 50 мг/мл 1-этил-3-[3-диметиламинопропил]карбодиимида (EDC, ThermoScientific, кат. № 22980) при 25°C. Через 10 мин pH реакции снижали до 5,0 с добавлением 600 мкл 50 мМ MES, pH 5 (буфер для связывания), и микросферы встряхивали и центрифугировали для удаления супернатанта. Активированные микросферы немедленно смешивали с 500 мкл 20 мкг/мл моноклональных антител к тус с IgG мыши или IgG человека в буфере для связывания и инкубировали в течение двух часов при 25°C. Реакцию связывания гасили добавлением 50 мкл 1М трис-HCl, pH 8,0, и микросферы быстро встряхивали, центрифугировали и промывали четыре раза с помощью 1 мл DPBS для удаления несвязанных белков и других компонентов реакции.

Транзиентно экспрессируемые белки LEPR, включающие в себя внеклеточный домен LEPR человека, экспрессированный с С-концевой тус-тус-гексагистидиновой меткой (LEPR-MMH человека, SEQ ID NO: 89), (D1) CRH1 LEPR человека, экспрессированный с С-концевой тус-тус-гексагистидиновой меткой ((D1)-MMH CRH1 LEPR человека, аминокислоты 1-208 согласно SEQ ID NO: 89 с тус-тус-гексагистидиновой меткой, аминокислоты 209-236), домен (D1,D2) CRH1 LEPR человека, экспрессированный с С-концевой тус-тус-гексагистидиновой меткой ((D1,D2)-MMH CRH1 LEPR человека, аминокислоты 1-318 согласно SEQ ID NO: 89 с тус-тус-гексагистидиновой меткой, аминокислоты 319-346), домен (D1,D2,D3) CRH1-Ig LEPR человека, экспрессированный с С-концевой тус-тус-гексагистидиновой меткой ((D1,D2,D3)-MMH CRH1 LEPR человека, аминокислоты 1-278 согласно SEQ ID NO: 89 с тус-тус-гексагистидиновой меткой, аминокислоты 279-306), домен (D2,D3) CRH1-Ig LEPR человека, экспрессированный с С-концевой тус-тус-гексагистидиновой меткой ((D2,D3)-MMH CRH1-Ig LEPR человека, аминокислоты 1-198 согласно SEQ ID NO: 89 с тус-тус-гексагистидиновой меткой, аминокислоты 199-226), домен (D3) Ig LEPR человека, экспрессированный с С-концевой тус-тус-гексагистидиновой меткой ((D3)-MMH Ig LEPR человека, аминокислоты 1-88 согласно SEQ ID NO: 89 с тус-тус-гексагистидиновой меткой, аминокислоты 89-116), домен CRH2 LEPR человека, экспрессированный с С-концевой тус-тус-гексагистидиновой меткой (CRH2-MMH LEPR человека, аминокислоты 1-207 согласно SEQ ID NO: 89 с тус-тус-гексагистидиновой меткой, аминокислоты 208-235), домен FNIII LEPR человека, экспрессированный с С-концевой тус-тус-гексагистидиновой меткой (FNIII-MMH LEPR человека, аминокислоты 1-204 согласно SEQ ID NO: 89 с тус-тус-гексагистидиновой меткой, аминокислоты 205-232), и домен Ig-CRH2-FNIII LEPR человека, экспрессированный с С-концевой тус-тус-гексагистидиновой меткой (Ig-CRH2-FNIII-MMH LEPR человека, аминокислоты 1-510 согласно SEQ ID NO: 89 с тус-тус-гексагистидиновой меткой, аминокислоты 511-538), суспендировали в бесывороточной среде CHO-S-SFM II (Thermo Fisher, № по кат. 31033020) и затем осветляли центрифуги-

рованием. Аликвоты микросфер с иммобилизованными моноклональными антителами к тус, полученными, как описано выше, добавляли по отдельности к 1 мл каждого из этих белковых супернатантов.

