



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.12.09

(21) Номер заявки
201890928

(22) Дата подачи заявки
2016.10.11

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(54) АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ, КОТОРЫЕ АКТИВИРУЮТ ЛЕПТИНОВЫЙ РЕЦЕПТОР

(31) 62/240,021; 62/359,757; 62/375,495;
62/393,143

(32) 2015.10.12; 2016.07.08; 2016.08.16;
2016.09.12

(33) US

(43) 2018.09.28

(86) PCT/US2016/056465

(87) WO 2017/066204 2017.04.20

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

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

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

(56) US-B1-6977240
A. AHMANN ET AL.: "Efficacy and safety
of liraglutide versus placebo added to basal insulin
analogues (with or without metformin) in patients
with type 2 diabetes: a randomized, placebo-controlled

trial", DIABETES, OBESITY AND METABOLISM,
vol. 17, no. 11, 10 September 2015 (2015-09-10),
pages 1056-1064, XP055328919, ISSN: 1462-8902, DOI:
10.1111/dom.12539, abstract

E W IEPSEN ET AL.: "Treatment with a GLP-1
receptor agonist diminishes the decrease in free plasma leptin
during maintenance of weight loss", INTERNATIONAL
JOURNAL OF OBESITY, vol. 39, no. 5, 7 October 2014
(2014-10-07), pages 834-841, XP055328916, GB, ISSN:
0307-0565, DOI: 10.1038/ijo.2014.177, abstract

USSAR SIEGFRIED ET AL.: "Receptor
antibodies as novel therapeutics for diabetes", SCIENCE
TRANSLATIONAL MEDICINE, AAAS - AMERICAN
ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF
SCIENCE, US, vol. 3, no. 113, 14 December
2011 (2011-12-14), pages 22-24, XP009163038, ISSN:
1946-6242, DOI: 10.1126/SCITRANSLMED.3003447, p 3,
lhc, 1st six lines

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

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, the whole
document

(57) Настоящее изобретение предусматривает антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, которые связываются с лептиновым рецептором (LEPR), а также способы получения того же самого. В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящее изобретение предусматривает антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, которые связывают LEPR и активируют передачу сигнала посредством LEPR. В соответствии с другими вариантами осуществления настоящее изобретение предусматривает антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, которые связываются с LEPR и усиливают сенсибилизацию LEPR по отношению к антигену. В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящее изобретение предусматривает антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, которые связывают LEPR в присутствии и отсутствии лептина. В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящее изобретение предусматривает антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, которые индуцируют передачу сигнала в клетках, экспрессирующих мутанты LEPR, которые иначе характеризуются дефектом или нарушением передачи сигнала в присутствии лептина. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению применимы для лечения липодистрофий и других заболеваний и

нарушений, ассоциированных с или вызванных недостаточностью лептина или устойчивостью к лептину.

041859 B1

041859 B1

Область техники, к которой относится настоящее изобретение

Настоящее изобретение относится к антителам и антигенсвязывающим фрагментам антител, которые связывают лептиновый рецептор человека (LEPR), а также терапевтическим и диагностическим способам применения таких антител.

Перечень последовательностей

Официальная копия перечня последовательностей подана одновременно с настоящим описанием в электронном виде посредством EFS-Web в виде перечня последовательностей в формате ASCII в файле под названием 2016_10_11_10178WO01_Sequence_Listing_as_Filed_ST25.TXT, дата создания 11 октября 2016 г., размер приблизительно 99,6 килобайт. Перечень последовательностей, содержащийся в документе формата ASCII, является частью настоящего описания и включен в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

Лептин представляет собой полипептидный гормон, экспрессируемый главным образом жировой тканью, который участвует в регуляции метаболизма, энергетического баланса и потребления пищи. Активность лептина опосредована взаимодействием с лептиновым рецептором и передачей сигнала посредством такового. Лептиновый рецептор (также известный как "LEPR", "WSX", "рецептор OB", "OB-R" и "CD295") является однопроходным трансмембранным рецептором семейства рецепторов цитокинов I класса с большим (818 аминокислот) внеклеточным доменом. Недостаточность лептина, устойчивость к лептину и определенные мутации с дефектом передачи сигнала/нарушением передачи сигнала посредством LEPR, ассоциированы с ожирением, диабетом 2 типа, дислипидемией, липодистрофиями, стеатозом печени, неалкогольной жировой дистрофией печени и алкогольной жировой дистрофией печени, тяжелой невосприимчивостью к инсулину, лепречаунизмом/синдромом Донохью, синдромом Рабсона-Менденхолла и соответствующими осложнениями. Терапевтические подходы, связанные с решением проблем устойчивости к лептину, недостаточности лептина и гиполептинемии (например, липодистрофии), преимущественно были направлены на доставку дополнительного лептина или аналогов лептина пораженным индивидуумам. Однако такие подходы в целом показали ограниченную эффективность, особенно у индивидуумов с устойчивостью к лептину, и часто связаны с нежелательными побочными эффектами. Таким образом, в данной области существует необходимость в альтернативных подходах к лечению устойчивости к лептину и других состояний, ассоциированных с устойчивостью к лептину или гиполептинемией.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

Настоящее изобретение предусматривает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают лептиновый рецептор человека (LEPR). Антитела по настоящему изобретению представляют собой агонистические антитела, т.е. связывание антител к LEPR по настоящему изобретению с LEPR вызывает, в числе прочего, активацию передачи сигнала посредством лептинового рецептора в клетках. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела по настоящему изобретению не конкурируют с лептином за связывание с LEPR. Антитела по настоящему изобретению применимы, например, для имитации, замещения или дополнения нормальной биологической активности лептина у субъекта. Таким образом, антитела и антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению применимы при терапевтическом лечении заболеваний или нарушений, ассоциированных с устойчивостью к лептину и недостаточностью лептина.

Антитела по настоящему изобретению могут быть полноразмерными (например, антитело IgG1 или IgG4) или могут содержать только антигенсвязывающий участок (например, Fab-, F(ab')₂- или scFv-фрагмент), и могут быть модифицированы с целью воздействия на функциональные свойства, например, устранения остаточных эффекторных функций (Reddy et al., 2000, J. Immunol. 164:1925-1933).

Иллюстративные антитела к LEPR по настоящему изобретению представлены в табл. 1 и 2 настоящего документа. В табл. 1 изложены идентификаторы аминокислотных последовательностей переменных участков тяжелой цепи (HCVR), переменных участков легкой цепи (LCVR), определяющих комплементарность областей тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и определяющих комплементарность областей легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) иллюстративных антител к LEPR. В табл. 2 изложены идентификаторы последовательностей нуклеиновых кислот HCVR, LCVR, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 иллюстративных антител к LEPR.

Настоящее изобретение предусматривает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают LEPR, содержащие HCVR, содержащие аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCVR, представленных в табл. 1, или фактически аналогичную ей последовательность, на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичную ей последовательность.

Настоящее изобретение также предусматривает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают LEPR, содержащие LCVR, содержащие аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCVR, представленных в табл. 1, или фактически аналогичную ей последовательность, на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичную ей последовательность.

14, 16; 44, 46, 48, 12, 14, 16; 52, 54, 56, 12, 14, 16; 60, 62, 64, 68, 70, 72; 76, 78, 80, 68, 70, 72; и 84, 86, 88, 68, 70, 72.

В соответствии со связанным вариантом осуществления настоящее изобретение также предусматривает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфично связывают LEPR, содержащие совокупность из шести CDR (т.е. HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащихся в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, как определено с помощью любого из иллюстративных антител к LEPR, представленных в табл. 1. Например, настоящее изобретение предусматривает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают LEPR, содержащие совокупность аминокислотных последовательностей HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащихся в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 18/10, 26/10, 34/10, 42/10, 50/10, 58/66, 74/66 и 82/66. Способы и методики выявления CDR в аминокислотных последовательностях HCVR и LCVR хорошо известны в данной области и могут быть использованы для идентификации CDR в определенных аминокислотных последовательностях HCVR и/или LCVR, раскрываемых в настоящем документе. Иллюстративные соглашения, которые можно использовать для идентификации границ CDR, включают, например, определение по Кабат, определение по Чотиа и определение по AbM. В целом, определение по Кабат основано на вариативности последовательностей, определение по Чотиа основано на положении областей структурных петель и определение по AbM является компромиссным решением между подходами Кабат и Чотиа. 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 56:9268-9272 (1989). Общедоступные базы данных также доступны для идентификации последовательностей CDR в антителе.

Настоящее изобретение также предусматривает молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие антитела к LEPR или их участки. Например, настоящее изобретение предусматривает молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей HCVR, представленных в табл. 1; в соответствии с определенными вариантами осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновых кислот HCVR, представленных в табл. 2, или фактически аналогичную ей последовательность, на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичную ей последовательность.

Настоящее изобретение также предусматривает молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей LCVR, представленных в табл. 1; в соответствии с определенными вариантами осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновых кислот LCVR, представленных в табл. 2, или фактически аналогичную ей последовательность, на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичную ей последовательность.

Настоящее изобретение также предусматривает молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей HCDR1, представленных в табл. 1; в соответствии с определенными вариантами осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновых кислот HCDR1, представленных в табл. 2, или фактически аналогичную ей последовательность, на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичную ей последовательность.

Настоящее изобретение также предусматривает молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей HCDR2, представленных в табл. 1; в соответствии с определенными вариантами осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновых кислот HCDR2, представленных в табл. 2, или фактически аналогичную ей последовательность, на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичную ей последовательность.

Настоящее изобретение также предусматривает молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей HCDR3, представленных в табл. 1; в соответствии с определенными вариантами осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновых кислот HCDR3, представленных в табл. 2, или фактически аналогичную ей последовательность, на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичную ей последовательность.

Настоящее изобретение также предусматривает молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей LCDR1, представленных в табл. 1; в соответствии с определенными вариантами осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновых кислот LCDR1, представленных в табл. 2, или фактически аналогичную ей последовательность, на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичную ей последовательность.

Настоящее изобретение также предусматривает молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей LCDR2, представленных в табл. 1; в соответствии с опре-

деленными вариантами осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновых кислот LCDR2, представленных в табл. 2, или фактически аналогичную ей последовательность, на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичную ей последовательность.

Настоящее изобретение также предусматривает молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей LCDR3, представленных в табл. 1; в соответствии с определенными вариантами осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновых кислот LCDR3, представленных в табл. 2, или фактически аналогичную ей последовательность, на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичную ей последовательность.

Настоящее изобретение также предусматривает молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие HCVR, где HCVR содержит совокупность из трех CDR (т.е. HCDR1, HCDR2, HCDR3), где совокупность аминокислотных последовательностей HCDR1, HCDR2, HCDR3 определена с помощью любой из иллюстративных антител к LEPR, представленных в табл. 1.

Настоящее изобретение также предусматривает молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие LCVR, где LCVR содержит совокупность из трех CDR (т.е. LCDR1, LCDR2, LCDR3), где совокупность аминокислотных последовательностей LCDR1, LCDR2, LCDR3 определена с помощью любой из иллюстративных антител к LEPR, представленных в табл. 1.

Настоящее изобретение также предусматривает молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие как HCVR, так и LCVR, где HCVR содержит аминокислотную последовательность любой из аминокислотных последовательностей HCVR, представленных в табл. 1, и где LCVR содержит аминокислотную последовательность любой из аминокислотных последовательностей LCVR, представленных в табл. 1. В соответствии с определенными вариантами осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты HCVR, представленных в табл. 2, или фактически аналогичную ей последовательность, на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичную ей последовательность, и полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты LCVR, представленных в табл. 2, или фактически аналогичную ей последовательность, на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичную ей последовательность. В соответствии с определенными вариантами осуществления в соответствии с этим аспектом настоящего изобретения молекула нуклеиновой кислоты кодирует HCVR и LCVR, где как HCVR, так и LCVR происходят из одного и того же антитела к LEPR, представленного в табл. 1.

Настоящее изобретение также предусматривает рекомбинантные векторы экспрессии, способные экспрессировать полипептид, содержащий вариабельный участок тяжелой или легкой цепи антитела к LEPR. Например, настоящее изобретение предусматривает рекомбинантные векторы экспрессии, содержащие любую из молекул нуклеиновой кислоты, упомянутых выше, например, молекул нуклеиновых кислот, кодирующих любую из последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, изложенных в табл. 1. Также в объем настоящего изобретения включены клетки-хозяева, в которые такие векторы были введены, а также способы получения антител или их частей в результате культивирования клеток-хозяев в условиях, способствующих получению антител или фрагментов антител, и извлечения антител или фрагментов антител, полученных таким образом.

В соответствии с другим аспектом настоящее изобретение предусматривает фармацевтическую композицию, содержащую рекомбинантное человеческое антитело или его фрагмент, который специфически связывает LEPR, и фармацевтически приемлемый носитель. В соответствии со связанным аспектом настоящее изобретение предусматривает композицию, которая представляет собой комбинацию антитела к LEPR и второго терапевтического средства. В соответствии с одним вариантом осуществления второе терапевтическое средство представляет собой любое средство, которое предпочтительно комбинируется с антителом к LEPR.

В соответствии с еще одним аспектом настоящее изобретение предусматривает терапевтические способы усиления или стимуляции передачи сигнала посредством LEPR с помощью антитела к LEPR или антигенсвязывающей части антитела по настоящему изобретению. Терапевтические способы в соответствии с этим аспектом настоящего изобретения предусматривают введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела по настоящему изобретению субъекту, нуждающемуся в этом. Нарушение, подлежащее лечению, представляет собой любое заболевание или состояние, которое нормализуется, ослабляется, подавляется или предупреждается в результате стимуляции или активации передачи сигнала посредством LEPR, или иной имитации природной активности лептина *in vitro* или *in vivo*.

Другие варианты осуществления будут очевидны из обзора последующего подробного описания.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 представлено связывание димерного LEPR человека с лептином человека в присутствии возрастающих концентраций исследуемых антител к LEPR или контрольных молекул, измеряемых с по-

мощью ELISA (поглощение при 450 нм).

На фиг. 2А-С представлена степень передачи сигнала посредством LEPR в клетках HEK293, экспрессирующих либо LEPR дикого типа (кружки), либо мутант LEPR с дефектом передачи сигнала (A409E, квадратики), либо мутант LEPR с нарушением передачи сигнала (P316T, треугольники). Передача сигнала посредством LEPR экспрессируется в виде соотношения pSTAT3-Y705/STAT3, измеряемого с помощью денситометрии на основе вестерн-блотов, полученных из клеток, обработанных возрастающими концентрациями лептина (фиг. 2А), H4N16650 (фиг. 2В) или H4N16679 (фиг. 2С).

На фиг. 3 показано среднее суточное потребление пищи мышами с недостаточностью лептина, которым вводили либо антитело изотипического контроля при 3 мг/кг, либо антитело к LEPR, выбранное из H4N16650P2, H4N16679P2, H4N17319P2 или H4N17321P2 при 3 мг/кг.

На фиг. 4 показан средний процент изменения массы тела мышей с недостаточностью лептина, которым вводили либо антитело изотипического контроля при 3 мг/кг, либо антитело к LEPR, выбранное из H4N16650P2, H4N16679P2, H4N17319P2 или H4N17321P2 при 3 мг/кг.

На фиг. 5 показана средняя масса жировой ткани у животных в каждой группе обработки антителами, представленная количественно в виде μ СТ за 1 день до (столбики не закрашены) и через 6 дней после обработки антителами (закрашенные столбики), выраженная в виде среднего $\pm$ SEM.

На фиг. 6 показан средний процент изменения массы тела мышей, получавших с пищей 30 мг/кг антитела, выбранного из H4N18482P2, H4N18487P2, H4N18492P2 или изотипического контроля.

Фиг. 7А, В. На фиг. 7А показана масса жировой ткани мышей до введения антител к LEPR H4N18482P2, H4N18487P2 или H4N18492P2. На фиг. 7В показана масса жировой ткани мышей, обработанных 30 мг/кг H4N18482P2, H4N18487P2 или H4N18492P2.

Фиг. 8. На фиг. 8 показано, что исследуемые антитела к LEPR активировали LEPR мыши (Mf) в клеточной линии IMR-32/STAT3-luc/Mf LEPR.

Подробное раскрытие настоящего изобретения

Перед описанием настоящего изобретения необходимо понимать, что настоящее изобретение не ограничивается конкретными описанными способами и условиями экспериментов, поскольку такие способы и условия могут меняться. Также необходимо понимать, что терминология, используемая в настоящем документе, предназначена лишь в целях описания конкретных вариантов осуществления и не носит ограничительный характер, поскольку область настоящего изобретения будет ограничиваться лишь прилагаемой формулой изобретения.

Если не определено иное, все технические и научные выражения, применяемые в настоящем документе, имеют такое же значение, как обычно понимается специалистом в области, к которой принадлежит настоящее изобретение. Используемое в настоящем документе выражение "приблизительно", при отсылке на конкретное описываемое числовое значение, означает, что значение может отличаться от описываемого значения не более чем на 1%. Например, используемое в настоящем документе выражение "приблизительно 100" включает 99 и 101 и все значения между ними (например, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4 и др.).

Хотя любые способы и материалы, аналогичные или эквивалентные тем, которые описаны в настоящем документе, можно использовать при практическом осуществлении или испытании настоящего изобретения, ниже описаны предпочтительные способы и материалы.

Определения

Выражение "лептиновый рецептор", "LEPR" и т.п., используемое в настоящем документе, относится к лептиновому рецептору человека, содержащему аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO:113 (см. также номер доступа в UniProtKB/Swiss-Prot P48357). Альтернативные названия LEPR, используемые в научной литературе, включают "рецептор OB", "OB-R" и "CD295". LEPR также называется "WSX" (см., например, патент США № 7524937). Выражение "LEPR" включает как мономерные, так и мультимерные (например, димерные) молекулы LEPR. Используемое в настоящем документе выражение "мономерный LEPR человека" означает белок LEPR или его часть, которая не содержит или не имеет никаких доменов, способных к мультимеризации, и который существует в нормальных условиях в виде одиночной молекулы LEPR без прямой физической связи с другой молекулой LEPR. Иллюстративной мономерной молекулой LEPR является молекула, называемая в настоящем документе "hLEPR.mmh", содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:114 (см., например, пример 3 настоящего документа). Используемое в настоящем документе выражение "димерный LEPR человека" означает конструкцию, содержащую две молекулы LEPR, соединенные друг с другом с помощью линкера, ковалентной связи, нековалентной связи или с помощью домена, способного к мультимеризации, такого как Fc-домен антитела. Иллюстративной димерной молекулой LEPR является молекула, называемая в настоящем документе "hLEPR.mFc", содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:115 (см., например, пример 3 настоящего документа), или молекула, называемая "hLEPR.hFc", содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:116. Используемые в настоящем документе выражения "антитело к LEPR", "антитело, которое специфически связывает LEPR", "LEPR-специфический связывающий белок" и т.п., если особым образом не указано иное, относятся к молекулам, которые связывают полноразмерный LEPR человека, мономерный LEPR человека, димерный LEPR человека или другие

конструкции, которые содержат или состоят из внеклеточного домена LEPR.

Все ссылки на белки, полипептиды и фрагменты белков в настоящем документе относятся к человеческому варианту соответствующего белка, полипептида или фрагмента белка, если явным образом не указано, что он происходит от отличных от человека видов. Таким образом, выражение "LEPR" означает LEPR человека, если не указано, что он происходит от отличных от человека видов, например "LEPR мыши", "LEPR обезьяны" и др.

Используемое в настоящем документе выражение "экспрессируемый на клеточной поверхности LEPR" означает один или несколько белков LEPR, или их внеклеточный домен, который (которые) экспрессируется (экспрессируются) на поверхности клетки *in vitro* или *in vivo* таким образом, что по меньшей мере часть белка LEPR обращена к внеклеточной стороне клеточной мембраны и является доступной для антигенсвязывающей части антитела. "Экспрессируемый на клеточной поверхности LEPR" может содержать белок LEPR или состоять из такового, экспрессируемого на поверхности клетки, которая обычно (например, в нативном состоянии или в состоянии дикого типа) экспрессирует белок LEPR. Альтернативно "экспрессируемый на клеточной поверхности LEPR" может содержать белок LEPR или состоять из такового, экспрессируемого на поверхности клетки, которая обычно не экспрессирует LEPR человека на своей поверхности, однако была искусственно сконструирована в целях экспрессии LEPR на своей поверхности.