Микросферы осторожно перемешивали, инкубировали в течение двух часов при 25°C, дважды отмывали с помощью 1 мл DBPS, центрифугировали для удаления супернатанта и, наконец, ресуспендировали в 1 мл буфера DPBS. 48 мкл микросфер, связанных с IgG к тус, из отдельных реакций с полноразмерным LEPR человека и с каждым из белков домена LEPR человека отбирали и смешивали вместе в 3,6 мл PBS+20 мг/мл BSA+0,05% азида натрия (блокирующий буфер).

Из этого смешанного пула 75 мкл микросфер высевали на лунку на 96-луночный фильтрующий планшет (Millipore, номер по каталогу: MSBVN1250) и смешивали с 25 мкл отдельных моноклональных антител к LEPR человека (0,5 или 5 мкг/мл), инкубировали в течение двух часов при 25°C и затем дважды отмывали с помощью 200 мкл DPBS с 0,05% Tween 20 (отмывочный буфер). Для обнаружения и количественного определения количества содержания антител к LEPR, связанных с отдельными микросферами, либо 100 мкл 2,5 мкг/мл конъюгированного с R-фикоэритрином козьего F(ab')₂ антитела к каппа-цепи человека (Southern Biotech, № по кат. 2063-09) в блокирующем буфере, либо 100 мкл 1,25 мкг/мл конъюгированного с R-фикоэритрином F(ab')₂ AffiniPure в блокирующем буфере, либо 100 мкл 1,25 мкг/мл конъюгированного с R-фикоэритрином F(ab')₂ фрагмента AffiniPure козьего антитела к IgG мыши, специфического в отношении F(ab')₂ фрагмента (Jackson ImmunoResearch, № по кат. 115-116-072) в блокирующем буфере, добавляли и инкубировали в течение 30 мин при 25°C. Через 30 мин образцы отмывали дважды с помощью 200 мкл отмывочного буфера и ресуспендировали в 150 мкл отмывочного буфера. Медианную интенсивность флуоресценции (MFI) микросфер измеряли в анализаторе LumineX.

Результаты анализа на основе LumineX сведены в табл. 17. Интенсивности сигнала MFI LumineX указывают на то, что девять антител к LEPR согласно настоящему изобретению связывались с полным внеклеточным доменом LEPR человека. Антитела к LEPR, H4N18439P2 и H4N18440P2, связывались с эпитопами в пределах домена D2 CRH1 LEPR человека. Антитела к LEPR H4N17322P2 и COMP3551, связанные с эпитопами в домене CRH2 LEPR человека. Антитела к LEPR, H4N18437P2, H4N18457P2, H4N18508P2, H4N18466P2 и H4N18462P2, связывались с эпитопами в пределах домена FNIII LEPR человека. Антитело к LEPR, H4N18464P2, связывалось с эпитопами в пределах домена Ig(D3) LEPR человека.

Таблица 17. Полученный с помощью LumineX сигнал MFI связывания антител к LEPR с полноразмерным внеклеточным доменом LEPR человека и выделенными доменами LEPR человека, меченных меткой тус

Антитело	CRH1 (D1)	CRH1 (D1,D2)	CRH1-Ig (D1,D2,D3)	CRH1-Ig (D2,D3)	Ig (D3)	CRH2	FNIII	Ig-CRH2-FNIII	Полноразм. внеклеточ. домен	Возможный сайт связывания
H4N17322P2	14	50	31	58	26	19745	23	15097	8932	CRH2
H4N18437P2	21	82	34	43	26	25	1593	15625	8644	FNIII
H4N18457P2	13	53	31	43	18	18	1187	13235	7500	FNIII
H4N18508P2	10	274	217	372	24	18	741	13007	5865	FNIII
H4N18466P2	15	56	209	76	26	17	457	11270	5070	FNIII
H4N18439P2	11	21179	8021	10026	18	16	13	43	5472	CRH1 D2
H4N18440P2	8	19337	8245	9165	14	17	10	32	7035	CRH1 D2
H4N18464P2	13	59	5557	3742	27	24	23	15119	9385	Ig(D3)
H4N18462P2	5381	5731	3961	47	21	24	581	14858	5852	FNIII
H4N18462P2										
*	615	665	461	25	10	8	229	11153	3610	FNIII
Антитело сравнения	-14	19	-57	27	10	9404	73	7112	3908	CRH2

* - антитело, исследуемое в концентрации 0,5 мкг/мл вместо 5 мкг/мл.