Используемые в настоящем документе выражения, такие как "антитело к LEPR" или "антитело, которое связывает лептиновый рецептор человека", включают как моновалентные антитела с единственной специфичностью, так и биспецифические антитела, содержащие первый фрагмент, который связывает LEPR, и второй фрагмент, который связывает второй (целевой) антиген, где фрагмент антитела к LEPR содержит любую из последовательностей HCVR/LCVR или CDR, изложенных в табл. 1 настоящего документа.

Термин "антитело", используемый в настоящем документе, означает любую антиген-связывающую молекулу или молекулярный комплекс, содержащий по меньшей мере одну определяющую комплементарность область (CDR), которая специфически связывается с или взаимодействует с определенным антигеном (например, LEPR). Термин "антитело" включает молекулы иммуноглобулинов, 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 переменный участок тяжелой цепи (в данном документе имеет аббревиатуру HCVR или V_H) и константный участок тяжелой цепи. Константный участок тяжелой цепи содержит три домена, C_H1 , C_H2 и C_H3 . Каждая легкая цепь содержит переменный участок легкой цепи (в данном документе имеет аббревиатуру LCVR или V_L) и константный участок легкой цепи. Константный участок легкой цепи содержит один домен (C_L1). Участки V_H и V_L могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), чередующиеся с более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждый V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца до карбоксиконца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В соответствии с различными вариантами осуществления настоящего изобретения FR антитела к LEPR (или его антигенсвязывающего участка) могут быть идентичными последовательностям зародышевой линии человека или могут быть естественно или искусственно изменены. Аминокислотная консенсусная последовательность может быть определена на основании анализа "бок о бок" двух или более CDR.

Термин "антитело", используемый в настоящем документе, также включает антигенсвязывающие фрагменты целых молекул антител. Термины "антигенсвязывающий участок" антитела, "антигенсвязывающий фрагмент" антитела и тому подобное, используемые в настоящем документе, включают любой встречающийся в природе, получаемый ферментативным путем, синтетический или получаемый методами генной инженерии полипептид или гликопротеин, специфически связывающий антиген с образованием комплекса. Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут быть получены, например, из целых молекул антител при помощи любых подходящих стандартных методик, таких как протеолитическое расщепление или рекомбинантные методики генной инженерии, включающие манипуляцию с ДНК, кодирующей переменные и необязательно константные домены антител, и ее экспрессию. Такая ДНК известна и/или легкодоступна, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК (в том числе, например, библиотек "фаг-антитело") или может быть синтезирована. ДНК может быть секвенирована и с ней можно манипулировать химически или при помощи методик молекулярной биологии, например, для упорядочения одного или нескольких переменных и/или константных доменов в подходящую конфигурацию, или для введения кодов, создания цистеиновых остатков, модификации, присоединения или удаления аминокислот и т.д.

Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают: (i) Fab-фрагменты; (ii) $F(ab')_2$ -фрагменты; (iii) Fd-фрагменты; (iv) Fv-фрагменты; (v) одноцепочечные молекулы Fv (scFv); (vi) dAb-фрагменты и (vii) минимальные распознающие единицы, состоящие из аминокислотных остатков, имитирующих гипервариабельный участок антитела (например, выделенный участок, определяющий комплементарность (CDR), такой как пептид CDR3), или пептид с ограниченной конформационной сво-

бодой FR3-CDR3-FR4. Другие сконструированные молекулы, такие как домен-специфические антитела, однодоменные антитела, антитела с удаленным доменом, химерные антитела, CDR-привитые антитела, диатела, триатела, тетратела, минитела, нанотела (например, моновалентные антитела, бивалентные антитела и т.д.), иммунопрепараты на основе модульного белка с малым размером молекул (SMIP) и вариабельные домены IgNAR акулы, также включены в выражение "антигенсвязывающий фрагмент", используемое в настоящем документе.

Антигенсвязывающий фрагмент антитела, как правило, содержит по меньшей мере один вариабельный домен. Вариабельный домен может быть любого размера или аминокислотного состава и будет, как правило, содержать по меньшей мере одну CDR, которая прилегает или находится в рамке считывания с одной или несколькими каркасными последовательностями. В антигенсвязывающих фрагментах, имеющих домен V_H , связанный с доменом V_L , домены V_H и V_L могут располагаться относительно друг друга в любом подходящем порядке. Например, вариабельный участок может быть димерным и 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 .

В соответствии с определенными вариантами осуществления антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать по меньшей мере один вариабельный домен, ковалентно связанный с по меньшей мере одним константным доменом. Неограничивающие иллюстративные конфигурации вариабельных и константных доменов, которые можно найти в антигенсвязывающем фрагменте антитела по настоящему изобретению, включают: (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, в том числе иллюстративных конфигурациях, изложенных выше, вариабельные и константные домены могут быть либо непосредственно связаны друг с другом, либо могут быть связаны с помощью всего или части шарнира или линкерного участка. Шарнирная область может состоять из по меньшей мере 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или более) аминокислот, которые приводят к образованию гибкой или полугибкой связи между прилегающими вариабельными и/или константными доменами в одной молекуле полипептида. Кроме того, антигенсвязывающий фрагмент антитела по настоящему изобретению может содержать гомодимер или гетеродимер (или другой мультидимер) из любых конфигураций вариабельных и константных доменов, изложенных выше, в нековалентной ассоциации друг с другом и/или с одним или несколькими мономерными доменами V_H или V_L (например, при помощи дисульфидной (дисульфидных) связи (связей)).

Как и в случае с целыми молекулами антител, антигенсвязывающие фрагменты могут быть моноспецифическими или мультиспецифическими (например, биспецифическими). Мультиспецифический антигенсвязывающий фрагмент антитела будет обычно содержать по меньшей мере два различных вариабельных домена, где каждый вариабельный домен способен специфически связываться с отдельным антигеном или с другим эпитопом того же самого антигена. Любой формат мультиспецифических антител, в том числе форматы иллюстративных биспецифических антител, раскрываемых в настоящем документе, могут быть адаптированы для применения в контексте антигенсвязывающего фрагмента антитела по настоящему изобретению при помощи стандартных методик, доступных в данной области.

В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения антитела к LEPR по настоящему изобретению представляют собой человеческие антитела. Термин "человеческое антитело", используемое в настоящем документе, включает антитела, имеющие вариабельные и константные участки, происходящие из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. Человеческие антитела по настоящему изобретению могут включать в себя аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулинов зародышевой линии человека (например, мутации, вводимые в результате случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или соматической мутации *in vivo*), например в CDR и в частности CDR3. Однако термин "человеческое антитело", используемое в настоящем документе, не включает антитела, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии другого вида млекопитающего, такого как мышь, привиты на каркасные последовательности человека.

Антитела по настоящему изобретению могут в соответствии с определенными вариантами осуществления быть рекомбинантными человеческими антителами. Термин "рекомбинантное человеческое антитело", используемый в настоящем документе, включает все антитела, получаемые, экспрессируемые, создаваемые или выделяемые рекомбинантным способом, такие как антитела, экспрессируемые с помощью рекомбинантного вектора экспрессии, трансфицированного в клетку-хозяина (описанные далее), антитела, выделяемые из комбинаторной библиотеки рекомбинантных человеческих антител (описанные далее), антитела, выделяемые из животного (например, мыши), которое является трансгенным по генам человеческих иммуноглобулинов (см., например, Taylor et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295), или антитела, получаемые, экспрессируемые, создаваемые или выделяемые любым другим способом, включающим соединение последовательностей генов человеческих иммуноглобулинов с другими последовательностями ДНК. Такие рекомбинантные человеческие антитела имеют вариабельные и константные участки, полученные из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. Однако

в соответствии с определенными вариантами осуществления такие рекомбинантные человеческие антитела претерпевают мутагенез *in vitro* (или в случае использования животного, трансгенного по последовательностям человеческого Ig, соматический мутагенез *in vivo*) и, таким образом, аминокислотные последовательности V_H - и V_L -участков рекомбинантных антител представляют собой последовательности, которые, хотя происходят из последовательностей V_H и V_L зародышевой линии человека и связаны с последовательностями V_H и V_L зародышевой линии человека, могут не встречаться в природе в репертуаре антител зародышевой линии человека *in vivo*.

Настоящее изобретение охватывает антитела с одной или несколькими мутациями в шарнире, C_H2 - или C_H3 - участок может быть предпочтительным, например в условиях производства, для повышения выхода предпочтительной формы антитела.

Антитела по настоящему изобретению могут быть выделенными антителами. Термин "выделенное антитело", используемый в настоящем документе, означает антитело, которое было идентифицировано и отделено и/или извлечено из по меньшей мере одного компонента своего естественного окружения. Например, антитело, которое было отделено или удалено из по меньшей мере одного компонента организма, или из ткани или клетки, в которой антитело встречается естественным путем или образуется естественным путем, представляет собой "выделенное антитело" для целей настоящего изобретения. Выделенное антитело также включает антитело *in situ* в рекомбинантной клетке. Выделенные антитела представляют собой антитела, которые подвергаются по меньшей мере одному этапу очистки или выделения. В соответствии с определенными вариантами осуществления выделенное антитело может практически не содержать другого клеточного вещества и/или химических соединений.

Настоящее изобретение предусматривает варианты антител к LEPR, раскрываемых в настоящем документе, содержащих одну или несколько аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасных областях и/или областях CDR переменных доменов тяжелой и легкой цепи по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии, из которых антитела произошли. Такие мутации можно легко определить сравнением аминокислотных последовательностей, раскрываемых в настоящем документе, с последовательностями зародышевой линии, доступными, например, из публичных баз данных последовательностей антител. Настоящее изобретение предусматривает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые происходят из аминокислотных последовательностей, раскрываемых в настоящем документе, где одна или несколько аминокислот в одной или нескольких каркасных областях и/или областях CDR мутируют до соответствующего (соответствующих) остатка (остатков) последовательности зародышевой линии, из которой антитело произошло, или до соответствующего (соответствующих) остатка (остатков) последовательности другой зародышевой линии, или до консервативной аминокислотной замены соответствующего (соответствующих) остатка (остатков) зародышевой линии (такие изменения последовательностей называются в настоящем документе собирательно как "мутации зародышевой линии"). Специалист в данной области, начиная с последовательностей переменных участков тяжелой и легкой цепи, раскрытых в данном документе, может легко создать несколько антител и антигенсвязывающих фрагментов, которые содержат одну или несколько отдельных мутаций зародышевой линии или их комбинации. В соответствии с определенными вариантами осуществления все из каркасных остатков и/или остатков CDR в доменах V_H и/или V_L являются обратно мутировавшими до остатков, встречающихся в исходной последовательности зародышевой линии, из которой антитело произошло. В соответствии с другими вариантами осуществления лишь определенные остатки обратно мутируют до исходной последовательности зародышевой линии, например, лишь мутировавшие остатки, обнаруженные в первых 8 аминокислотах FR1 или в последних 8 аминокислотах FR4, или лишь мутировавшие остатки, обнаруженные в CDR1, CDR2 или CDR3. В соответствии с другими вариантами осуществления одна или несколько из каркасных областей и/или один или несколько из остатка (остатков) CDR мутируют до соответствующего (соответствующих) остатка (остатков) последовательности другой зародышевой линии (т.е. последовательности зародышевой линии, которая отличается от последовательности зародышевой линии, из которой антитело изначально произошло). Кроме того, антитела по настоящему изобретению могут содержать любую комбинацию из двух или более мутаций зародышевых линий в каркасных областях и/или областях CDR, например, где определенные отдельные остатки мутируют до соответствующего остатка последовательности определенной зародышевой линии, в то время как определенные другие остатки, которые отличаются от последовательности исходной зародышевой линии, сохраняются или мутируют до соответствующего остатка последовательности другой зародышевой линии. Сразу после получения антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или несколько мутаций зародышевых линий, могут быть легко исследованы на одно или несколько предпочтительных свойств, таких как улучшенная специфичность связывания, повышенная аффинность связывания, улучшенные или усиленные биологические антагонистические или агонистические свойства (в случае необходимости), сниженная иммуногенность и т.п. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, полученные этим общим способом, охвачены в настоящем изобретении.

Настоящее изобретение предусматривает антитела к LEPR и их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат аминокислотные последовательности, которые фактически аналогичны или фактически идентичны одной или нескольким аминокислотным последовательностям переменных доменов

или CDR, как встречается в любом из иллюстративных антител к LEPR, раскрываемых в настоящем документе.

Применительно к полипептидам термин "фактическая аналогия" или "фактически аналогичный" означает, что две пептидные последовательности, в случае оптимального выравнивания, например, с помощью компьютерных программ GAP или BESTFIT с применением штрафов за открытие гэпа по умолчанию, на по меньшей мере 95% идентичны по последовательности, даже более предпочтительно на по меньшей мере 98 или 99% идентичны по последовательности. Предпочтительно положения остатков, которые не являются идентичными, отличаются консервативными аминокислотными заменами. "Консервативная аминокислотная замена" представляет собой замену, при которой аминокислотный остаток заменяют другим аминокислотным остатком, имеющим боковую цепь (R-группу) с аналогичными химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). Как правило, консервативная аминокислотная замена значительно не изменит функциональные свойства белка. В случаях, где две или более аминокислотные последовательности отличаются друг от друга консервативными заменами, процент идентичности последовательности или степень сходства можно регулировать в сторону повышения в целях коррекции консервативной природы замены. Средства для выполнения такой поправки хорошо известны специалистам в данной области. См., например, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331. Примеры групп аминокислот, которые имеют боковые цепи с аналогичными химическими свойствами, включают (1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; (2) алифатические 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) кислые боковые цепи: аспартат и глутамат, и (7) серосодержащие боковые цепи представляют собой цистеин и метионин. Предпочтительными группами консервативных аминокислотных замен являются валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамин-аспартат и аспарагин-глутамин. Альтернативно консервативная замена представляет собой любое изменение, имеющее положительное значение в логарифмической матрице правдоподобия PAM250, раскрытой в Gonnet et al. (1992) *Science* 256: 1443-1445. "Умеренно консервативная" замена представляет собой любое изменение, имеющее неотрицательное значение в логарифмической матрице правдоподобия PAM250.

Сходство последовательностей в случае полипептидов, которое также называется идентичностью последовательностей, обычно измеряется с помощью компьютерной программы для анализа последовательностей. Компьютерная программа для анализа белков совмещает аналогичные последовательности с помощью показателей сходства, присваиваемых различным заменам, делециям и другим модификациям, в том числе консервативным аминокислотным заменам. Например, программное средство GCG содержит программы, такие как Gap и Bestfit, которые можно использовать с параметрами по умолчанию в целях определения гомологии последовательностей или идентичности последовательностей между тесно связанными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды от различных видов организмов, или между белком дикого типа и его мутантом. См., например, версию 6.1 GCG. Полипептидные последовательности также можно сравнивать с помощью FASTA с применением параметров по умолчанию или рекомендованных параметров, программного средства в версии 6.1 GCG. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) предусматривает выравнивания и процент идентичности участков наилучшего перекрытия между запрашиваемой и найденной последовательностями (Pearson (2000), выше). Другим предпочтительным алгоритмом при сравнении последовательности по настоящему изобретению с базой данных, содержащей большое число последовательностей от различных организмов, является компьютерная программа BLAST, особенно BLASTP или TBLASTN, с применением 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.

Антитела к LEPR, содержащие варианты Fc

В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения предусмотрены антитела к LEPR, содержащие Fc-домен, содержащий одну или несколько мутаций, которые усиливают или уменьшают связывание антител с FcRn-рецептором, например, при кислом значении pH по сравнению с нейтральным значением pH. Например, настоящее изобретение предусматривает антитела к LEPR, содержащие мутацию в C_H2- или C_H3-участке Fc-домена, где мутация(мутации) повышает(повышают) аффинность Fc-домена к FcRn в кислой среде (например, в эндосоме, где значение pH варьирует от приблизительно 5,5 до приблизительно 6,0). Такие мутации могут приводить к повышению времени полужизни в сыворотке крови при введении животному. Неограничивающие примеры таких модификаций Fc включают, например, модификацию 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 модификацию в положении 428 и/или 433 (например, H/L/R/S/P/Q или K) и/или 434 (например, H/F или Y); или модификацию в положении 250 и/или 428; или модификацию в положении 307 или 308 (например, 308F, V308F) и 434. В соответствии с одним вариантом осуществления модификация представляет собой модификацию 428L (например, M428L) и 434S (например, N434S); модификацию 428L, 259I (например, V259I) и 308F (например, V308F); модификацию 433K (например, H433K) и 434

(например, 434Y); модификацию 252, 254 и 256 (например, 252Y, 254T и 256E); модификацию 250Q и 428L (например, T250Q и M428L); и модификацию 307 и/или 308 (например, 308F или 308P).

Например, настоящее изобретение предусматривает 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 вышеизложенных мутаций Fc-домена и других мутаций в вариабельных доменах антитела, раскрываемых в настоящем документе, предусмотрены в объеме настоящего изобретения.

Антитела к LEPR по настоящему изобретению могут содержать модифицированный Fc-домен, имеющий ослабленную эффекторную функцию. Используемый в настоящем документе термин "модифицированный Fc-домен, имеющий ослабленную эффекторную функцию" означает любой Fc-участок иммуноглобулина, который был модифицирован, мутирован, усечен и др., по отношению к встречающемуся в природе Fc-домену дикого типа таким образом, что молекула, содержащая модифицированный Fc, характеризуется ослаблением тяжести или снижением по меньшей мере одного эффекта, выбранного из группы, состоящей из уничтожения клеток (например, ADCC и/или CDC), активации комплемента, фагоцитоза и опсонизации, по отношению к молекуле сравнения, содержащей встречающийся в природе вариант Fc-участка дикого типа. В соответствии с определенными вариантами осуществления "модифицированный Fc-домен, имеющий ослабленную эффекторную функцию" представляет собой Fc-домен с ослабленным или уменьшенным связыванием с Fc-рецептором (например, FcγR).

В соответствии с определенными вариантами 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, где по меньшей мере одна аминокислота шарнирной области Fc IgG1 замещена соответствующей аминокислотой из шарнирной области Fc IgG2. Альтернативно модифицированный Fc для применения в контексте настоящего изобретения может содержать вариантный Fc IgG4, где по меньшей мере одна аминокислота шарнирной области Fc IgG4 замещена соответствующей аминокислотой из шарнирной области Fc IgG2. Неограничивающие иллюстративные модифицированные Fc-участки, которые могут быть использованы в контексте настоящего изобретения, изложены, например, в публикации заявки на патент США № 2014/0243504.

Другие модифицированные Fc-домены и модификации Fc, которые можно использовать в контексте настоящего изобретения, включают любые из модификаций, изложенных в US 2014/0171623; US 8697396; US 2014/0134162; WO 2014/043361. Способы конструирования антител или других антигенсвязывающих слитых белков, содержащих модифицированный Fc-домен, описанный в настоящем документе, известны в данной области.

Биологические характеристики антител

Настоящее изобретение предусматривает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают LEPR человека и активируют передачу сигнала посредством LEPR. Такие антитела могут называться "агонистические антитела". В контексте настоящего изобретения "активация передачи сигнала посредством LEPR" означает стимуляцию внутриклеточного эффекта, который обычно происходит в результате взаимодействия лептина с LEPR в клетках, которые экспрессируют LEPR. В соответствии с определенными вариантами осуществления "активация передачи сигнала посредством LEPR" означает транскрипционную активность STAT3, которую можно выявить с помощью любого способа, с помощью которого можно измерять или идентифицировать, прямо или косвенно, активность STAT3, например, с помощью меченого варианта STAT3, экспрессируемого в репортерной клеточной линии. Например, настоящее изобретение предусматривает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые активируют передачу сигнала посредством LEPR в клеточном репортерном анализе, например, при применении формата клеточного анализа, определенного в примере 7 настоящего документа, или фактически аналогичного анализа. Клеточные репортерные анализы, с помощью которых выявляют активацию LEPR, такие как анализ, изложенный в примере 7 настоящего документа, могут приводить к образованию подлежащего выявлению сигнала, который может быть экспрессирован в контексте значения EC₅₀ (например, концентрации антитела, необходимой для получения полумаксимальной передачи сигнала) и/или процента максимальной передачи сигнала, наблюдаемой в присутствии лептина. В соответствии с определенными иллюстративными вариантами осуществления настоящего изобретения предусмотрены антитела к LEPR, которые активируют передачу сигнала посредством LEPR при значении EC₅₀, составляющем менее приблизительно 12,0 нМ в клеточном репортерном анализе, например, при применении формата анализа, определенного в примере 7 настоящего документа, или фактически аналогичного анализа. В соответствии с определенными иллюстративными вариантами осуществления настоящего изобретения предусмотрены антитела к LEPR, которые активируют передачу сигнала посредством LEPR при максимальном проценте активации по отношению к передаче сигнала посредством лептина, составляющем более чем приблизительно 65% в клеточном репортерном анализе, например, при применении формата анализа, определенного в примере 7 настоящего документа, или фактически аналогичного анализа.

Настоящее изобретение предусматривает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые

связывают мономерный LEPR человека с высокой аффинностью. Например, настоящее изобретение предусматривает антитела к LEPR, которые связывают мономерный LEPR человека (например, hLEPR.mmh, SEQ ID NO:114) с K_D , составляющей менее чем приблизительно 150 нМ, как измеряется с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 25 или 37°C, например, при применении формата анализа, определенного в примере 3 настоящего документа, или фактически аналогичного анализа. В соответствии с определенными вариантами осуществления предусмотрены антитела к LEPR, которые связывают мономерный LEPR человека при 25°C с K_D , составляющей менее чем приблизительно 150 нМ, менее чем приблизительно 140 нМ, менее чем приблизительно 130 нМ, менее чем приблизительно 120 нМ, менее чем приблизительно 110 нМ, менее чем приблизительно 100 нМ, менее чем приблизительно 90 нМ, менее чем приблизительно 80 нМ, менее чем приблизительно 70 нМ, менее чем приблизительно 60 нМ, менее чем приблизительно 50 нМ, менее чем приблизительно 40 нМ, менее чем приблизительно 30 нМ, менее чем приблизительно 20 нМ, менее чем приблизительно 10 нМ, менее чем приблизительно 9 нМ, менее чем приблизительно 8 нМ, менее чем приблизительно 7 нМ, менее чем приблизительно 6 нМ, менее чем приблизительно 5 нМ, менее чем приблизительно 4 нМ, менее чем приблизительно 3 нМ, менее чем приблизительно 2 нМ, менее чем приблизительно 1 нМ, менее чем приблизительно 900 пМ, менее чем приблизительно 800 пМ, менее чем приблизительно 700 пМ, менее чем приблизительно 600 пМ, менее чем приблизительно 500 пМ, менее чем приблизительно 400 пМ или менее чем приблизительно 300 пМ, как измеряется с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, при применении формата анализа, определенного в примере 3 настоящего документа, или фактически аналогичного анализа.

Настоящее изобретение также предусматривает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают мономерный LEPR человека (например, hLEPR.mmh, SEQ ID NO:114) с полупериодом диссоциации ($t^{1/2}$), составляющим более чем приблизительно 50 мин, как измеряется с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 25 или 37°C, например, при применении формата анализа, определенного в примере 3 настоящего документа, или фактически аналогичного анализа. В соответствии с определенными вариантами осуществления предусмотрены антитела к LEPR, которые связывают мономерный LEPR человека при 25°C с $t^{1/2}$, составляющим более чем приблизительно 50 мин, более чем приблизительно 55 мин, более чем приблизительно 60 мин, более чем приблизительно 65 мин или дольше, как измеряется с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, при применении формата анализа, определенного в примере 3 настоящего документа, или фактически аналогичного анализа.

Настоящее изобретение также предусматривает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают димерный LEPR человека (например, hLEPR.mFc, SEQ ID NO:115) с высокой аффинностью. Например, настоящее изобретение предусматривает антитела к LEPR, которые связывают димерный LEPR человека с K_D , составляющей менее чем приблизительно 1,5 нМ, как измеряется с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 25 или 37°C, например, при применении формата анализа, определенного в примере 3 настоящего документа, или фактически аналогичного анализа. В соответствии с определенными вариантами осуществления предусмотрены антитела к LEPR, которые связывают димерный LEPR человека при 25°C с K_D , составляющей менее чем приблизительно 150 нМ, менее чем приблизительно 130 нМ, менее чем приблизительно 110 нМ, менее чем приблизительно 80 нМ, менее чем приблизительно 70 нМ, менее чем приблизительно 60 нМ, менее чем приблизительно 50 нМ, менее чем приблизительно 40 нМ, менее чем приблизительно 30 нМ, менее чем приблизительно 20 нМ или менее чем приблизительно 10 нМ, как измеряется с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, при применении формата анализа, определенного в примере 3 настоящего документа, или фактически аналогичного анализа.

Настоящее изобретение также предусматривает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают димерный LEPR человека (например, hLEPR.mFc, SEQ ID NO:115) с полупериодом диссоциации (VA), составляющим более чем приблизительно 10 мин, как измеряется с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 25 или 37°C, например, при применении формата анализа, определенного в примере 3 настоящего документа, или фактически аналогичного анализа. В соответствии с определенными вариантами осуществления предусмотрены антитела к LEPR, которые связывают димерный LEPR человека при 25°C с $t^{1/2}$, составляющим более чем приблизительно 10 мин, более чем приблизительно 15 мин, более чем приблизительно 20 мин, более чем приблизительно 25 мин, более чем приблизительно 30 мин, более чем приблизительно 40 мин, более чем приблизительно 50 мин, более чем приблизительно 60 мин, более чем приблизительно 70 мин или дольше, как измеряется с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, при применении формата анализа, определенного в примере 3 настоящего документа, или фактически аналогичного анализа.

Настоящее изобретение также предусматривает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают LEPR в комплексе с лептином человека ("LEPR в комплексе с лептином человека") может также быть представлен в виде выражения "лептин:LEPR"). Например, настоящее изобретение предусматривает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые способны связываться с предварительно образованным комплексом, содержащим hLEPR и лептин человека. То есть в соответствии с определенными вариантами осуществления взаимодействие между антителами к LEPR и LEPR не по-

давляется присутствием лептина в комплексе с LEPR; аналогично взаимодействие между лептином и LEPR в соответствии с этим аспектом настоящего изобретения не подавляется присутствием антитела к LEPR. Иллюстративный формат анализа для определения того, связывается ли антитело или его антигенсвязывающий фрагмент с LEPR в комплексе с лептином человека, изложен в примере 4 настоящего документа.

Аналогично настоящее изобретение также предусматривает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают LEPR и не блокируют взаимодействие LEPR:лептин. Например, настоящее изобретение предусматривает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые способны связывать LEPR, тем самым приводя к образованию комплекса антитело:LEPR, где образующийся комплекс антитело:LEPR способен взаимодействовать с лептином с образованием трехчленного комплекса, содержащего антитело, LEPR и лептин. Иллюстративный формат анализа для определения того, способно ли антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывать LEPR так, что не блокирует или не мешает взаимодействию между LEPR и лептином, изложен в примере 5 настоящего документа.

Настоящее изобретение также предусматривает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают экспрессируемые на клеточной поверхности LEPR в присутствии и/или отсутствии лептина человека. Экспрессируемый на клеточной поверхности LEPR означает LEPR или его участок (например, внеклеточный участок LEPR), экспрессируемый на поверхности клетки, либо естественным путем либо в сконструированной клеточной линии, таким образом, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способен связываться в молекулой LEPR. В соответствии с определенными вариантами осуществления экспрессируемый на клеточной поверхности LEPR включает рекомбинантные комплексы, содержащие внеклеточный домен LEPR, соединенный с клеткой посредством метки или якоря (например, GPI-якоря, как представлено в примере 6 настоящего документа). В соответствии с этим аспектом настоящего изобретения предусмотрены антитела, которые способны связывать экспрессируемый на клеточной поверхности LEPR в отсутствии лептина, и которые также способны связывать экспрессируемый на клеточной поверхности LEPR в присутствии лептина (т.е. в условиях, когда лептин способен связываться с экспрессируемым на клеточной поверхности лептиновым рецептором). То есть в соответствии с определенными вариантами 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 в соответствии с этим аспектом 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 связывать экспрессируемый на клеточной поверхности LEPR в присутствии или отсутствии лептина человека, изложен в примере 6 настоящего документа.

Антитела по настоящему изобретению могут характеризоваться одной или несколькими из вышеупомянутых биологических характеристик или любой их комбинацией. Вышеизложенный перечень биологических характеристик антител по настоящему изобретению не претендует на исчерпывающий характер. Другие биологические характеристики антител по настоящему изобретению будут очевидны специалисту в данной области из обзора настоящего раскрытия, в том числе демонстрационных примеров настоящего документа.

Картирование эпитопа и соответствующие технологии

Настоящее изобретение также предусматривает антитела к LEPR, содержащие варианты любых из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, раскрываемых в настоящем документе, с одной или несколькими консервативными заменами. Например, настоящее изобретение предусматривает антитела к LEPR с аминокислотными последовательностями HCVR, LCVR и/или CDR, например, с 10 или менее, 8 или менее, 6 или менее, 4 или менее и т.п. консервативными аминокислотными заменами по отношению к любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, изложенных в табл. 1 настоящего документа. В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящее изобретение предусматривает антитела к LEPR, содержащие варианты аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR по отношению к последовательностям, изложенным в табл. 1 настоящего документа (например, содержащие консервативные аминокислотные замены), где такие варианты антитела, тем не менее, характеризуются одной или несколькими функциями и/или свойствами иллюстративных антител к LEPR, раскрываемых в настоящем документе.

Внеклеточный домен LEPR человека содержит N-концевой домен гомологии цитокинового рецептора (CRH-1), иммуноглобулин-подобный домен (Ig) и второй домен CRH (CRH-2), который называется лептин-связывающий домен (LBD) (Carpenter et al. (2012) Structure 20:487-97). Кроме того, LEPR характеризуется наибольшей гомологией и аналогичным размером и организацией внеклеточных доменов с гранулоцитарным колониестимулирующим фактором (GCSF) и гликопротеином 130 (gp130) (Haniu et al. (1998) J Biol Chem 273(44): 28691-699).

Термин "эпитоп" относится к антигенной детерминанте, которая взаимодействует со специфическим антигенсвязывающим участком в переменном участке молекулы антитела, известным как паратоп. Один антиген может иметь более одного эпитопа. Таким образом, различные антитела могут связы-

вать различные области на антигене и могут иметь различные биологические эффекты. Эпитоп может быть либо конформационным либо линейным. Конформационный эпитоп образуется с помощью пространственно размещенных аминокислот из различных сегментов линейной полипептидной цепи. Линейный эпитоп представляет собой эпитоп, образуемый прилегающими аминокислотными остатками в полипептидной цепи. При определенных условиях эпитоп может включать фрагменты сахаридов, фосфорильных групп или сульфонильных групп антигена.

Настоящее изобретение предусматривает антитела к LEPR, которые взаимодействуют с одним или несколькими эпитопами, встречающимися в аминокислотах M1-D839 LEPR человека (SEQ ID NO: 113). Как изложено в примере 11, 201 пептид из LEPR человека значительно снижал захват дейтерия при связывании с антителом H4H16650P2. Пептиды, соответствующие аминокислотам 162-169 (аминокислоты LYVLPEVL LEPR человека, SEQ ID NO: 113) и 170-191 (аминокислоты EDSPLVPQKGSF LEPR человека, SEQ ID NO: 113) характеризовались более медленными скоростями захвата дейтерия при связывании с H4H16650P2, указывая на то, что это антитело связывает по меньшей мере два эпитопа LEPR человека, имеющих последовательности LYVLPEVL или EDSPLVPQKGSF (аминокислоты 162-169 или 170-191 соответственно SEQ ID NO: 113).

Эпитоп, с которым антитела по настоящему изобретению связываются, могут состоять из одной смежной последовательности из 3 или более (например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более) аминокислот белка LEPR. Альтернативно эпитоп может состоять из множества несмежных аминокислот (или аминокислотных последовательностей) LEPR. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления эпитоп расположен на или возле лептин-связывающего домена LEPR. В соответствии с другими вариантами осуществления эпитоп расположен в участке, отдаленном от лептин-связывающего домена LEPR, например, в месте на поверхности LEPR, в котором антитело при связывании с таким эпитопом не нарушает связывания лептина с LEPR.

Различные методики, известные специалистам в данной области, можно использовать для идентификации аминокислот в эпитопе, распознаваемом определенным антителом. Иллюстративные методики включают, например, мутационный анализ на основе сканирования аланином, пептидный блот-анализ и анализ пептидного расщепления. Кроме того, можно использовать способы, такие как вырезание эпитопа, экстракция эпитопа и химическая модификация антигенов (Tomer, 2000, Protein Science 9:487-496). Другой способ, который можно использовать для идентификации аминокислот в полипептиде, с которым антитело взаимодействует, является водородно-дейтериевый обмен, выявляемый с помощью масс-спектрометрии. В общем виде способ на основе водородно-дейтериевого обмена предусматривает мечение дейтерием белка, представляющего интерес, с последующим связыванием антитела с меченым дейтерием белком. Затем комплекс белок-антитело переносят в воду в целях содействия водородно-дейтериевому обмену во всех остатках, кроме остатков, защищенных антителом (которые остаются мечеными дейтерием). После диссоциации антитела целевой белок подвергают расщеплению протеазами и масс-спектрометрическому анализу, тем самым выявляя меченые дейтерием остатки, которые соответствуют конкретным аминокислотам, с которыми антитело взаимодействует. См., например, Ehring (1999) Analytical Biochemistry 267(2):252-259; Engen and Smith (2001) Anal. Chem. 73:256A-265A. Рентгенокристаллографический анализ антитела в комплексе со своим антигеном также можно использовать для идентификации аминокислот в полипептиде, с которым антитело взаимодействует.

Настоящее изобретение дополнительно предусматривает антитела к LEPR, которые связываются с тем же самым эпитопом, что и любое из конкретных иллюстративных антител, описанных в настоящем документе (например, антитела, содержащие любые из аминокислотных последовательностей, изложенных в табл. 1 настоящего документа). Аналогично настоящее изобретение также предусматривает антитела к LEPR, которые конкурируют за связывание с LEPR любого из конкретных иллюстративных антител, описанных в настоящем документе (например, антитела, содержащие любые из аминокислотных последовательностей, изложенных в табл. 1 настоящего документа).

Можно определить, связывается ли антитело с одним и тем же эпитопом, что и эталонное антитело к LEPR, или конкурирует за связывание с ним, с помощью стандартных способов, известных в данной области и приведенных в качестве примера в настоящем документе. Например, для определения того, связывается ли исследуемое антитело с тем же самым эпитопом, что и эталонное антитело к LEPR по настоящему изобретению, эталонное антитело связывают с белком LEPR. Затем 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 по сравнению с эталонным антителом 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 самым эпитопом, что и эпитоп, связываемый эталонным антителом к LEPR по настоящему изобретению. Дополнительные стандартные экспериментальные работы (например, анализ пептидных мутаций и связывания) можно выполнять для подтверждения того, происходит ли наблюдаемое отсутствие связывания исследуемого антитела по сути благодаря связыванию с тем же самым эпитопом, что и эталонное антитело, или пространственное блокирование (или другое явление) является причиной отсутствия на-

блюдаемого связывания. Эксперименты этого рода можно выполнять с помощью ELISA, RIA, Bıasoge, проточной цитометрии или другого количественного или качественного анализа связывания антител, доступных в данной области. В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения два антитела связываются с тем же самым (или перекрывающимся) эпитопом, если, например, 1-, 5-, 10-, 20- или 100-кратное превышение одного антитела ингибирует связывание другого на по меньшей мере 50%, но предпочтительно 75, 90 или даже 99%, как измеряется в анализе конкурентного связывания (см., например, Junghans et al., Cancer Res. 1990:50:1495-1502). Альтернативно два антитела связываются с одним и тем же эпитопом, если практически все аминокислотные мутации в антигене, которые ослабляют или устраняют связывание одного антитела, снижают или устраняют связывание другого. Два антитела имеют "перекрывающиеся эпитопы", если только подсовокупность аминокислотных мутаций, которые ослабляют или устраняют связывание одного антитела, ослабляют или устраняют связывание другого.

Для определения того, конкурирует ли антитело за связывание (или конкурирует ли перекрестно за связывание) с эталонным антителом к LEPR, выполняют вышеописанную методику связывания в двух ориентациях. В первой ориентации эталонное антитело связывают с белком LEPR в насыщающих условиях с последующей оценкой связывания исследуемого антитела с молекулой LEPR. Во второй ориентации исследуемое антитело связывают с молекулой LEPR в насыщающих условиях с последующей оценкой связывания эталонного антитела с молекулой LEPR. Если в обеих ориентациях лишь первое (связывающее) антитело способно связываться с молекулой LEPR, то делают вывод, что исследуемое антитело и эталонное антитело конкурируют за связывание с LEPR. Как будет понятно специалисту в данной области, антитело, которое конкурирует за связывание с эталонным антителом, может необязательно связываться с одним и тем же эпитопом, что и эталонное антитело, однако может пространственно блокировать эталонное антитело в результате связывания перекрывающегося или прилегающего эпитопа.

Получение человеческих антител

Антитела к LEPR по настоящему изобретению могут быть полностью человеческими антителами. Способы получения моноклональных антител, в том числе полностью человеческих моноклональных антител, известны в данной области. Любые такие известные способы можно использовать в контексте настоящего изобретения для создания человеческих антител, которые специфически связываются с LEPR.

Например, с помощью технологии VELOCIMMUNE™ или любого другого аналогичного известного способа получения полностью человеческих моноклональных антител химерные антитела к LEPR с высокой аффинностью изначально выделяют из человеческого варибельного участка и мышиного константного участка. Как и в экспериментальном разделе далее, антитела характеризуют и выбирают в отношении желательных характеристик, в том числе аффинности, блокирующей активности по отношению к лигандам, избирательности, эпитопа и др. При необходимости мышиные константные участки замещают желательным человеческим константным участком, например, IgG1 или IgG4 дикого типа или модифицированными IgG1 или IgG4, с получением полностью человеческого антитела к LEPR. В то время как выбранный константный участок может меняться в зависимости от конкретного применения, в варибельном участке сохраняются характеристики связывания с антигеном с высокой аффинностью или специфичности мишеней. В определенных примерах полностью человеческие антитела к LEPR выделяют непосредственно из антиген-позитивных В-клеток.

Биоэквиваленты

Антитела к LEPR и фрагменты антител по настоящему изобретению охватывают белки, имеющие аминокислотные последовательности, которые отличаются от таковых описанных антител, однако которые сохраняют способность связывать LEPR человека. Такие вариантные антитела и фрагменты антител содержат одно или несколько присоединений, делеций или замещений аминокислот по сравнению с родительской последовательностью, однако характеризуются биологической активностью, которая фактически эквивалентна таковой желаемых антител. Аналогично последовательности ДНК по настоящему изобретению, кодирующие антитело к LEPR, охватывают последовательности, которые содержат одно или несколько присоединений, делеций или замещений аминокислот по сравнению с раскрываемой последовательностью, однако которые кодируют антитело к LEPR или фрагмент антитела, который фактически эквивалентен антителу к LEPR или фрагменту антитела по настоящему изобретению. Примеры таких вариантных аминокислот и последовательностей ДНК раскрыты выше.

Два антигенсвязывающих белка или антитела считаются биоэквивалентными, если, например, они являются фармацевтическими эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, скорость и степень всасывания которых не отличается значимой разницей при введении в той же самой молярной дозе в аналогичных экспериментальных условиях, либо в виде однократной дозы либо многократной дозы. Некоторые антитела будут считаться эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, если они являются эквивалентными по степени всасывания, но не по скорости всасывания, и, кроме того, могут считаться биоэквивалентными, поскольку такие различия в скорости всасывания являются целенаправленными и отражаются в маркировке, не являются необходимыми для достижения эффективных концентраций лекарственных средств в организме, например, при хроническом применении, и считаются не-

значимыми в медицинском отношении для определенного изучаемого лекарственного продукта.