Объем настоящего изобретения не ограничен конкретными вариантами осуществления, описанными в настоящем документе. Действительно, различные модификации согласно настоящему изобретению в дополнение к описанным в настоящем документе станут очевидными специалистам в настоящей области техники из предшествующего описания и прилагаемых фигур. Подразумевается, что такие модификации подпадают под объем прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с лептиновым рецептором человека (LEPR), причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит следующее: (а) определяющие комплементарность области (CDR) вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), которая содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 42 и SEQ ID NO: 58 и (b) CDR вариабельной области легкой цепи (LCVR), которая содержит аминокислотную последовательность представленную в SEQ ID NO: 10.

2. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, причем антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую:

LCDR1, которая содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12;

LCDR2, которая содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14; и

LCDR3, которая содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую:

(i)

HCDR1, которая содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4;

HCDR2, которая содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 6; и

HCDR3, которая содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 8;

(ii)

HCDR1, которая содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 44;

HCDR2, которая содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 46; и

HCDR3, которая содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 48; или

(iii)

HCDR1, которая содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 60;

HCDR2, которая содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 62; и

HCDR3, которая содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 64.

3. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.2, которое представляет собой полноразмерное антитело, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2, и вариабельную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 10.

4. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.2, которое представляет собой полноразмерное антитело, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 42, и вариабельную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 10.

5. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.2, которое представляет собой полноразмерное антитело, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 58, и вариабельную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 10.

6. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-5 и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

7. Применение фармацевтической композиции по п.6 для лечения заболевания, ассоциированного с или вызванного передачей сигнала лептина.

8. Применение по п.7, при котором заболевание или состояние, ассоциированное или вызванное передачей сигнала лептина выбрано из группы, состоящей из следующего: анорексия, психическое расстройство пищевого поведения, кахексия, кахексия при хроническом заболевании почек, кахексия при застойной сердечной недостаточности, легочная кахексия, лучевая кахексия, раковая кахексия, аутоиммунное нарушение, воспалительное заболевание кишечника, красная волчанка, рассеянный склероз, псориаз, сердечно-сосудистое заболевание, повышенное артериальное давление, неалкогольный стеатоз печени, нейродегенеративное расстройство, депрессия, рак, почечноклеточная карцинома, меланома и рак молочной железы.

9. Применение фармацевтической композиции по п.6 для лечения заболевания или состояния, ассоциированного или вызванного активирующей LEPR мутацией.

10. Применение по п.9, при котором мутация LEPR представляет собой LEPR Q223R.

11. Применение по п.9 или 10, при котором заболевание или состояние, ассоциированное или вызванное активирующей LEPR мутацией, представляет собой кахексию.

12. Применение по любому из пп.7-11, где композиция терапевтически скомбинирована со вторым терапевтическим средством и дополнительно предусматривает введение композиции субъекту, и причем второе терапевтическое средство выбрано из антидепрессанта, стимулятора аппетита, лекарственного средства для анорексии и кахексии, ингибитора COX-2, НПВП, лекарственного средства для устранения потери мышечной массы, мышечной функции и/или мышечной силы с кахексией или без нее, лекарст-

венного средства для неалкогольного стеатоза печени (NAFLD), лекарственного средства для инфекции ВИЧ/СПИД, блокатора продукции TNF-альфа, антиоксиданта, антагониста фактора некроза опухоли (TNF), стимулятора В-лимфоцитов, ингибитора ангиотензинпревращающего фермента (ACE), ингибитора киназы и химиотерапевтического средства.

13. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.3, у которого переменная область тяжелой цепи связана с Fc IgG4 человека.

14. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.4, у которого переменная область тяжелой цепи связана с Fc IgG4 человека.

15. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.5, у которого переменная область тяжелой цепи связана с Fc IgG4 человека.

16. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по п.13 и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

17. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по п.14 и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

18. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по п.15 и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

19. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область легкой цепи, содержащую:

LCDR1, которая содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12;

LCDR2, которая содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 14; и

LCDR3, которая содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 16, и переменную область тяжелой цепи, содержащую:

HCDR1, которая содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4;

HCDR2, которая содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 6; и

HCDR3, которая содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 8.

20. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область легкой цепи, содержащую:

LCDR1, которая содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12;

LCDR2, которая содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 14; и

LCDR3, которая содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 16, и переменную область тяжелой цепи, содержащую:

HCDR1, которая содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 44;

HCDR2, которая содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 46; и

HCDR3, которая содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 48.

21. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область легкой цепи, содержащую:

LCDR1, которая содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12;

LCDR2, которая содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 14; и

LCDR3, которая содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 16, и переменную область тяжелой цепи, содержащую:

HCDR1, которая содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 60;

HCDR2, которая содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 62; и

HCDR3, которая содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 64.

22. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.13, у которого переменная область легкой цепи связана с константным доменом легкой цепи каппа.

23. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.14, у которого переменная область легкой цепи связана с константным доменом легкой цепи каппа.

24. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.15, у которого переменная область легкой цепи связана с константным доменом легкой цепи каппа.

25. Выделенный полинуклеотид, кодирующий переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-5.

26. Полинуклеотид по п.25, содержащий нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 41 и 9.

27. Выделенный вектор, содержащий полинуклеотид по п.26.

28. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п.27.

29. Способ лечения заболевания, ассоциированного с или вызванного передачей сигнала лептина у субъекта, предусматривающий введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-5.

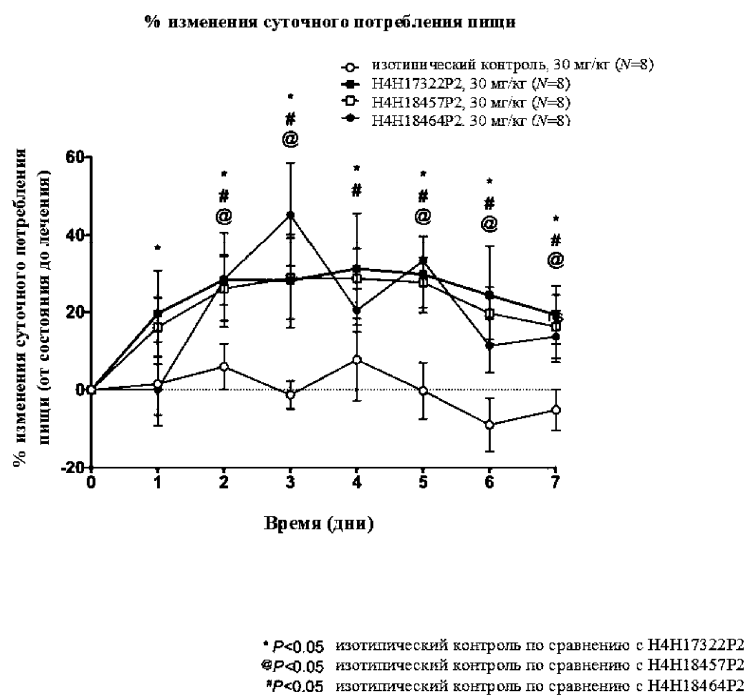
30. Способ по п.29, при котором заболевание представляет собой анорексию, психическое расстройство пищевого поведения, кахексию при хроническом заболевании почек, кахексию, кахексию при застойной сердечной недостаточности, легочную кахексию, лучевую кахексию, раковую кахексию, аутоиммунное нарушение, воспалительное заболевание кишечника, красную волчанку, рассеянный склероз,

псориаз, сердечнососудистое заболевание, повышенное артериальное давление, неалкогольный стеатоз печени, нейродегенеративное расстройство, депрессию, рак, почечноклеточную карциному, меланому и рак молочной железы.