В соответствии с одним вариантом осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если отсутствуют клинически значимые различия в их безопасности, чистоте и активности.

В соответствии с одним вариантом осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если лечение пациента можно переключать один или несколько раз между эталонным продуктом и биологическим продуктом без предполагаемого повышения риска нежелательных эффектов, в том числе клинически значимого изменения иммуногенности или сниженной эффективности, по сравнению с непрерывной терапией без такого переключения.

В соответствии с одним вариантом осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если они оба действуют в соответствии с общим механизмом или механизмами действия для условия или условий применения до той степени, когда такие механизмы известны.

Биоэквивалентность можно продемонстрировать с помощью способов *in vivo* и *in vitro*. Показатели биоэквивалентности включают, например, (a) исследование *in vivo* у человека или других млекопитающих, в котором концентрация антитела или его метаболитов измеряется в крови, плазме, сыворотке или другой биологической жидкости как функция от времени; (b) исследование *in vitro*, которое коррелировало с данными по биоэквивалентности у человека *in vivo* и является надежным прогнозом таковых; (c) исследование *in vivo* у человека или других млекопитающих, в котором подходящий острый фармакологический эффект антитела (или его мишени) измеряется как функция от времени; и (d) строго контролируемое клиническое исследование, в котором устанавливают безопасность, эффективность и биодоступность или биоэквивалентность антитела.

Биоэквивалентные варианты антител к LEPR по настоящему изобретению могут быть сконструированы, например, в результате выполнения 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 в целях предупреждения образования необязательных или ошибочных внутримолекулярных дисульфидных мостиков при ренатурации. В других контекстах биоэквивалентные антитела могут включать варианты антител к LEPR, содержащие аминокислотные изменения, которые модифицируют характеристики гликозилирования антител, например, мутации, которые устраняют или удаляют гликозирование.

Видовая избирательность и видовая перекрестная реактивность Настоящее изобретение в соответствии с определенными вариантами осуществления предусматривает антитела к LEPR, которые связываются с LEPR человека, но не с LEPR от других видов. Настоящее изобретение также предусматривает антитела к LEPR, которые связываются с LEPR человека и с LEPR от одного или нескольких отличных от человека видов. Например, антитела к LEPR по настоящему изобретению могут связываться с LEPR человека и могут связываться или не связываться, в зависимости от ситуации, с одним или несколькими из LEPR мыши, крысы, морской свинки, хомяка, песчанки, свиньи, кошки, собаки, кролика, козы, овцы, коровы, лошади, верблюда, макака-крабоеда, игрунки, макака резус или шимпанзе. В соответствии с определенными иллюстративными вариантами осуществления настоящего изобретения предусмотрены антитела к LEPR, которые специфически связывают LEPR человека и LEPR макака-крабоеда (например, *Macaca fascicularis*). Другие антитела к LEPR по настоящему изобретению связывают LEPR человека, но не связываются или только незначительно связываются с LEPR макака-крабоеда.

Мультиспецифические антитела

Антитела по настоящему изобретению могут быть моноспецифическими или мультиспецифическими (например, биспецифическими). Мультиспецифические антитела могут быть специфическими по отношению к разным эпитопам одного целевого полипептида или могут содержать антигенспецифические домены, специфические по отношению к более чем одному целевому полипептиду. См., например, Tutt et al., 1991, J. Immunol. 147:60-69; Kufer et al., 2004, Trends Biotechnol. 22:238-244. Антитела к LEPR по настоящему изобретению могут быть связаны с или коэкспрессироваться вместе с другой функциональной молекулой, например, другим пептидом или белком. Например, антитело или его фрагмент могут быть функционально связаны (например, с помощью химической связи, генетического слияния, нековалентной ассоциации или иного) с одним или несколькими другими молекулярными объектами, такими как другое антитело или фрагмент антитела, с образованием биспецифического или мультиспецифического антитела со второй связывающей специфичностью.

Настоящее изобретение предусматривает биспецифические антитела, где одно плечо иммуноглобулина связывает LEPR человека, а другое плечо иммуноглобулина является специфическим по отношению к второму антигену. LEPR-связывающее плечо может содержать любую из аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR или CDR, изложенных в табл. 1 настоящего документа.

Иллюстративный формат биспецифического антитела, которое можно использовать в контексте настоящего изобретения предусматривает применение первого C_H3-домена иммуноглобулина (Ig) и второго C_H3-домена Ig, где первый и второй C_H3-домены Ig отличаются друг от друга по меньшей мере одной аминокислотой, и где по меньшей мере отличие в одном аминокислотном остатке ослабляет связывание биспецифического антитела с белком А по сравнению с биспецифическим антителом, не имеющим от-

личия в аминокислотном остатке. В соответствии с одним вариантом осуществления первый C_{H3}-домен Ig связывает белок А и второй C_{H3}-домен Ig содержит мутацию, которая ослабляет или устраняет связывание белка А, такую как модификация H95R (в соответствии с нумерацией экзонов IMGT; H435R - в соответствии с нумерацией EU). Второй C_{H3} может дополнительно содержать модификацию Y96F (в соответствии с IMGT; Y436F - в соответствии с EU). Дополнительные модификации, которые можно обнаружить во втором C_{H3}, включают D16E, L18M, N44S, K52N, V57M и V82I (в соответствии с IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M и V422I - в соответствии с EU) в случае антител IgG1; N44S, K52N и V82I (IMGT; N384S, K392N и V422I - в соответствии с EU) в случае антител IgG2; и Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q и V82I (в соответствии с IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q и V422I - в соответствии с EU) в случае антител IgG4. Вариации формата биспецифических антител, описанных выше, предусмотрены объемом настоящего изобретения.

Другие иллюстративные биспецифические форматы, которые можно применять в контексте настоящего изобретения, включают без ограничения, например, биспецифические форматы на основе scFv или биспецифические форматы на основе диател, слияния IgG-scFv, двойной вариабельный домен (DVD)-Ig, квадруму, выступы-во-впадины, обычную легкую цепь (например, обычную легкую цепь с выступами-во-впадины и т.п.), CrossMab, CrossFab, (SEED)-тело, лейциновую застежку, Duobody, IgG1/IgG2, Fab (DAF)-IgG двойного действия и Mab² биспецифические форматы (см., например, Klein et al. 2012, mAbs 4:6, 1-11, и источники, упоминаемые в настоящем документе, для изучения вышеизложенных форматов). Биспецифические антитела также можно сконструировать с помощью конъюгации пептидов и нуклеиновых кислот, например, где не встречающиеся в природе аминокислоты с ортогональной химической реакционной способностью применяют для получения сайт-специфических конъюгатов антитело-нуклеотид, которые затем самособираются в мультимерные комплексы с определенным составом, валентностью и геометрией (См., например, Kazane et al., J. Am. Chem. Soc. [Epub: Dec. 4, 2012]).

Терапевтический состав и введение

Настоящее изобретение предусматривает фармацевтические композиции, содержащие антитела к LEPR или их антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению составляют с подходящими носителями, вспомогательными средствами и другими средствами, которые обеспечивают улучшенный перенос, доставку, переносимость и тому подобное. Множество подходящих составов можно обнаружить в справочнике, известном всем химикам-фармацевтам: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Эти составы включают, например, порошки, пасты, мази, желе, воска, масла, липиды, липидсодержащие (катионные или анионные) пузырьки (такие как LIPOFECTIN™, Life Technologies, Карлсбад, Калифорния), конъюгаты ДНК, безводные абсорбционные пасты, эмульсии типа "масло в воде" и "вода в масле", эмульсии карбовакс (полиэтиленгликоли с различными молекулярными массами), полужидкие гели и полужидкие смеси, содержащие карбовакс. См. также Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311.

Доза антитела, вводимого пациенту, может варьировать в зависимости от возраста и размерных характеристик пациента, целевого заболевания, состояний, пути введения и тому подобного. Предпочтительную дозу обычно рассчитывают в соответствии с весом тела или площадью поверхности тела. В случае взрослого пациента может быть предпочтительным внутривенное введение антитела по настоящему изобретению, обычно в однократной дозе, составляющей от приблизительно 0,01 до приблизительно 20 мг/кг массы тела, более предпочтительно от приблизительно 0,02 до 7, от приблизительно 0,03 до приблизительно 5 или от приблизительно 0,05 до приблизительно 3 мг/кг массы тела. В зависимости от тяжести состояния частоту и продолжительность лечения можно корректировать. Эффективные дозы и схемы введения антител к LEPR могут быть определены эмпирически; например, динамику состояния пациента можно наблюдать с помощью периодической оценки и, соответственно, можно корректировать дозу. Кроме того, межвидовое приведение доз можно выполнять с помощью хорошо известных в данной области способов (например, Mordenti et al., 1991, Pharmaceut. Res. 8:1351).

Известны различные системы доставки и их можно применять для введения фармацевтической композиции по настоящему изобретению, например, инкапсулирование в липосомы, микрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать мутантные вирусы, опосредованный рецепторами эндоцитоз (см., например, Wu et al., 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432). Способы введения предусматривают без ограничения внутрикожные, внутримышечные, интраперитонеальные, внутривенные, подкожные, интраназальные, эпидуральные и пероральные пути. Композицию можно вводить любым удобным способом, например, с помощью инфузии или болюсной инъекции, всасывания через эпителиальные или кожно-слизистые покровы (например, слизистую ротовой полости, слизистую прямой кишки и кишечника и др.) и можно вводить совместно с другими биологически активными средствами. Введение может быть системным или локальным.

Фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно доставить подкожно или внутривенно с помощью стандартной иглы и шприца. Кроме того, в случае подкожной доставки при доставке фармацевтической композиции по настоящему изобретению широко применяется шприц-ручка.

Такой шприц-ручка может быть многоразовым и одноразовым. В многоразовом шприце-ручке, как правило, используется заменяемый картридж, который содержит фармацевтическую композицию. После того, как все из фармацевтической композиции в картридже было введено и картридж стал пустым, картридж можно легко утилизировать и заменить новым картриджем, который содержит фармацевтическую композицию. Затем шприц-ручку можно использовать повторно. В одноразовом шприце-ручке заменяемый картридж отсутствует. Вместо этого одноразовый шприц-ручку выпускают предварительно наполненным фармацевтической композицией, содержащейся в резервуаре в изделии. После того, как резервуар освобождается от фармацевтической композиции, все изделие утилизируют.

Многочисленные многоразовые шприцы-ручки и изделия для автоинъекторной доставки применяются при подкожной доставке фармацевтической композиции по настоящему изобретению. Примеры включают без ограничения шприц-ручку AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Вудсток, Великобритания), DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Бургдорф, Швейцария), шприц-ручку HUMALOG MIX 75/25™, шприц-ручку HUMALOG™, шприц-ручку HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Индианаполис, Индиана), NOVOPEN™ I, II и III (Novo Nordisk, Копенгаген, Дания), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Копенгаген, Дания), шприц-ручку BD™ (Becton Dickinson, Франклин-Лэйкс, Нью-Джерси), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ и OPTICLIK™ (Sanofi-Aventis, Франкфурт, Германия), не говоря уже о других. Примеры многоразовых шприцев-ручек, применяемых при подкожном введении фармацевтической композиции по настоящему изобретению, включают без ограничения шприц-ручку SOLOSTAR™ (Sanofi-Aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) и KWIKPEN™ (Eli Lilly), автоинжектор SURECLICK™ (Amgen, Таузанд-Окс, Калифорния), PENLETT™ (Haselmeier, Штутгарт, Германия), EPIPEN (Dey, L.P.) и шприц-ручку HUMIRATM (Abbott Labs, Эббот-Парк, Иллинойс), не говоря уже о других.

В определенных ситуациях фармацевтическую композицию можно доставлять в системе с контролируемым высвобождением. В соответствии с одним вариантом осуществления можно использовать насос (см. Langer, выше; 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 систему с контролируемым высвобождением можно поместить вблизи от мишени композиции, при этом требуется лишь часть системной дозы (см., например, Goodson, 1984, в Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, pp. 115-138). Другие системы с контролируемым высвобождением описаны в обзоре Langer, 1990, Science 249:1527-1533.

Инъекционные формы могут включать лекарственные формы для внутривенных, подкожных, внутрикожных и внутримышечных инъекций, капельниц и т.п. Эти инъекционные формы можно получать общеизвестными способами. Например, инъекционные формы можно получать, например, растворением, суспендированием или эмульгированием антитела или его соли, описанных выше, в стерильной водной среде или масляной среде, обычно используемой для инъекций. Водной средой для инъекций, является, например, физиологический раствор, изотонический раствор, содержащий глюкозу и другие вспомогательные средства и т.п., например, которые можно использовать в комбинации с подходящим растворителем, таким как спирт (например, этанол), полиспирт (например, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль), неионное поверхностно-активное вещество (например, полисорбат 80, HCO-50 (полиоксиэтиленовый (50 моль) аддукт гидрогенизированного касторового масла)) и т.п. В качестве масляной среды используют, например, кунжутное масло, арахисовое масло и т.п., которые можно использовать в комбинации с растворителем, таким как бензилбензоат, бензиловый спирт и т.п. Приготовленную таким способом инъекцию предпочтительно заполняют в подходящую ампулу.

Предпочтительно фармацевтические композиции для перорального или парентерального применения, описанные выше, получают в лекарственных формах в унифицированной дозе, подходящей для соответствия дозы активных компонентов. Такие лекарственные формы в унифицированной дозе включают, например, таблетки, пилюли, капсулы, инъекции (ампулы), суппозитории и др. Вышеупомянутое антитело содержится, как правило, в количестве от приблизительно 5 до приблизительно 500 мкг на лекарственную форму; особенно в форме инъекции предпочтительно, чтобы вышеуказанное антитело содержалось в количестве от приблизительно 5 до приблизительно 100 мг и от приблизительно 10 до приблизительно 250 мг - в случае других лекарственных форм.

Терапевтические применения антител

Настоящее изобретение предусматривает способы, предусматривающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтической композиции, содержащей антитело к LEPR (например, антитело к LEPR, содержащее любую из последовательностей HCVR/LCVR или CDR, изложенных в табл. 1 настоящего документа). Терапевтическая композиция может содержать любое из антител к LEPR, раскрываемых в настоящем документе, или их антигенсвязывающих фрагментов, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

Антитела по настоящему изобретению применимы, в числе прочего, для лечения, предупреждения и/или облегчения любого заболевания или нарушения, ассоциированного с или опосредованного недос-

таточностью лептина, устойчивостью к лептину, гиполептинемией или иным образом подлежащего лечению в результате стимуляции или активации передачи сигнала посредством LEPR или имитацией природной активности лептина *in vitro* или *in vivo*. Например, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению применимы для лечения липодистрофических состояний. Иллюстративные липодистрофические состояния, которые подлежат лечению с помощью антител и антигенсвязывающих фрагментов по настоящему изобретению, включают, например, врожденную генерализованную липодистрофию, приобретенную генерализованную липодистрофию, семейную парциальную липодистрофию, приобретенную парциальную липодистрофию, центрифужную абдоминальную липодистрофию, кольцевидную липоатрофию, локализованную липодистрофию и ВИЧ-ассоциированную липодистрофию.

Настоящее изобретение также предусматривает антитела к LEPR и их антигенсвязывающие фрагменты, которые применимы для восстановления передачи сигнала посредством лептина к клеткам, тканям и органам, экспрессирующим одну или несколько мутаций LEPR, ассоциированных с ожирением. Например, были идентифицированы определенные мутанты LEPR, которые характеризуются отсутствием или ослабленной передачей сигнала в присутствии лептина и ассоциированы с ожирением и связанными нарушениями. Используемый в настоящем документе мутант LEPR, который характеризуется отсутствием передачи сигнала в присутствии лептина, называется "мутантом LEPR с дефектом передачи сигнала". Иллюстративной мутацией LEPR с дефектом передачи сигнала является LEPR-A409E (Farooqi et al., 2007, N Engl J Med 356(3): 237-247). Используемый в настоящем документе мутант LEPR, который характеризуется ослабленной передачей сигнала в присутствии лептина (по сравнению с LEPR дикого типа), называется "мутантом LEPR с нарушением передачи сигнала". Иллюстративной мутацией LEPR с нарушением передачи сигнала является LEPR-P316T (Mazen et al., 2011, Mol Genet Metab 102:461-464). Таким образом, настоящее изобретение предусматривает антитела к LEPR и их антигенсвязывающие фрагменты, которые применимы для лечения, предупреждения и/или ослабления заболеваний и нарушений, вызванных или ассоциированных с одним или несколькими мутантами LEPR с дефектом передачи сигнала (например, A409E) и/или нарушением передачи сигнала (например, P316T).

Антитела к LEPR и их антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению также применимы для лечения или предупреждения одного или нескольких заболеваний или нарушений, выбранных из группы, состоящей из ожирения, метаболического синдрома, вызванной диетой тяги к определенному виду пищи, функциональной гипоталамической аменореи, диабета 1 типа, диабета 2 типа, устойчивости к инсулину, тяжелой устойчивости, в том числе тяжелой устойчивости к инсулину в результате мутации инсулинового рецептора, тяжелой устойчивости к инсулину, не вызванной мутацией инсулинового рецептора, тяжелой устойчивостью к инсулину, вызванной мутацией нисходящих путей передачи сигнала или вызванной другими причинами, неалкогольной и алкогольной жировой дистрофии печени, болезни Альцгеймера, недостаточности лептина, устойчивости к лептину, лепречаунизма/синдрома Донохью и синдрома Рабсона-Менденхолла.

В контексте способов лечения, описанных в настоящем документе, антитело к LEPR можно вводить в виде монотерапии (например, в виде только одного терапевтического средства) или в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами (примеры таковых описаны в других разделах настоящего документа).

Комбинированные препараты и составы

Настоящее изобретение предусматривает 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 субъектам, нуждающимся в этом.

Антитела к LEPR по настоящему изобретению можно составлять совместно с и/или вводить в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтически активными компонентами, такими как, например, фармацевтические продукты, выписываемые для лечения ожирения, гиперхолестеринемии, гиперлипидемии, диабета 2 типа, диабета 1 типа, контроля аппетита, бесплодия и др. Примеры таких дополнительных терапевтически активных компонентов включают, например, рекомбинантный лептин человека (например, метрелептин (MYALEPT)), ингибиторы PCSK9 (например, антитела к PCSK9 (алирокумаб, эволокумаб, бокоцизумаб, лоделцизумаб, ралпанцизумаб и др.)), статины (аторвастатин, розувастатин, церивастатин, питавастатин, флувастатин, симвастатин, ловастатин, правастатин и др.), эзетемиб, инсулин, варианты инсулина, секретогены инсулина, метформин, сульфонилмочевину, ингибиторы натрий-глюкозного котранспортера 2 (SGLT2) (например, дапаглифлозин, канаглифлозин, эмпаглифлозин и др.), агонисты/аналоги GLP-1 (например, экстендин-4, эксенатид, лираглутид, ликсисенатид, альбиглутид, дулаглутид и др.), ингибиторы глюкагона (GCG) (например, антитела к GCG), ингибиторы глюкагонового рецептора (GCGR) (например, антитела к GCGR), низкомолекулярные антагонисты GCGR, GCGR-специфические бессмысловые олигонуклеотиды, аптамеры к GCGR (например, шпигельмеры) и др.), ингибиторы ангиопоэтин-подобного белка (ANGPTL) (например, антитела к ANGPTL3, антитела к ANGPTL4, антитела к ANGPTL8 и др.), фентермин, орлистат, топирамат, бупропион, топирамат/фентермин, бупропион/налтрексон, бупропион/зонизамид, прамлинтид/метрелептин, лоркасерин,

цетилистат, тезофензин, велнеперит и др.

Дополнительный терапевтически активный компонент (дополнительные терапевтически активные компоненты), например, любое из средств, приведенных выше, или их производных, можно вводить непосредственно перед, совместно с введением или вскоре после введения антитела к LEPR по настоящему изобретению (для целей настоящего раскрытия такие режимы введения представляют собой введение антитела к LEPR "в комбинации с" дополнительным терапевтически активным компонентом). Настоящее изобретение предусматривает фармацевтические композиции, в которых антитело к LEPR по настоящему изобретению составляют совместно с одним или несколькими дополнительными терапевтически активными компонентами, как описано в других разделах настоящего документа.