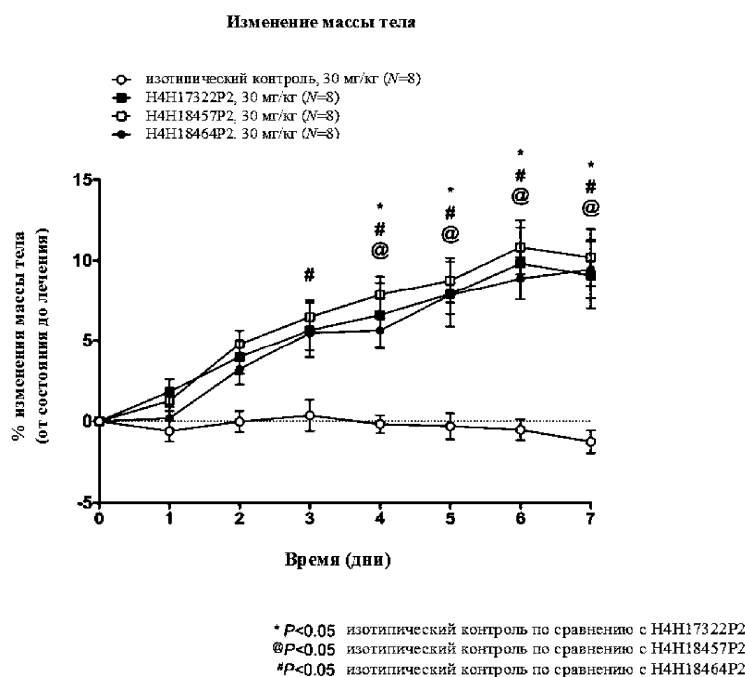
31. Способ лечения заболевания или состояния, ассоциированного с или вызванного активирующей LEPR мутацией, у субъекта, предусматривающий введение антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-5 нуждающемуся в этом субъекту.

32. Способ по п.31, где мутация LEPR представляет собой LEPR Q223R.

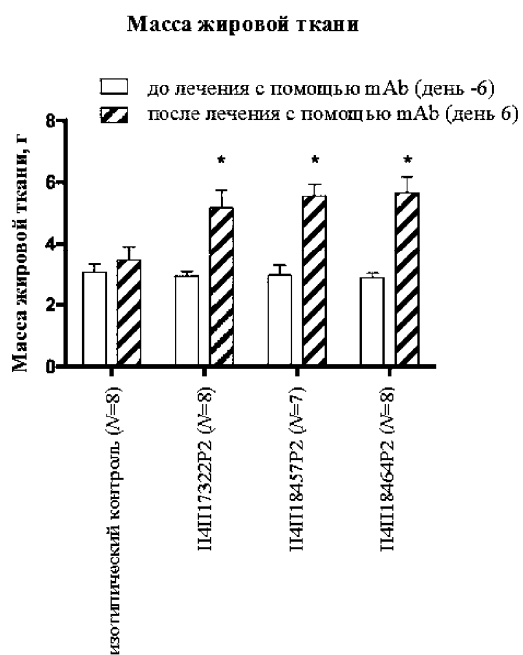
33. Способ по любому из пп.31 или 32, при котором заболевание или состояние, ассоциированное с или вызванное активирующей LEPR мутацией, представляет собой кахексию.



Фиг. 1



Фиг. 2



* $P < 0,05$ после лечения с помощью mAb по сравнению с состоянием до лечения с помощью mAb

Фиг. 3