Режимы введения

В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения многократные дозы антитела к LEPR (или фармацевтической композиции, содержащей комбинацию антитела к LEPR и любого из дополнительных терапевтически активных средств, упомянутых в настоящем документе) можно вводить субъекту в течение определенного периода времени. Способы в соответствии с этим аспектом настоящего изобретения предусматривают последовательное введение субъекту многократных доз антитела к LEPR по настоящему изобретению. Используемое в настоящем документе выражение "последовательное введение" означает, что каждую дозу антитела к LEPR вводят субъекту в разный момент времени, например, в разные дни, разделенные предварительно определенным интервалом (например, часами, днями, неделями или месяцами). Настоящее изобретение предусматривает способы, которые предусматривают последовательное введение пациенту одной начальной дозы антитела к LEPR, затем одной или нескольких вторых доз антитела к LEPR, а затем необязательно одной или нескольких третьих доз антитела к LEPR.

Термины "начальная доза", "вторые дозы" и "третьи дозы" относятся к временной последовательности введения антитела к LEPR по настоящему изобретению. Таким образом, "начальная доза" представляет собой дозу, которую вводят в начале терапевтического режима (также называется "доза исходного уровня", "ударная доза", "начальная доза" и т.п.); "вторые дозы" представляют собой дозы, которые вводят после введения начальной дозы; и "третьи дозы" представляют собой дозы, которые вводят после вторых доз. Все из начальных, вторых и третьих доз могут содержать одинаковое количество антитела к LEPR, но, как правило, могут отличаться друг от друга по частоте введения. В соответствии с определенными вариантами осуществления количество антитела к LEPR, содержащегося в начальных, вторых и/или третьих дозах, отличается друг от друга (например, при необходимости корректируется в сторону повышения или снижения) в ходе курса лечения. В соответствии с определенными вариантами осуществления две или более (например, 2, 3, 4 или 5) дозы вводят в начале терапевтического режима в виде "ударных доз", затем последующие дозы вводят на менее частой основе (например, "поддерживающие дозы").

Диагностические и аналитические применения антител

Антитела к LEPR по настоящему изобретению можно также использовать для выявления 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 аномальной экспрессией (например, сверхэкспрессией, недостаточной экспрессией, отсутствием экспрессии и др.) LEPR. Иллюстративные диагностические анализы в случае LEPR могут предусматривать, например, приведение в контакт образца, полученного от пациента, с антителом к LEPR по настоящему изобретению, где антитело к LEPR метят подлежащей выявлению меткой или репортерной молекулой. Альтернативно немеченое антитело к LEPR можно использовать в диагностических применениях в комбинации с вторичным антителом, которое само по себе является подлежащим выявлению образом меченым. Подлежащая выявлению метка или репортерная молекула может представлять собой радиоизотоп, такой как ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S или ^{125}I ; флуоресцентный или хемилюминесцентный фрагмент, такой как флуоресцеин изотиоцианат или родамин; или фермент, такой как щелочная фосфатаза, бета-галактозидаза, пероксидаза хрена или люцифераза. Конкретные иллюстративные анализы, которые можно применять для выявления или измерения LEPR в образце, включают иммуноферментный твердофазный анализ (ELISA), радиоиммуноанализ (RIA), сортировку флуоресцентно-активированных клеток (FACS) и сканирование на основе позитронно-эмиссионной томографии (PET).

Образцы, которые можно использовать в диагностических анализах LEPR в соответствии с настоящим изобретением, включают любой образец ткани или жидкости, получаемый от пациента, который содержит подлежащие выявлению количества белка LEPR или его фрагментов, в нормальных или патологических условиях. Как правило, уровни LEPR в определенном образце, полученном от здорового пациента (например, пациента, не пораженного заболеванием или состоянием, ассоциированным с аномальными уровнями или активностью LEPR), будут измерять в целях изначального установления исходного уровня или стандартного уровня LEPR. Этот исходный уровень LEPR затем можно сравнивать с уровнями LEPR, измеренными в образцах, полученных от индивидуумов, предположительно имеющих связанное с LEPR заболевание или состояние.

Примеры

Следующие примеры изложены в целях предоставления специалистам в данной области полного

раскрытия и описания того, как получать и применять способы и композиции по настоящему изобретению, а не в целях ограничения объема того, что авторы настоящего изобретения рассматривают в качестве своего изобретения. Были приложены усилия для обеспечения точности по отношению к используемым числам (например, количеству, температуре и т.п.), однако необходимо учитывать некоторые ошибки и отклонения экспериментов. Если не указано иное, то части являются массовыми частями, молекулярная масса является средней молекулярной массой, температура представлена в градусах Цельсия, а давление является атмосферным или близким к атмосферному.

Пример 1. Получение антигенсвязывающих белков, которые специфически связывают лептиновый рецептор (LEPR).

Антитела к LEPR получали в результате иммунизации мыши VELOCIMMUNE® (например, сконструированной мыши, содержащей ДНК, кодирующую вариabельные участки тяжелой и легкой цепи каппа человеческих иммуноглобулинов) иммуногеном, содержащим внеклеточный домен LEPR. Иммуногенный ответ на антитело контролировали с помощью LEPR-специфического иммуноанализа. С помощью ранее описанных методик полностью человеческие антитела к LEPR выделяли и очищали.

Определенные биологические свойства иллюстративных антител к LEPR, полученных в соответствии с этим примером, подробно описаны в разделе "Примеры", изложенном далее.

Пример 2. Аминокислотные последовательности и последовательности нуклеиновых кислот вариabельных участков тяжелой и легкой цепи.

В табл. 1 изложены идентификаторы аминокислотных последовательностей вариabельных участков и CDR тяжелой и легкой цепи некоторых антител к LEPR по настоящему изобретению. Идентификаторы соответствующих последовательностей нуклеиновых кислот изложены в табл. 2.

Таблица 1. Идентификаторы аминокислотных последовательностей

Обозначение антител	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H4N16650P2	2	4	6	8	10	12	14	16
H4N16679P2	18	20	22	24	10	12	14	16
H4N17319P2	26	28	30	32	10	12	14	16
H4N17321P2	34	36	38	40	10	12	14	16
H4N18417P2	42	44	46	48	10	12	14	16
H4N18438P2	50	52	54	56	10	12	14	16
H4N18445P2	58	60	62	64	10	12	14	16
H4N18446P2	66	68	70	72	10	12	14	16
H4N18449P2	74	76	78	80	10	12	14	16
H4N18482P2	82	84	86	88	90	92	94	96
H4N18487P2	98	100	102	104	90	92	94	96
H4N18492P2	106	108	110	112	90	92	94	96

Таблица 2. Идентификаторы последовательностей нуклеиновых кислот

Обозначение антител	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H4H16650P2	1	3	5	7	9	11	13	15
H4H16679P2	17	19	21	23	9	11	13	15
H4H17319P2	25	27	29	31	9	11	13	15
H4H17321P2	33	35	37	39	9	11	13	15
H4H18417P2	41	43	45	47	9	11	13	15
H4H18438P2	49	51	53	55	9	11	13	15
H4H18445P2	57	59	61	63	9	11	13	15
H4H18446P2	65	67	69	71	9	11	13	15
H4H18449P2	73	75	77	79	9	11	13	15
H4H18482P2	81	83	85	87	89	91	93	95
H4H18487P2	97	99	101	103	89	91	93	95
H4H18492P2	105	107	109	111	89	91	93	95

Антитела обычно обозначают в настоящем документе в соответствии со следующей номенклатурой: префикс Fc (например, "H4H", "H1M", "H2M" и др.), затем числовой идентификатор (например, "16650", "16679" и др.), затем суффикс "P" или "N". Таким образом, в соответствии с этой номенклатурой, антитело может называться в настоящем документе как, например, "H4H16650P2", "H4H16679P2" и др. Префикс Fc в обозначениях антитела, используемый в настоящем документе (H4H, H1M и H2M), указывает определенный изотип Fc-участка антитела. Например, антитело "H4H" представляет собой Fc IgG4 человека, в то время как "H1M" имеет Fc IgG1 мыши (все переменные участки являются полностью человеческими, как обозначается по первому символу "H" в обозначении антитела). Как будет понятно специалисту в данной области, антитело, имеющее определенный изотип 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.), однако в любом случае переменные домены (в том числе CDR), которые указываются числовыми идентификаторами, показанными в табл. 1 и 2, будут оставаться одинаковыми, и предполагается, что связывающие свойства будут идентичными или фактически аналогичными независимо от природы Fc-домена.

"mAb сравнения", как используется в примерах в настоящем документе, относится к Fab9F8, описанному в Fazeli et al. (2006) J Immunol Methods 312:190-200, и Carpenter et al. (2012) Structure 20(3):487-97.

Пример 3. Аффинности связывания и константы скорости реакции человеческих моноклональных антител к LEPR, полученные на основе поверхностного плазмонного резонанса.

Равновесные константы диссоциации (значения K_D) в случае связывания LEPR с очищенными моноклональными антителами к LEPR определяли с помощью биосенсора поверхностного плазмонного резонанса в реальном времени с помощью инструмента Biacore 4000. Все анализы связывания выполняли в поверхностном буфере на основе mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA и 0,05 об.% поверхностно-активного вещества Tween-20, pH 7,4 (HBS-ET) при 25 и 37°C. Сенсорную поверхность Biacore вначале дериватизировали с помощью связывания амина с моноклональным мышинным антителом к Fc человека (GE, № BR-1008-39) в целях захвата моноклональных антител к LEPR. Исследования связывания выполняли со следующими реагентами для LEPR: внеклеточным доменом LEPR человека, экспрессируемым с С-концевой гексагистидиновой меткой мус-мус (hLEPR.mmh; SEQ ID NO: 114), внеклеточным доменом LEPR *Macaca fascicularis*, экспрессируемым с С-концевой гексагистидиновой меткой мус-мус (mfLEPR.mmh; SEQ ID NO: 117), внеклеточным доменом LEPR человека, экспрессируемым с С-концевой меткой Fc gG2a мыши (hLEPR.mFc; SEQ ID NO: 115), внеклеточным доменом LEPR мыши, экспрессируемым с С-концевой гексагистидиновой меткой мус-мус (mLEPR.mmh; SEQ ID NO: 118) и внеклеточным доменом LEPR крысы, экспрессируемым с С-концевой гексагистидиновой меткой мус-мус (rLEPR.mmh; SEQ ID NO: 119). Различные концентрации реагентов для LEPR сначала получали в поверхностном буфере HBS-ET (100-3,7 nM; 3-х-кратное серийное разведение) и инъецировали на поверхность моноклонального антитела к LEPR, захваченного антителом к Fc человека, в течение 4 мин со скоростью потока 30 мкл/мин, в то время как диссоциацию связанного с моноклональным антителом

реагента для LEPR контролировали в течение 10 мин в поверхностном буфере HBS-ET. Константы скорости ассоциации (k_a) и диссоциации (k_d) определяли подгонкой сенсограмм связывания в реальном времени к модели связывания 1:1 с ограничением массопереноса с помощью компьютерной программы подбора кривых Scrubber 2.0c. Константы равновесия при диссоциации после связывания (K_D) и полупериоды диссоциации ($t^{1/2}$) рассчитывали исходя из констант скорости реакции в виде

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

Параметры кинетики связывания в случае связывания hLEPR.mmh, mfLEPR.ММН или hLEPR.mFc с различными моноклональными антителами к LEPR по настоящему изобретению при 25 и 37°C показаны в табл. 3-8.

Таблица 3. Параметры кинетики связывания при связывании hLEPR-ММН с моноклональными антителами к LEPR при 25°C

Захваченное mAb	Уровень захвата mAb (RU)	Связанный 100 нм hLEPR- ММН (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t^{1/2}$ (мин)
H4N16650P2	167 ± 0,3	51	2,81E+04	2,23E-04	7,93E-09	52
H4N16679P2	192 ± 0,7	39	2,34E+04	2,46E-04	1,05E-08	47
H4N18417P2	163 ± 0,4	28	6,14E+04	7,90E-03	1,29E-07	1,5
H4N18438P2	166 ± 0,4	22	3,00E+04	2,26E-03	7,54E-08	5,1
H4N18445P2	194 ± 1,1	45	4,42E+04	4,78E-03	1,08E-07	2,4
H4N18446P2	163 ± 2,4	16	1,81E+04	9,51E-04	5,25E-08	12
H4N18449P2	176 ± 1,3	54	2,91E+04	2,35E-04	8,08E-09	49
H4N18482P2	163 ± 0,4	47	6,31E+04	6,77E-03	1,07E-07	1,7
H4N18487P2	190 ± 1,2	42	4,73E+04	7,03E-03	1,48E-07	1,6
H4N18492P2	167 ± 3,1	87	8,10E+04	8,98E-04	1,11E-08	13
H4N17319P2	200 ± 0,4	36	2,61E+04	5,29E-04	2,03E-08	22
H4N17321P2	221 ± 0,5	32	2,36E+04	1,96E-04	8,31E-09	59
mAb изотипического контроля	171 ± 0,4	4	н.с.*	н.с.*	н.с.*	н.с.*

*н.с. указывает, что наблюдали отсутствие связывания при текущих экспериментальных условиях

Таблица 4. Параметры кинетики связывания при связывании hLEPR-ММН с моноклональными антителами к LEPR при 37°C

Захваченное mAb	Уровень захвата mAb (RU)	Связанный 100 нм hLEPR- ММН (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (мин)
H4H16650P2	210 ± 2,5	77	4,85E+04	9,58E-04	1,98E-08	12
H4H16679P2	239 ± 2	61	3,84E+04	8,42E-04	2,19E-08	14
H4H18417P2	206 ± 3,2	22	7,70E+04	1,80E-02	2,33E-07	0,6
H4H18438P2	206 ± 2,4	32	3,38E+04	5,76E-03	1,70E-07	2,0
H4H18445P2	234 ± 2	38	5,13E+04	1,68E-02	3,26E-07	0,7
H4H18446P2	188 ± 3,4	21	2,12E+04	2,56E-03	1,21E-07	4,5
H4H18449P2	206 ± 2,1	73	3,94E+04	8,15E-04	2,07E-08	14
H4H18482P2	188 ± 0,8	38	9,53E+04	1,93E-02	2,03E-07	0,6
H4H18487P2	219 ± 1,7	30	6,51E+04	1,86E-02	2,86E-07	0,6
H4H18492P2	192 ± 2,2	93	1,17E+05	4,18E-03	3,59E-08	2,8
H4H17319P2	264 ± 0,3	44	3,54E+04	3,41E-03	9,63E-08	3,4
H4H17321P2	290 ± 0,4	61	2,95E+04	4,38E-04	1,48E-08	26
mAb изотипического контроля	193 ± 1,5	6	н.с.*	н.с.*	н.с.*	н.с.*

*н.с. указывает, что наблюдали отсутствие связывания при текущих экспериментальных условиях

Таблица 5. Параметры кинетики связывания при связывании mfLEPR.ММН с моноклональными антителами к LEPR при 25°C

Захваченное mAb	Уровень захвата mAb (RU)	Связанный 100 нм mfLEPR. ММН (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (мин)
H4H16650P2	166 ± 0,6	93	6,02E+04	1,37E-04	2,27E-09	84
H4H16679P2	191 ± 0,7	66	4,37E+04	1,41E-04	3,22E-09	82
H4H18417P2	162 ± 0,3	33	8,83E+04	1,23E-02	1,39E-07	0,9
H4H18438P2	166 ± 0,6	5	IC*	IC*	IC*	IC*
H4H18445P2	193 ± 0,6	58	5,90E+04	4,86E-03	8,24E-08	2,4
H4H18446P2	163 ± 2,8	23	1,93E+04	1,12E-03	5,83E-08	10
H4H18449P2	175 ± 0,5	6	IC*	IC*	IC*	IC*
H4H18482P2	163 ± 0,8	63	1,01E+05	6,74E-03	6,66E-08	1,7
H4H18487P2	189 ± 0,5	59	7,37E+04	6,79E-03	9,21E-08	1,7
H4H18492P2	165 ± 2,4	52	1,10E+05	1,20E-02	1,10E-07	1,0
H4H17319P2	213 ± 0,5	83	4,00E+04	4,63E-04	1,16E-08	25
H4H17321P2	236 ± 0,4	75	3,26E+04	1,33E-04	4,07E-09	87
mAb изотипического контроля	171 ± 0,4	0	н.с.*	н.с.*	н.с.*	н.с.*

*н.с. указывает, что наблюдали отсутствие связывания при текущих экспериментальных условиях

*IC указывает, что наблюдаемое связывание было инклюзивным и на основе него было невозможно подгонять данные о связывании в реальном времени при текущих экспериментальных условиях

Таблица 6. Параметры кинетики связывания при связывании mfLEPR.ММН с моноклональными антителами к LEPR при 37°C

Захваченное mAb	Уровень захвата mAb (RU)	Связанный 100 нм mfLEPR .ММН (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (мин)
H4H16650P2	204 ± 1,7	134	1,22E+05	7,00E-04	5,76E-09	16
H4H16679P2	232 ± 1,1	104	6,49E+04	6,77E-04	1,04E-08	17
H4H18417P2	202 ± 1,3	28	1,22E+05	2,63E-02	2,17E-07	0,4
H4H18438P2	203 ± 1,3	7	IC*	IC*	IC*	IC*
H4H18445P2	232 ± 0,9	48	7,17E+04	1,90E-02	2,64E-07	0,6
H4H18446P2	188 ± 2,9	30	2,53E+04	3,54E-03	1,40E-07	3,3
H4H18449P2	202 ± 1	6	IC*	IC*	IC*	IC*
H4H18482P2	187 ± 1,2	52	1,52E+05	2,04E-02	1,34E-07	0,6
H4H18487P2	216 ± 0,7	44	1,10E+05	1,95E-02	1,78E-07	0,6
H4H18492P2	191 ± 1,4	34	2,34E+05	3,94E-02	1,69E-07	0,3
H4H17319P2	274 ± 0,5	113	5,39E+04	3,24E-03	6,01E-08	3,6
H4H17321P2	304 ± 0,7	143	4,97E+04	2,57E-04	5,18E-09	45
mAb изотипического контроля	190 ± 1	1	н.с.*	н.с.*	н.с.*	н.с.*

*н.с. указывает, что наблюдали отсутствие связывания при текущих экспериментальных условиях

*IC указывает, что наблюдаемое связывание было инклюзивным и на основе него было невозможно подгонять данные о связывании в реальном времени при текущих экспериментальных условиях

Таблица 7. Параметры кинетики связывания при связывании hLEPR.mFc с моноклональными антителами к LEPR при 25°C

Захваченное mAb	Уровень захвата mAb (RU)	Связанный 100 нм hLEPR- mFc (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (мин)
H4H16650P2	165 ± 0,2	102	1,06E+05	8,32E-05	7,85E-10	139
H4H16679P2	190 ± 1,2	78	5,84E+04	9,68E-05	1,66E-09	119
H4H18417P2	162 ± 0,6	90	1,40E+05	5,63E-04	4,04E-09	21
H4H18438P2	165 ± 1,2	51	5,19E+04	2,44E-04	4,70E-09	47
H4H18445P2	192 ± 0,4	76	1,22E+05	4,92E-04	4,03E-09	23
H4H18446P2	162 ± 2,8	20	3,20E+04	2,08E-04	6,48E-09	56
H4H18449P2	174 ± 0,6	116	7,05E+04	6,82E-05	9,64E-10	169
H4H18482P2	162 ± 0,5	88	1,44E+05	4,91E-04	3,42E-09	24
H4H18487P2	188 ± 0,6	85	1,06E+05	6,03E-04	5,70E-09	19
H4H18492P2	166 ± 3,2	129	2,27E+05	1,39E-04	6,13E-10	83
H4H17319P2	200 ± 0,5	69	4,77E+04	1,64E-04	3,45E-09	70
H4H17321P2	221 ± 0,4	65	4,10E+04	8,93E-05	2,18E-09	129
mAb изотипического контроля	170 ± 0,7	-2	н.с.*	н.с.*	н.с.*	н.с.*

*н.с. указывает, что наблюдали отсутствие связывания при текущих экспериментальных условиях

Таблица 8. Параметры кинетики связывания при связывании hLEPR.mFc с моноклональными антителами к LEPR при 37°C

Захваченное mAb	Уровень захвата mAb (RU)	Связанный 100 нм hLEPR-mFc (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (мин)
H4H16650P2	199 ± 1,9	145	1,57E+05	2,80E-04	1,79E-09	41
H4H16679P2	229 ± 2,3	116	1,21E+05	3,10E-04	2,56E-09	37
H4H18417P2	199 ± 1,1	111	1,85E+05	1,05E-03	5,64E-09	11
H4H18438P2	199 ± 0,6	82	7,02E+04	5,98E-04	8,53E-09	19
H4H18445P2	229 ± 2	104	1,56E+05	6,08E-04	3,89E-09	19
H4H18446P2	186 ± 2,5	34	4,27E+04	5,48E-04	1,28E-08	21
H4H18449P2	198 ± 1,6	148	1,33E+05	1,68E-04	1,26E-09	69
H4H18482P2	185 ± 1,3	109	1,89E+05	7,26E-04	3,84E-09	16
H4H18487P2	215 ± 1,5	99	1,23E+05	6,06E-04	4,93E-09	19
H4H18492P2	189 ± 1,8	160	4,33E+05	5,00E-04	1,16E-09	23
H4H17319P2	262 ± 0,5	100	8,51E+04	6,52E-04	7,66E-09	18
H4H17321P2	289 ± 0,4	110	5,53E+04	1,74E-04	3,15E-09	66
mAb изотипического контроля	188 ± 0,8	1	н.с.*	н.с.*	н.с.*	н.с.*

*н.с. указывает, что наблюдали отсутствие связывания при текущих экспериментальных условиях

При 25°C моноклональные антитела к LEPR связывались с hLEPR-ММН со значениями K_D , варьирующими от 7,9 до 148 нМ, как показано в табл. 5. При 37°C моноклональные антитела к LEPR связывались с hLEPR-ММН со значениями K_D , варьирующими от 14,8 до 326 нМ, как показано в табл. 4.

10 из 12 моноклональных антител к LEPR по настоящему изобретению связывались к mfLEPR.ММН. При 25°C моноклональные антитела к LEPR связывались с mfLEPR.ММН со значениями K_D , варьирующими от 2,27 до 139 нМ, как показано в табл. 7. При 37°C моноклональные антитела к LEPR связывались с mfLEPR.ММН со значениями K_D , варьирующими от 5,18 до 264 нМ, как показано в табл. 8.

При 25°C моноклональные антитела к LEPR связывались с hLEPR-mFc со значениями K_D , варьирующими от 613 нМ до 5,7 нМ, как показано в табл. 7. При 37°C моноклональные антитела к LEPR связывались с hLEPR-mFc со значениями K_D , варьирующими от 1,16 до 12,8 нМ, как показано в табл. 8.

Никакие из моноклональных антител к LEPR по настоящему изобретению не связывались с mLEPR.ММН или gLEPR.ММН при 25 или при 37°C (данные не показаны).

Пример 4. Антитела к LEPR по настоящему изобретению связывают LEPR при присутствии связывания комплекса лептин:LEPR.

Блокирование антител к LEPR от связывания с LEPR с помощью лептина человека оценивали с помощью биосенсора плазмонного поверхностного резонанса в реальном времени на инструменте Biacore T200. Все исследование выполняли в 10 мМ HEPES, pH 7,4, 150 мМ NaCl, 3 мМ EDTA и 0,05 об.% поверхностно-активного вещества Tween-20 (поверхностный буфер HBS-ET) при 25°C. Поверхность сенсора Biacore CM5 сначала дериватизировали с помощью связывания амина с лептином человека (R&D Systems, № 398-LP) с помощью стандартной поверхностной химической структуры EDC/NHS. Комплекс LEPR человека и лептина человека образовывался в результате инъекции 20 нМ внеклеточного домена LEPR человека, экспрессируемого с С-концевой гексагистиридиновой меткой мус-мус (hLEPR-ММН; SEQ ID NO: xx), на сенсорной поверхности Biacore с иммобилизованным лептином человека при скорости потока 10 мкл/мин или 25 мкл/мин в течение 4 мин, с получением ответа при связывании, составляющего примерно 200 RU. Для оценки того, блокируется ли связывание антитела с hLEPR-ММН лептином чело-

века, 200 нМ моноклональных антител к LEPR инъектировали на предварительно образованный комплекс hLEPR-ММН:лептин человека при скорости потока 50 мкл/мин или 25 мкл/мин в течение 4-5 мин. Все антитела к LEPR по настоящему изобретению, связанные с комплексом hLEPR-ММН и лептином человека ("лептин:LEPR") с почти аналогичной силой сигнала и наблюдаемым связыванием, экспрессируемым в RU, описаны в табл. 9. Этот результат указывал на то, что лептин человека не блокировал связывание hLEPR-ММН с исследуемыми антителами к LEPR.

Таблица 9. Связывание моноклональных антител к LEPR с предварительно образованным комплексом hLEPR-ММН и лептином человека

Антитело	Связанный hLEPR-ММН (RU)	Связанное 200 нМ mAb (RU)
H4H16650P2	196	81
H4H16679P2	195	90
H4H17319P2	196	92

Пример 5. ELISA при блокировании лептинового рецептора человека.

При проведении ELISA лептин человека (hLeptin; R&D Systems, № 398-LP-01M) покрывали при концентрации 5 мкг/мл в PBS в 96-луночном микротитрационном планшете в течение ночи при 4°C. Затем участки неспецифического связывания блокировали с помощью 0,5% (мас./об.) раствора BSA в PBS. Постоянное количество 10 нМ участка внеклеточного домена белка LEPR, который экспрессировали с С-концевой меткой Fc человека (hLEPR.hFc; SEQ ID NO: 116), титровали антителами к LEPR, белком hLeptin или антителом изотипического контроля в диапазоне от 8,5 пМ до 500 нМ в серийном разведении. Эти комплексы антитело-белок или белок-белок затем инкубировали в течение 1,5 ч при комнатной температуре (RT). Затем комплексы переносили в микротитрационные планшеты, покрытые hLeptin и инкубировали в течение 2 ч при RT, лунки промывали и связанный с планшетом hLEPR.hFc выявляли с помощью поликлонального антитела к IgG человека, конъюгированного с пероксидазой редьки (Jackson ImmunoResearch Inc, №109-035-098). Образцы разводили с помощью раствора TMB (BD Biosciences, № 555214; субстрат А и В, смешанные в отношении 1:1, в соответствии с инструкциями производителя) с получением колориметрической реакции и затем нейтрализовали 1 М серной кислотой перед измерением поглощения при 450 нм на планшет-ридере Victor X5.

Анализ данных выполняли с помощью сигмоидальной функции доза-ответ в компьютерной программе Prism™ (GraphPad). Процент блокады при максимальной концентрации исследуемого антитела рассчитывали в виде показателя способности антител блокировать связывание 10 нМ hLEPR.hFc с лептином человека в планшете. При расчете связывающий сигнал от 10 нМ hLEPR.hFc без присутствия антитела представляли в виде 100% связывания или 0% блокирования; и сигнал исходного уровня буфера в отдельности без присутствия hLEPR.hFc представляли в виде 0% связывания или 100% блокирования. Данные о блокировании при концентрации антител 500 нМ обобщали в табл. 10.

Как показано в табл. 10, никакие из антител к LEPR по настоящему изобретению не характеризовались >28% блокированием связывания hLEPR.hFc с поверхностью, покрытой hLeptin. В то же время антитело сравнения и hLeptin, в качестве положительного контроля, были способны блокировать 99% связывания hLEPR.hFc с поверхностью, покрытой hLeptin. Антитело изотипического контроля не проявляло никакого подлежащего измерению блокирования при концентрациях до 500 нМ.

Таблица 10. Результаты ELISA при блокировании связывания hLEPR.hFc с hLeptin антителами к LEPR

Антитело	Блокирование 500 нМ Ab связывания 10 нМ hLEPR.hFc с hLeptin (% блокады)
H4H18487P2	5
H4H18417P2	16
H4H18482P2	25
H4H18492P2	-3
H4H18445P2	28
H4H18446P2	-5
H4H18449P2	8
H4H18438P2	15
H4H16650P2	-7
H4H16679P2	7
H4H173319P2	9
H4H173321P2	6
Контроли	
Антитело изотипического контроля	-3
Лептин человека	99
Антитело сравнения	99
Изотипический контроль IgG2a мыши	32

Пример 6. Связывание клеток при анализе FACS в случае HEK293/Myx2-hLepR(ecto)-GPI заякоренных клеток.

Лептиновый рецептор, LEPR, представляет собой однопроходный трансмембранный рецептор семейства рецепторов цитокинов I класса (Tartaglia et al. (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 et al. (2014) J Endocrinol 223(1):T1-8).

В целях оценки связывания клеток антителами к LEPR получали стабильные клеточные линии HEK293. Одна клеточная, известная далее в настоящем документе как HEK293/hLEPR-GPI, стабильно экспрессировала внеклеточный домен LEPR человека (аминокислоты 22-839 с № доступа P48357 (SEQ ID NO: 113), изоформа B) с N-концевой меткой тус-тус и C-концевой пептидной последовательностью от карбоксипептидазы человека M, которая управляет добавлением GPI (гликозилфосфатидилинозитола) (Deddish et al. (1990) J. Biological Chemistry 265:25:15083-89) таким образом, что белок может быть GPI-заякоренным по отношению к мембране. Другую клеточную линию HEK293 получали с целью стабильной экспрессии полноразмерного LEPR человека (аминокислоты 1-1165 с № доступа P48357 (SEQ ID NO: 113), изоформа B) совместно с люциферазным репортером (Stat3-люцифераза, Stat3-luc, SA Bioscience, № CLS-6028L), и она известна далее в настоящем документе как HEK293/Stat3-luc/hLEPR-FL. Клетки HEK293 только с Stat3-люциферазным репортером (HEK293/Stat3-luc) также получали в качестве контрольной клеточной линии.

При выполнении анализа FACS родительские клетки HEK293 и клетки HEK293/hLEPR-GPI разъединяли и помещали в 96-луночные планшеты с V-образным дном по 5×10^5 клеток/лунку в PBS, содержащем 2% FBS (буфер FACS). В целях исследования того, влияет ли на способность антител к hLEPR связываться с клетками присутствие лептина, буфер FACS с или без 1 мкМ лептина человека (R&D Systems, № 398-LP) инкубировали с клетками в течение 30 мин при 4°C с последующим добавлением антител к LEPR или контрольных антител при 10 нМ в буфере FACS. Затем клетки инкубировали в течение 30 мин при 4°C с последующим промыванием и затем инкубацией с 16 мкл/мл конъюгированного с Alexa Fluor®-647 вторичного антитела (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., № 109-547-003) в течение 30 минут при 4°C. Затем клетки фиксировали с помощью BD CytoFix™ (Becton Dickinson, № 554655), фильтровали и анализировали на проточном цитометре HyperCyt (Beckman Coulter). Контроли в виде

неокрашенных и вторичных антител в отдельности также исследовали по отношению ко всем клеточным линиям. Результаты анализировали с помощью компьютерной программы ForeCyt (IntelliCyt) и Flow Jo, версия 10, с определением геометрических средних флуоресценции для жизнеспособных клеток. Геометрическое среднее флуоресценции для каждого образца затем нормализовали по отношению к геометрическому среднему неокрашенных клеток с получением относительного связывания на условие, называемое "коэффициентами связывания", и эти коэффициенты связывания отмечали для каждого исследуемого антитела.

Как показано в табл. 11, 9 антител к LEPR по настоящему изобретению, исследуемых при 10 нМ, характеризовались связыванием с клетками HEK293/hLEPR-GPI с коэффициентами связывания в диапазоне от 824 до 3374 без лептина. Антитела к LEPR также связывались в присутствии 1 мкМ лептина с коэффициентами связывания в диапазоне от 398 до 4184. Как показано в табл. 11, антитело сравнения, исследуемое при 10 нМ, характеризовалось связыванием с клетками HEK293/hLEPR-GPI с коэффициентом связывания 2349 без лептина, однако характеризовалось значительно меньшим связыванием с клетками в присутствии 1 мкМ лептина с коэффициентом связывания 112. Антитела к LEPR не проявляли никакого значимого связывания с родительскими клетками HEK293, при этом коэффициенты связывания с и без 1 мкМ лептина находились в диапазоне от 1 до 9. Образцы антител изотипического контроля и вторичных антител в отдельности также не характеризовались значимым связыванием ни с клеточной линией с лептином, ни с таковой без лептина, при этом коэффициенты связывания находились в диапазоне от 1 до 6.

Как показано в табл. 12, 4 антитела по настоящему изобретению, исследуемых при 70 нМ без лептина, характеризовались связыванием с клетками HEK293/hLEPR-GPI с коэффициентами связывания в диапазоне от 707 до 1131 и с клетками HEK293/Stat3-luc/hLEPR-FL с коэффициентами связывания в диапазоне от 42 до 51. Антитела к LEPR не проявляли никакого значимого связывания с родительскими клетками HEK293/Stat3-luc, при этом коэффициенты связывания находились в диапазоне от 1 до 8. Образцы антител изотипического контроля и вторичных антител в отдельности также не характеризовались значимым связыванием ни с какой из исследуемых клеточных линий, при этом коэффициенты связывания находились в диапазоне от 1 до 2.

Таблица 11. Связывание 10 нМ антител к LEPR с клетками HEK293/hLEPR-GPI и родительскими клетками HEK293 $\pm$ 1 мкМ лептина человека

Коэффициент связывания: нормализованный к неокрашенному образцу каждой клеточной линии					
	Без добавления лептина		1 мкМ лептина		Тип антитела
Антитело	Родительские клетки	HEK293/hLEPR-GPI	Родительские клетки	HEK293/hLEPR-GPI	
Коэффициент связывания: нормализованный к неокрашенному образцу каждой клеточной линии					
	Без добавления лептина		1 мкМ лептина		Тип антитела
	HEK293		HEK293		
H4N16650P2	5	2420	4	3124	Агонистическое
H4N16679P2	5	2058	8	2223	Агонистическое
H4N18417P2	1	1835	2	2604	Потенцирующее
H4N18438P2	2	1486	3	2414	Потенцирующее
H4N18445P2	2	2016	3	2488	Потенцирующее
H4N18449P2	5	3374	9	3113	Потенцирующее
H4N18482P2	1	1966	3	2704	Потенцирующее
H4N18487P2	1	2422	3	2670	Потенцирующее
H4N18492P2	3	2603	7	4184	Потенцирующее
Антитело сравнения	6	2349	3	112	н./о.
Антитело изотипического контроля	1	6	2	4	н./о.
Вторичное антитело в отдельности	1	3	2	3	н./о.
Неокрашенное	1	1	1	1	н./о.

*Классификация антител в виде "агонистического" или "потенцирующего" основано отчасти на результатах, наблюдаемых в примерах 7 и 8 настоящего документа

Таблица 12. Связывание 70 нМ антител к LEPR с клетками HEK293/hLEPR-GPI, HEK293/Stat3-hLEPR-FL и родительскими клетками HEK293/Stat3-luc

Антитело	Коэффициент связывания: нормализованный к неокрашенному образцу каждой клеточной линии			Тип антитела
	HEK293/ Stat3-luc	HEK293/ hLEPR- GPI	HEK293/Stat3-luc hLEPR-FL	
H4N16650P2	6	707	42	Агонистическое
H4N16679P2	8	1078	51	Агонистическое
H4N17319P2	7	1131	47	Агонистическое
H4N17321P2	7	1126	46	Агонистическое
Антитело изотипического контроля	2	2	2	
Вторичное антитело в отдельности	1	1	1	
Неокрашенное	1	1	1	

Пример 7. Антитела к LEPR по настоящему изобретению активируют передачу сигнала посредством LEPR в присутствии или отсутствии лептина.

Разработали биоанализ в целях выявления транскрипционной активности STAT3 в результате активации LEPR с помощью репортерной клеточной линии, которая стабильно экспрессировала полноразмерный LEPR человека (hLEPR; аминокислоты с 1 по 1165 под номером доступа NP_002294.2) совместно с люциферазным репортером (STAT3-Luc; Qiagen, # CLS-6028L) в клеточной линии IMR-32, клеточной линии нейробластомы человека. Образующуюся стабильную клеточную линию, называемую IMR-32/STAT3-Luc/hLEPR, выделяли и поддерживали в среде MEM-Эрла с добавкой 10% FBS, NEAA, 1 мкг/мл пуромидина, 100 мкг/мл гигромицина В и пенициллина/стрептомицина/L-глутамина (полная среда).

Полученный биоанализ использовали для измерения влияния антител к LEPR по настоящему изобретению на передачу сигнала посредством LEPR в присутствии или отсутствии лептина. При применении биоанализа клетки IMR-32/STAT3-Luc/hLEPR помещали в планшет при плотности 20000 клеток/100 мкл/лунку в 96-луночном формате в полной среде, а на следующий день заменяли соответствующим объемом среды Opti-MEM с добавкой 1% BSA и 0,1% FBS (аналитический буфер) в течение 30 мин. Для измерения влияния антител по настоящему изобретению в отсутствие лептина антитела к LEPR или антитела изотипического контроля и лептин человека (hLeptin; R&D Systems, № 398-LP) полулогарифмическим путем серийно разводили до конечных концентраций в диапазоне от 100 нМ до 300 фМ в аналитическом буфере, которые добавляли к клеткам и затем инкубировали в течение ночи при 37°C в 5% CO₂.

Для измерения влияния антител по настоящему изобретению в присутствии лептина фиксированную концентрацию лептина человека при 200 пМ в аналитическом буфере добавляли к клеткам, незамедлительно с последующим добавлением антител к LEPR или антитела изотипического контроля, которые полулогарифмическим путем 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 реагент OneGlo (Promega, № E6051) добавляли к образцам и люциферазную активность измеряли на многоканальном планшет-ридере Envision (Perkin Elmer) в люминесцентном режиме. Получали значения относительных световых единиц (RLU) и результаты анализировали с помощью нелинейной регрессии с применением компьютерной программы GraphPad Prism (GraphPad). Максимальное значение RLU, полученное из кривой доза-эффект для hLeptin определяли в виде 100% активации в анализе IMR-32/STAT3-Luc/hLEPR.

Как показано в табл. 13, в исследовании 1 в отсутствие hLeptin, все из исследуемых антител к LEPR оказывали слабую стимуляцию на клетки IMR-32/STAT3-Luc/hLEPR, при этом значения EC₅₀ находились в диапазоне от 134 пМ до 11,9 нМ, а максимальная активация в диапазоне от 5% до 13% соответственно по отношению к максимальной активации, наблюдаемой из кривой доза-эффект для hLeptin. В исследовании 2 в отсутствие hLeptin, 4 исследуемых антитела к LEPR оказывали стимуляцию на клетки IMR-32/STAT3-Luc/hLEPR, при этом значения EC₅₀ находились в диапазоне от 61,9 до 206,9 пМ, а максимальная активация в диапазоне от 65 до 68% по отношению к максимальной активации, наблюдаемой из кривой доза-эффект для hLeptin. В исследовании 1 в присутствии 200 пМ hLeptin, все из исследуемых

антител к LEPR оказывали стимуляцию на клетки IMR-32/STAT3-Luc/hLEPR, при этом значения EC_{50} находились в диапазоне от 20,2 до 523 пМ, а максимальная активация в диапазоне от 66 до 107% по отношению к максимальной активации, наблюдаемой из кривой доза-эффект для hLeptin. Поскольку эти антитела усиливали индуцированную лептином передачу сигнала посредством LEPR, эти антитела классифицировали в качестве "потенцирующих средств", как определено в настоящем документе. В исследовании 2 в присутствии hLeptin, четыре 200 пМ исследуемых антител к LEPR оказывали стимуляцию на клетки IMR-32/STAT3-Luc/hLEPR, при этом значения EC_{50} находились в диапазоне от 51,9 до 257,3 пМ, а максимальная активация в диапазоне от 76 до 88% по отношению к максимальной активации, наблюдаемой из кривой доза-эффект для hLeptin. Передачу сигнала посредством LEPR ощутимо не усиливали с помощью этих антител в присутствии лептина. Антитело изотипического контроля не оказывало никакой подлежащей измерению стимуляции на клетки IMR-32/STAT3-Luc/hLEPR ни в каком из анализов.

Таблица 13. Активация hLEPR антителами к LEPR

	IMR-32/LEPR без лептина человека		IMR-32/LEPR с 200 пМ лептина человека	
Антитело	EC_{50} (М)	% активации	EC_{50} (М)	% активации
Исследование 1				
H4N18445P2	1,19E-08	5	4,10E-10	97
H4N18446P2	3,73E-10	6	3,42E-11	68
H4N18449P2	2,12E-10	13	5,23E-11	66
H4N18438P2	1,49E-09	5	2,02E-11	76
H4N18482P2	2,69E-10	7	1,69E-10	94
H4N18487P2	8,01E-10	6	4,10E-10	107
H4N18492P2	1,34E-10	5	2,74E-11	94
H4N18417P2	1,53E-10	5	5,23E-10	87
Исследование 2				
H4N16650P2	6,19E-11	68	5,19E-11	88
H4N16679P2	8,62E-11	65	7,37E-11	88
H4N17319P2	1,867E-10	68	1,914E-10	76
H4N17321P2	2,069E-10	66	2,573E-10	76

Пример 8. Антитела к LEPR по настоящему изобретению активируют передачу сигнала в клетках, экспрессирующих мутанты LEPR с дефектом передачи сигнала или с нарушением передачи сигнала.

Идентифицировали мутанты LEPR, которые характеризовались опосредованным лептином дефектом или нарушением передачи сигнала и их ассоциировали с ожирением на ранней стадии. Например, LEPR-A409E представлял собой мутантный белок LEPR с дефектом передачи сигнала, который не передавал сигналы посредством лептина к STAT3; мутант A409E изначально выявляли как моногенную причину ожирения на ранней стадии (Farooqi et al., 2007, N Engl J Med 356(3): 237-247). LEPR-P316T представлял собой мутантный белок LEPR с нарушением передачи сигнала, который также, как было показано, ассоциирован с ожирением на ранней стадии (Mazen et al., 2011, Mol Genet Metab 102:461-464).

В этом примере оценивали способность антител к LEPR по настоящему изобретению стимулировать передачу сигнала посредством LEPR в клеточных линиях, экспрессирующих мутанты LEPR с дефектом передачи сигнала или нарушением передачи сигнала. В частности, конструировали репортерные клеточные линии (HEK293), экспрессирующие либо LEPR дикого типа, либо LEPR-A409E (с дефектом передачи сигнала), либо LEPR-P316T (с нарушением передачи сигнала). Клетки обрабатывали либо только основой, рекомбинантным лептином человека, контрольным IgG либо агонистическими антителами к LEPR по настоящему изобретению (H4N16650 или H4N16679), и определяли степень передачи сигнала посредством LEPR (как измеряется с помощью выявления при вестерн-блоттинге экспрессии pSTAT3-Y705 по отношению к экспрессии STAT3).

Было показано, что агонистические антитела к LEPR по настоящему изобретению (H4N16650 и H4N16679) стимулировали передачу сигнала посредством LEPR в клетках, экспрессирующих мутант LEPR-A409E или мутант LEPR-P316T (как измеряется с помощью экспрессии STAT3) дозозависимым

образом (фиг. 2, панели В и С). В отличие от этого, обработка лептином индуцировала лишь незначительную передачу сигнала в клетках, экспрессирующих мутант LEPR-P316T, и не индуцировала передачу сигнала в клетках, экспрессирующих LEPR-A409E (фиг. 2, панель А). Более того, передачи сигнала посредством LEPR не выявляли ни в какой из клеточных линий, обработанных основной или контрольным антителом IgG (данные не показаны). Другие мутанты LEPR с дефектом передачи сигнала или нарушением передачи сигнала исследовали в этом анализе, но не активировали мутантами к LEPR (данные не показаны), указывая на то, что этот вспомогательный эффект мог быть зависимым от мутантов.

Результаты этого примера указывали на то, что агонистические антитела к LEPR по настоящему изобретению могут быть применимы в лечении заболеваний и нарушений (например, ожирения на ранней стадии), которые вызваны или ассоциированы с мутантами LEPR с дефектом передачи сигнала или нарушением передачи сигнала (например, LEPR-P316T или LEPR-A409E).

Пример 9. Перекрестная конкуренция в Octet между различными моноклональными антителами к LEPR.

Конкуренцию за связывание панели различных моноклональных антител к LEPR определяли с помощью безмаркерного интерферометрического анализа биослоев в реальном времени на биосенсорной платформе Octet HTX (Pall ForteBio Corp.). Весь эксперимент выполняли при 25°C в буфере, содержащем 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA и 0,05 об.% поверхностно-активного вещества Tween-20, 1 мг/мл BSA, pH 7,4 (HBS-EBT) при встряхивании планшета со скоростью 1000 об/мин. Для оценки того, способны ли два антитела конкурировать друг с другом за связывание со своими соответствующими эпитопами на рекомбинантном LEPR человека, экспрессируемом с С-концевой гексагистидиновой меткой мус-мус (hLEPR.mmh; SEQ ID NO: 114), около 0,25 нм или 0,34 нм hLEPR-ММН сначала захватывали на биосенсорные кончики Octet, покрытые антителом к пента-His (ForteBio Inc, № 18-5122) в результате погружения биосенсорных кончиков в течение 5 мин в лунки, содержащие 20 мкг/мл hLEPR-ММН. Биосенсорные кончики с захваченным антигеном затем насыщали первым моноклональным антителом к LEPR (впоследствии называемым mAb-1) погружением в лунки, содержащие 50 мкг/мл раствора mAb-1 в течение 210 с. Затем биосенсорные кончики погружали в лунки, содержащие 50 мкг/мл раствора второго моноклонального антитела к LEPR (впоследствии называемого mAb-2) в течение 150 с. Биосенсорные кончики промывали в буфере HBS-EBT в промежутке между каждой стадией эксперимента. Ответ при связывании в реальном времени контролировали в течение всего хода эксперимента и ответ при связывании в конце каждой стадии фиксировали. Ответ при связывании mAb-2 с hLEPR-ММН, предварительно образующим комплекс с mAb-1, сравнивали и конкурентное/неконкурентное поведение моноклональных антител к LEPR определяли, как показано в табл. 14 и 15.

Таблица 14. Перекрестная конкуренция между различными моноклональными антителами к LEPR

Связывание первого антитела (mAb-1) с захваченным hLEPR-ММН	Второе антитело (mAb-2), конкурирующее с mAb-1
H4H18492P2	H4H18417P2
	H4H18438P2
H4H18417P2	H4H18492P2
	H4H18438P2
H4H18438P2	H4H18492P2
	H4H18417P2
H4H16650P2	H4H16679P2
H4H16679P2	H4H16650P2
H4H18445P2	H4H18482P2
	H4H18487P2
	H4H18446P2
H4H18446P2	H4H18482P2
	H4H18487P2
	H4H18445P2
H4H18482P2	H4H18445P2
	H4H18487P2
H4H18487P2	H4H18445P2
	H4H18482P2
H4H18449P2	Отсутствует
Антитело сравнения	Отсутствует

Таблица 15. Перекрестная конкуренция между различными моноклональными антителами к LEPR

mAb-1	mAb-2, которое конкурирует с mAb-1
H4H17319P2	H4H17321P2
	H4H16650P2
	H4H16679P2
H4H17321P2	H4H17319P2
	H4H16650P2
	H4H16679P2
H4H16650P2	H4H17319P2
	H4H17321P2
	H4H16679P2
H4H16679P2	H4H17319P2
	H4H17321P2
	H4H16650P2

Пример 10. Эффективность *in vivo* агонистических антител к LEPR H4N16650P2, H4N16679P2, H4N17319P2 и H4N17321P2 в индуцибельной мышинной модели недостаточности лептина.

Эффекты четырех специфических агонистических антител к LEPR по настоящему изобретению, H4N16650P2, H4N16679P2, H4N17319P2 и H4N17321P2, на потребление пищи, массу тела и отложение жира определяли в индуцибельной модели недостаточности лептина у генетически сконструированных мышей LEPR^{Hu/Hu}, которые экспрессировали лептиновый рецептор, который состоит из последовательности эктодомена LEPR человека вместо мышинной последовательности эктодомена LEPR. Модель недостаточности лептина индуцировали с помощью гидродинамической доставки ДНК (HDD) плазмиды, кодирующей hFc-меченый эктодомен LEPR мыши (называемый в настоящем документе mLEPR.hFc или "лептиновая ловушка"; SEQ ID NO: 120). Лептиновая ловушка при экспрессии секретировалась и связывала циркулирующий лептин. После HDD 50 мкг конструкции ДНК, кодирующей лептиновую ловушку, мыши характеризовались повышенным потреблением пищи, повышенным отложением жира и массой тела.

Суточное потребление пищи на исходном уровне измеряли между 7-м и 4-м днями перед введением лептиновой ловушки (-7-й и -4-й дни). На 0-й день, 35 самцов мышей LEPR^{Hu/Hu} в возрасте от 13 до 17 недель успешно подвергали воздействию HDD с лептиновой ловушкой. На 6-й и 13-й дни после HDD собирали образцы крови из ретроорбитального синуса и состав тела, в том числе отложение жира, определяли количественно с помощью μ СТ. На 7-й день после HDD мышей рандомизировали в 5 групп по 7 мышей на основе процента изменения массы тела начиная с 0-го дня. Каждая группа получала посредством подкожной инъекции либо однократную дозы антитела изотипического контроля при 3 мг/кг, либо H4N16650P2 при 3 мг/кг, либо H4N16679P2 при 3 мг/кг, либо H4N17319P2 при 3 мг/кг, либо H4N17321P2 при 3 мг/кг. Антитело изотипического контроля не связывало никакого известного белка мыши. Потребление пищи и массу тела измеряли для каждого животного во время исследования. На фиг. 3 обобщено среднее суточное потребление пищи для каждой группы обработки. На фиг. 3 пунктирная линия представляет среднее потребление пищи на исходном уровне перед инъекцией в виде HDD. Процентное изменение массы тела от 0-го дня рассчитывали для каждого животного в каждой временной точке. На фиг. 4 обобщен средний процент изменения массы тела для животных в каждой группе обработки антителами. На фиг. 5 обобщена средняя масса жировой ткани для животных в каждой группе обработки, определенная количественно с помощью μ СТ за 1 день до и через 6 дней после обработки антителами. Все результаты выражали в виде среднего $\pm$ SEM.

Как показано на фиг. 3 и 4, после HDD лептиновой ловушкой аналогичные повышения потребления пищи и процента изменения массы тела наблюдали в группах мышей перед обработкой антителами. Как показано на фиг. 3, мыши, обработанные антителами H4N16650P2 или H4N16679P2 при 3 мг/кг, характеризовались значимыми снижениями потребления пищи через один день после обработки антителами (8-й день после HDD) и в последующие временные точки, измеренные по сравнению с мышами, которым вводили инъекцию антитела изотипического контроля. Мыши, обработанные антителами H4N17319P2 или H4N17321P2 при 3 мг/кг, характеризовались значимым снижением потребления пищи через два дня после обработки антителами (9-й день после HDD) и в другие последующие временные точки, измеренные по сравнению с мышами, которым вводили инъекцию антитела изотипического контроля. Как показано на фиг. 4, мыши, обработанные антителом H4N16650P2 при 3 мг/кг, характеризовались значимым снижением процента изменения массы тела через один день после обработки антителами (8-й день после HDD) и в другие последующие временные точки, измеренные по сравнению с мышами, которым вводили инъекцию антитела изотипического контроля. Через один день после обработки антителами, на 8-й день, мыши, обработанные изотипическим контролем, характеризовались повышением массы тела на $21,16 \pm 1,27\%$ начиная с 0-го дня, в то время как мыши, обработанные H4N16650P2, характеризовались повышением массы тела на $15,57 \pm 0,9\%$ начиная с 0-го дня. Мыши, обработанные антителами H4N16679P2, H4N17319P2 или H4N17321P2 при 3 мг/кг, характеризовались значимым снижением процента изменения массы тела через два дня после обработки антителами (9-й день после HDD) и в другие последующие временные точки, измеренные по сравнению с мышами, которым вводили инъекцию антитела изотипического контроля.

На 9-й день % изменений массы тела начиная с 0-го дня составлял $23,18 \pm 1,22$, $13,17 \pm 1,05$, $12,95 \pm 1,26$, $15,98 \pm 1,78$ и $15,83 \pm 2,01$ в случае мышей, обработанных изотипическим контролем, H4N16650P2, H4N16679P2, H4N17319P2 или H4N17321P2 соответственно. Как показано на фиг. 5, мыши, обработанные изотипическим контролем при 3 мг/кг, характеризовались значимым повышением массы жировой ткани через 6 дней после обработки антителами (13-й день после HDD) по сравнению с 1-м днем до обработки антителами (6-й день после HDD). Мыши, обработанные антителами H4N16650P2, H4N16679P2, H4N17319P2 или H4N17321P2 при 3 мг/кг не прибавляли в массе жировой ткани после обработки антителами по сравнению с предварительной обработкой антителами. Через 6 дней после обработки (13-й день после HDD) мыши, обработанные антителами H4N16650P2, H4N16679P2 или H4N17319P2 при 3 мг/кг, характеризовались значимыми снижениями массы жировой ткани по сравнению с мышами, обработанными антителом изотипического контроля при 3 мг/кг.

Пример 11. Картирование эпитопов при связывании H4N16650P2 с лептиновым рецептором человека (hLEPR.mmh) с помощью водородно-дейтериевого обмена.

Эксперименты проводили в целях определения аминокислотных остатков hLEPR.mmh (аминокислоты M1-D839 SEQ ID NO: 114), с которыми взаимодействует H4N16650P2. Для этой цели проводили картирование эпитопов масс-спектрометрией с помощью H/D обмена. Общее описание способа H/D обмена изложено, например, в Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267(2):252-259; и Engen and Smith (2001) *Anal. Chem.* 73:256A-265A.

Экспериментальная процедура.

Эксперименты HDX-MS выполняли на интегрированной платформе Waters HDX/MS, состоящей из системы HDX PAL Leptec для мечения дейтерием, Acquity M-Class Waters (вспомогательное устройство для растворителей) для переваривания и загрузки образцов, Acquity M-Class Waters (устройство для растворителей μ Binary) для аналитического градиента колонки и масс-спектрометра Synapt G2-Si для измерения массы пептидов после пептического гидролиза.

Метящий раствор получали в 10 mM PBS буфере в D₂O при pD 7,0 (эквивалент pH 6,6). Для мечения дейтерия 3,8 мкл hLEPR.mmh (8 пмоль/мкл) или hLEPR.mmh, предварительно смешанного с антителом в молярном соотношении 2:1, инкубировали с 56,2 мкл D₂O метящего раствора в течение различных временных точек (например, недейтерированный контроль = 0 с, меченый в течение 1 мин и 20 мин). Дейтерирование останавливали в результате переноса 50 мкл образца к 50 мкл предварительно охлажденного охлаждающего буфера (0,2 M TCEP, 6 M гуанидина хлорида в 100 mM фосфатного буфера, pH 2,5) и смешанный образец инкубировали при 1,0°C в течение двух минут. Образец с приостановленной реакцией затем вводили в устройство HDX Waters для онлайн переваривания пепсином/протеазой XIII. Переваренные пептиды захватывали на предварительную колонку VanGuard ACQUITY UPLC BEH C18 1,7-мкм, 2,1×5 мм, при 0°C и элюировали в аналитическую колонку ACQUITY UPLC BEH C18 1,7-мкм, 1,0×50 мм, в течение 9-минутного градиентного разделения 5-40% В (подвижная фаза А: 0,1% муравьиная кислота в воде, подвижная фаза В: 0,1% муравьиная кислота в ацетонитриле). Масс-спектрометр устанавливали при напряжении на конусе, составляющем 37 В, времени сканирования, составляющем 0,5 секунд, и диапазоне масса/заряд, составляющем 50-1700 Th.

Для идентификации пептидов из LEPR человека данные LC-MSE, полученные на основе недейтерированного образца, обрабатывали и проводили поиск по отношению к базе данных, в том числе LEPR человека, пепсина и других рандомизированных последовательностей с помощью компьютерной программы Waters ProteinLynx Global Server (PLGS). Идентифицированные пептиды импортировали в компьютерную программу DynamX и фильтровали с помощью двух критериев: 1) минимальные продукты на аминокислоту: 0,2, и 2) предел повтора в файле: 3. Компьютерная программа DynamX затем автоматически определяла захват каждого пептида на основе времени удерживания и высокой точности массы (<10 ppm) во многих временных точках с 3 повторами в каждое время.

Результаты. С помощью онлайн колонки пепсин/протеаза XIII с получением данных MS^E, всего 201 пептид от LEPR воспроизводимо идентифицировали при отсутствии или присутствии антитела, представляющего 70% охват последовательности. Пять пептидов характеризовались значимо сниженным захватом дейтерия (центроидные дельта-значения > 0,4 дальтон при р-значениях < 0,05) при связывании с H4N16650P2, как показано в табл. 16. Зафиксированная масса пептидов соответствовала среднему значению центроидной MH⁺ массы из трех повторов. Эти пептиды, соответствующие аминокислотам 162-169 (аминокислоты LYVLPEVL LEPR человека; SEQ ID NO: 113), и аминокислотам 170-181 (аминокислоты EDSPLVPQKGSF LEPR человека; SEQ ID NO: 113), характеризовались более медленной скоростью дейтеризации при связывании с H4N16650P2. Эти идентифицированные остатки также соответствовали остатками аминокислот 162-169 и 170-181 LEPR человека, как определено с помощью входного значения в Uniprot P48357 (SEQ ID NO: 113; лептиновый рецептор человека).

Таблица 16. Пептиды лептинового рецептора человека со значительной защитой при связывании с антителом H4N16650P2

Остатки	Дейтерирование в течение 1 минуты			Дейтерирование в течение 20 минут		
	hLEPR.m mh	hLEPR.mmh + H4N16650P2	Δ	hLEPR.mmh	hLEPR.mmh + H4N16650P2	Δ
162-169	949,03±0,03	947,99±0,02	-1,04	949,23±0,02	948,16±0,02	-1,03
163-169	835,82±0,03	834,79±0,02	-1,03	836,03±0,02	834,94±0,02	-1,08
170-181	1310,02±0,05	1309,12±0,03	-0,89	1309,77±0,02	1309,38±0,02	-0,39

Пример 12. Исследование эффективности *in vivo* потенцирующих антител к LEPR у мышей с гуманизированным LEPR.

Эффекты трех специфических потенцирующих антител к LEPR по настоящему изобретению, H4N18482P2, H4N18487P2 и H4N18492P2, на массу тела и отложение жира определяли у содержащихся по одной генетически сконструированных мышей LEPR^{Hu/Hu}, которые экспрессировали лептиновый ре-

цептор, который состоял из последовательности эктодомена LEPR человека вместо мышинной последовательности эктодомена LEPR (mLEPR.hFc, SEQ ID NO: 120).

На -19-й день состав тела, в том числе отложение жира, определяли количественно с помощью μ СТ. На 0-й день 48 самок мышей LEPR^{Hu/Hu} в возрасте от 14 до 16 недель рандомизировали на четыре группы по 12 мышей на основании массы тела. На 0-й и 11-й дни мыши из каждой группы получали посредством подкожной инъекции однократную дозу антитела изотипического контроля при 30 мг/кг, H4N18482P2 при 30 мг/кг, H4N18487P2 при 30 мг/кг или H4N18492P2 при 30 мг/кг. Антитело изотипического контроля не связывало никакого известного белка мыши. Массу тела измеряли во время исследования для каждого животного. Процентное изменение массы тела от 0-го дня рассчитывали для каждого животного в каждой временной точке. На фиг. 6 обобщен средний процент изменения массы тела для животных в каждой группе обработки. На фиг. 6 обобщена средняя масса жировой ткани для животных в каждой группе обработки, определенная количественно с помощью μ СТ за 19 дней до и через 11 дней после обработки антителами. Все результаты выражали в виде среднего $\pm$ SEM.

Как показано на фиг. 6, снижение процентного изменения массы тела наблюдали после введения потенцирующих антител к LEPR, но не антитела изотипического контроля. Как показано на фиг. 6, мыши, обработанные H4N18482P2 при 30 мг/кг, характеризовались значимым снижением процента изменения массы тела начиная через два дня после обработки (2-й день) и в другие временные точки по сравнению с мышами, которым вводили инъекцию антитела изотипического контроля. Мыши, обработанные H4N18487P2 при 30 мг/кг, характеризовались значимым снижением процента изменения массы тела начиная со 2-го дня и в другие временные точки по сравнению с мышами, которым вводили инъекцию антитела изотипического контроля. Мыши, обработанные H4N18492P2 при 30 мг/кг, характеризовались снижением процента изменения массы тела на 4-й, 5-й и 17-й дни, но не в другие временные точки по сравнению с мышами, которым вводили инъекцию антитела изотипического контроля. Мыши, обработанные H4N18482P2 при 30 мг/кг, характеризовались значимым снижением процента изменения массы тела начиная с 6-го дня и в последующие дни, но не на 7-й, 14-й и 17-й дни по сравнению с мышами, которым вводили инъекцию H4N18492P2. Мыши, обработанные H4N18487P2 при 30 мг/кг, характеризовались значимым снижением процента изменения массы тела начиная с 3-го дня и в другие временные точки, но не на 4-й и 5-й дни по сравнению с мышами, которым вводили инъекцию H4N18492P2.

Как показано на фиг. 7A, различия в массе жировой ткани между группами до лечения отсутствовали (-19-й день). Как показано на фиг. 7B, мыши, обработанные антителами H4N18482 и H4N18487, но не H4N18492, при 30 мг/кг характеризовались статистически значимым снижением массы жировой ткани через 17 дней после обработки (12-й день) по сравнению с антителом изотипического контроля.

Настоящее изобретение не ограничено по объему конкретными вариантами осуществления, описанными в настоящем документе. Действительно, различные модификации настоящего изобретения, кроме описанных в настоящем документе, будут очевидны специалистам в данной области из вышеизложенного описания и сопровождающих фигур. Такие модификации входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

Пример 13. Влияние антител к LEPR по настоящему изобретению на передачу сигнального пути посредством LEPR обезьяны.

В целях оценки транскрипционной активности лептинового рецептора обезьяны разрабатывали стабильную клеточную линию. Клетки IMR-32 (ATCC нейробластомы человека) получали в целях стабильной экспрессии внеклеточного домена LEPR *Macaca fascicularis* (MfLEPR; аминокислоты с 22 по 837 с номером доступа XP_005543194.1, при этом треонин в положении 827 заменен на аланин), слитого с трансмембранным и цитозольным доменами LEPR человека (hLEPR; аминокислоты с 840 по 1165 с номером доступа NP_002294.2) совместно с люциферазным репортером (STAT3-Luc; SABiosciences, № CLS-6028L). Полученную клеточную линию, называемую далее в настоящем документе IMR-32/STAT3-Luc/MfLEPR, выделяли и поддерживали в среде MEM-Эрла с добавкой 10% FBS, NEAA, 1 мкг/мл пурамицина, 100 мкг/мл гидромицина В и пенициллина/стрептомицина/L-глутамин.

Биоанализ выполняли в целях измерения влияния антител к LEPR по настоящему изобретению на передачу сигнала с помощью LEPR обезьяны при отсутствии лептина. При выполнении анализа клетки IMR-32/STAT3-Luc/MfLEPR помещали на планшет по 10000 клеток/лунку в 96-луночный планшет в 0,1% FBS в OptiMem с пенициллином/стрептомицином (аналитический буфер) и инкубировали в течение ночи при 37°C в 5% CO₂. На следующий день лептин человека (hLeptin), антитела к LEPR или антитело изотипического контроля серийно разводили от 50 нМ до 0,8 пМ в аналитическом буфере (совместно с образцом, содержащим буфер в отдельности без исследуемой молекулы) и добавляли к клеткам. Через 5,5 ч при 37°C в 5% CO₂ люциферазную активность измеряли с помощью реагента OneGlo™ (Promega, № E6031) и многоканального планшет-ридера Victor™ X (Perkin Elmer). Результаты анализировали с помощью нелинейной регрессии (4-параметрическая логистика) с помощью компьютерной программы Prism™6 (GraphPad) с получением значений EC₅₀. Процент активации антител рассчитывали в виде максимального диапазона RLU, достигаемого антителом по отношению к максимальному диапазону RLU, достигаемому hLeptin.

Как показано в табл. 17, при отсутствии hLeptin все из исследуемых антител к LEPR характеризовались активацией передачи сигнала посредством LEPR обезьяны в клетках IMR-32/STAT3-Luc/mfLEPR со значениями EC_{50} в диапазоне от 266 до 368 пМ и максимальной активацией в диапазоне от 76 до 82%, при этом 100% активацию получали в результате действия hLeptin. hLeptin активировал при значении EC_{50} , составляющем 333 пМ. Антитело изотипического контроля не характеризовалось никакой подлежащей измерению стимуляцией клеток IMR-32/STAT3-Luc/mfLEPR.

Таблица 17. Активация LEPR *Macaca fascicularis* антителами к LEPR

Лептин или антитело	EC_{50} (М)	% активации
Лептин человека	3,33E-11	100
H4H16650P2	2,66E-10	82
H4H16679P2	2,49E-10	80
H4H17319P2	3,65E-10	76
H4H17321P2	3,68E-10	78
Антитело изотипического контроля	Без активации	Без активации

Пример 14. Связывание эпитопа с полноразмерным внеклеточным доменом LEPR человека с помощью сигнала MFI в Luminescence.

В целях определения эпитопа LEPR человека, с которыми антитела к LEPR по настоящему изобретению связываются, анализ на основе проточной цитометрии FLEXMAP Luminescence (FM3DD, LuminescenceCorp) использовали для характеристики взаимодействия антител к LEPR с белковыми доменами рекомбинантных LEPR человека. Для анализа примерно 3 миллиона карбоксилированных микросфер Microplex^R (Luminescence, № по каталогу LC1000A) промывали, перемешивали на вортексе и разрушали ультразвуком в 0,1 М NaPO₄, pH 6,2 (активационный буфер) и затем центрифугировали с удалением супернатанта. Микросферы ресуспендировали в 120 мкл активационного буфера и карбоксилатные группы (-COOH) активировали в результате добавления 15 мкл 50 мг/мл N-гидроксисукцинимид (NHS, Thermo Scientific, № по каталогу 24500) с последующим добавлением 15 мкл 50 мг/мл 1-этил-3-[3-диметиламинопропил]карбодиимида (EDC, ThermoScientific, № по каталогу 22980) при 25°C. Через 10 мин значение pH реакционной смеси снижали до 5,0 в результате добавления 600 мкл 50 мМ MES, pH 5 (связывающий буфер), микросферы перемешивали на вортексе и центрифугировали с удалением супернатанта. Активированные гранулы незамедлительно смешивали с 500 мкл 20 мг/мл моноклональных антител к мус либо с мышиным IgG либо с IgG человека в связывающем буфере и инкубировали в течение 2 ч при 25°C. Реакцию связывания останавливали в результате добавления 50 мкл 1 М Трис-HCl, pH 8,0, и микросферы быстро перемешивали на вортексе, центрифугировали и промывали четыре раза 1 мл DPBS с удалением несвязанных белков и других компонентов реакционной смеси.

Транзиентно экспрессируемые белки LEPR, в том числе внеклеточный домен LEPR человека, экспрессируемый с С-концевой гексагистидиновой меткой мус-мус (LEPR человека-ММН, SEQ ID NO: 113), CRH1 (D1) LEPR человека, экспрессируемый с С-концевой гексагистидиновой меткой мус-мус (CRH1 (D1) LEPR человека-ММН, аминокислоты 1-208 SEQ ID NO: 113 с гексагистидиновой меткой мус-мус, аминокислоты 209-236), домен CRH1 (D1,D2) LEPR человека, экспрессируемый с С-концевой гексагистидиновой меткой мус-мус (CRH1 (D1,D2) LEPR человека-ММН, аминокислоты 1-318 SEQ ID NO: 113 с гексагистидиновой меткой мус-мус, аминокислоты 319-346), домен CRH1 (D1,D2,D3) LEPR человека-Ig, экспрессируемый с С-концевой гексагистидиновой меткой мус-мус (CRH1 (D1,D2,D3) LEPR человека-ММН, аминокислоты 1-278 SEQ ID NO: 113 с гексагистидиновой меткой мус-мус, аминокислоты 279-306), домен CRH1 (D2,D3) LEPR человека-Ig, экспрессируемый с С-концевой гексагистидиновой меткой мус-мус (CRH1 (D2,D3) LEPR человека-ММН-Ig, аминокислоты 1-198 SEQ ID NO: 113 с гексагистидиновой меткой мус-мус, аминокислоты 199-226), домен LEPR человека (D3)-Ig, экспрессируемый с С-концевой гексагистидиновой меткой мус-мус (LEPR (D3) человека-ММН-Ig, аминокислоты 1-88 SEQ ID NO: 113 с гексагистидиновой меткой мус-мус, аминокислоты 89-116), домен CRH2 LEPR человека, экспрессируемый с С-концевой гексагистидиновой меткой мус-мус (CRH2 LEPR человека-ММН, аминокислоты 1-207 SEQ ID NO: 113 с гексагистидиновой меткой мус-мус, аминокислоты 208-235), домен FNIII LEPR человека, экспрессируемый с С-концевой гексагистидиновой меткой мус-мус (FNIII LEPR человека-ММН, аминокислоты 1-204 SEQ ID NO: 113 с гексагистидиновой меткой мус-мус, аминокислоты 205-232), и домен CRH2-FNIII LEPR человека-Ig, экспрессируемый с С-концевой гексагистидиновой меткой мус-мус (CRH2-FNIII LEPR человека-ММН-Ig, аминокислоты 1-510 SEQ ID NO: 113 с гексагистидиновой меткой мус-мус, аминокислоты 511-538) суспендировали в бессывороточной среде CHO-S-SFM II (Thermo Fisher, № по каталогу 31033020) и затем очищали с помощью центрифугирования. Аликвоты микросфер с иммобилизованными моноклональными антителами к мус, полученными,

как описано выше, добавляли отдельно к 1 мл каждого из этих супернатантов белка. Микросферы осторожно смешивали, инкубировали в течение двух часов при 25°C, промывали дважды 1 мл DBPS, центрифугировали с удалением супернатанта и ресуспендировали в 1 мл буфера DPBS. 48 мкл микросфер со связанным IgG к тус из отдельных реакционных смесей с полноразмерными LEPR человека и с каждым из доменных белков LEPR человека извлекали 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 помещали в лунку 96-луночного фильтровального планшета (Millipore, № 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 промывали дважды 200 мкл DPBS с 0,05% Tween 20 (отмывочный буфер). Для выявления и количественного определения содержания связанных антител к LEPR с отдельными микросферами либо 100 мкл 2,5 мкг/мл конъюгированного с R-фигоэритрином козьего F(ab')₂ к человеческой каппа-цепи (Southern Biotech, № по каталогу 2063-09) в блокирующем буфере либо 100 мкл 1,25 мкг/мл конъюгированного с R-фигоэритрином AffiniPure козьего F(ab')₂-фрагмента к мышиному IgG, специфического по отношению к F(ab')₂-фрагменту (Jackson Immunoresearch, № по каталогу 115-116-072), в блокирующем буфере добавляли и инкубировали в течение 30 мин при 25°C. Через 30 мин образцы промывали дважды 200 мкл отмывочного буфера и ресуспендировали в 150 мкл отмывочного буфера. Среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) микросфер измеряли в анализаторе Luminex.

Таблица 18. Сигнал MFI в Luminex при связывании антител к LEPR с захваченным меткой тус полноразмерным внеклеточным доменом LEPR человека и выделенными доменами LEPR человека

Антитело	CRH 1 (D1)	CRH1 (D1,D 2)	CRH1-Ig (D1,D2,D 3)	CRH1-Ig (D2,D3)	Ig (D3)	CR H2	FNIII	Ig-CRH2-FNIII	Полнораз мерный внеклето чный домен	Вероятный участок связывани я
H4H18445 P2	12	30	22	40	19	17	230	14544	6573	FNIII
H4H18446 P2	17	682	205	645	25	65	32	16852	10536	Ig-CRH2-FNIII
H4H18482 P2	13	40	21	52	27	23	167	15316	7311	Ig-CRH2-FNIII
H4H18487 P2	12	51	29	62	22	27	174	16320	7329	Ig-CRH2-FNIII
H4H18417 P2	10	16048	3334	5502	17	39	14	37	4887	CRH1 D2
H4H18438 P2	13	18931	6572	8884	30	165	25	468	6251	CRH1 D2
H4H18492 P2	11	19371	6354	8685	19	18	16	186	6382	CRH1 D2
H4H18449 P2	20	2934	2056	42	24	15	13	43	7976	CRH1(D1-2)
H4H16650 P2	8	4722	2562	74	10	16	6	110	7603	CRH1(D1-2)
H4H16679 P2	12	4388	2797	34	14	33	10	42	7507	CRH1(D1-2)
H4H17319 P2	8	1246	938	14	8	91	20	8	3305	CRH1(D1-2)
H4H17321 P2	9	2649	1752	15	7	116	40	14	4696	CRH1(D1-2)
mAb сравнения	-14	19	-57	27	10	9404	73	7112	3908	CRH2

Результаты анализа на основе Lumindex представлены в табличном виде в табл. 18. Интенсивности сигналов MF1 в Lumindex указывали на то, что двенадцать антител к LEPR по настоящему изобретению связывались с полным внеклеточным доменом LEPR человека. Антитела к LEPR H4H18417P2, H4H18438P2 и H4H18492P2 связывались с эпитопами в домене CRH1 D2 LEPR человека. Антитела к LEPR H4H18449P2, H4H16650P и H4H16679P связывались с доменом CRH1(D1-2) LEPR человека. mAB сравнения антитела к LEPR связывалось с эпитопами в домене CRH2 LEPR человека. Антитело к LEPR H4H18445P2 связывалось с эпитопами в домене FNIII LEPR человека. Антитела к LEPR H4H18446P2, H4H18482P2 и H4H18487P2 связывались с доменом Ig-CRH2-FNIII LEPR человека.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывает лептиновый рецептор человека (LEPR) и активирует передачу сигнала посредством LEPR, которое содержит

вариабельный участок легкой цепи, содержащий определяющие комплементарность области (CDR) легкой цепи вариабельного участка легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 10; и

вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий CDRs тяжелой цепи вариабельного участка тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 26 или SEQ ID NO: 34.

2. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(i) вариабельный участок легкой цепи, который содержит LCDR1, которая содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 12; LCDR2, которая содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 14; и LCDR3, которая содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 16; и

(ii) вариабельный участок тяжелой цепи, который содержит HCDR1, которая содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 4; HCDR2, которая содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 6; и HCDR3, которая содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 8; или

вариабельный участок тяжелой цепи, который содержит HCDR1, которая содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 20; HCDR2, которая содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 22; и HCDR3, которая содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 24; или

вариабельный участок тяжелой цепи, который содержит HCDR1, которая содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 28; HCDR2, которая содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 30; и HCDR3, которая содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 32; или

вариабельный участок тяжелой цепи, который содержит HCDR1, которая содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 36; HCDR2, которая содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 38; и HCDR3, которая содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 40.

3. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1 или 2, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит

вариабельный участок легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 10; и

вариабельный участок тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 26 или SEQ ID NO: 34.

4. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит

вариабельный участок легкой цепи, содержащий определяющие комплементарность области легкой цепи вариабельного участка легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 10; и

вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий определяющие комплементарность области тяжелой цепи вариабельного участка тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 26.

5. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывает лептиновый рецептор человека (LEPR), где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит

вариабельный участок легкой цепи, который содержит LCDR1, которая содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 12; LCDR2, которая содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 14; и LCDR3, которая содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 16; и

вариабельный участок тяжелой цепи, который содержит HCDR1, которая содержит аминокислот-

ную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 28; HCDR2, которая содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 30; и HCDR3, которая содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 32.

6. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывает лептиновый рецептор человека (LEPR), где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит

вариабельный участок легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 10; и

вариабельный участок тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 26.

7. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-6, где вариабельный участок тяжелой цепи связан с константным доменом тяжелой цепи IgG1 человека, а вариабельный участок легкой цепи связан с константным доменом легкой цепи каппа человека.

8. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-6, где вариабельный участок тяжелой цепи связан с константным доменом тяжелой цепи IgG4 человека, а вариабельный участок легкой цепи связан с константным доменом легкой цепи каппа человека.

9. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.6, которое представляет собой полноразмерное антитело, содержащее две тяжелые цепи, содержащие указанный вариабельный участок тяжелой цепи, и две легкие цепи, содержащие указанный вариабельный участок легкой цепи, соединенные между собой дисульфидными связями.

10. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.6, где антитело представляет собой рекомбинантное человеческое антитело.

11. Фармацевтическая композиция для лечения заболевания или состояния, ассоциированного с или вызванного недостаточностью лептина или устойчивостью к лептину, или для лечения заболевания или состояния, ассоциированного с мутацией LEPR в результате дефекта передачи сигнала или нарушения передачи сигнала или вызванного таковой, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-10 и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

12. Способ лечения заболевания или состояния, ассоциированного с или вызванного недостаточностью лептина или устойчивостью к лептину, при этом способ предусматривает введение фармацевтической композиции по п.11 субъекту, нуждающемуся в этом.

13. Способ по п.12, где заболевание или состояние, ассоциированное с или вызванное недостаточностью лептина или устойчивостью к лептину, выбирают из группы, состоящей из липодистрофии, ожирения, метаболического синдрома, вызванной диетой тяги к определенному виду пищи, функциональной гипоталамической аменореи, диабета 1 типа, диабета 2 типа, устойчивости к инсулину, тяжелой устойчивости к инсулину в результате мутации инсулинового рецептора, болезни Альцгеймера, недостаточности лептина, устойчивости к лептину, лепречаунизма/синдрома Донохью и синдрома Рабсона-Менденхолла.

14. Способ лечения липодистрофического состояния у пациента, при этом способ предусматривает введение фармацевтической композиции по п.11 пациенту, нуждающемуся в этом, где липодистрофическое состояние выбирают из группы, состоящей из врожденной генерализованной липодистрофии, приобретенной генерализованной липодистрофии, семейной парциальной липодистрофии, приобретенной парциальной липодистрофии, центрифужной абдоминальной липодистрофии, кольцевидной липоатрофии, локализованной липодистрофии и ВИЧ-ассоциированной липодистрофии.

15. Способ лечения заболевания или состояния, ассоциированного с мутацией LEPR в результате дефекта передачи сигнала или нарушения передачи сигнала или вызванного таковой, при этом способ предусматривает введение фармацевтической композиции по п.11 субъекту, нуждающемуся в этом.

16. Способ по п.15, где мутация LEPR в результате дефекта передачи сигнала или нарушения передачи сигнала представляет собой LEPR-A409E или LEPR-P316T.

17. Способ по п.15 или 16, где заболевание или состояние, ассоциированное с или вызванное мутацией LEPR в результате дефекта передачи сигнала или нарушения передачи сигнала, представляет собой ожирение на ранней стадии.

18. Способ по любому из пп.12-17, дополнительно предусматривающий введение второго терапевтического средства субъекту, где второе терапевтическое средство выбирают из группы, состоящей из рекомбинантного лептина человека, ингибитора PCSK9, статина, эзетимиба, инсулина, варианта инсулина, секретогена инсулина, метформина, сульфонилмочевины, ингибитора натрий-глюкозного котранспортера 2 (SGLT2), агониста/аналога GLP-1, ингибитора глюкагона (GCG), ингибитора глюкагонового рецептора (GCGR), ингибитора ангиопоэтин-подобного белка (ANGPTL), фентермина, орлистата, топирамата, бупропиона, топирамата/фентермина, бупропиона/налтрексона, бупропиона/зонизамида, прамлинтида/метрелептина, лоркасерина, цетилистата, тезофензина и велнеперита.

19. Шприц-ручка для доставки антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-10, содержащая фармацевтическую композицию по п.11.

20. Комбинация, содержащая выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент со вторым терапевтическим средством для лечения заболевания или состояния, ассоциированного с мутацией

LEPR в результате дефекта передачи сигнала или нарушения передачи сигнала или вызванного таковой, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывает LEPR человека и содержит
 переменный участок легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 10; и

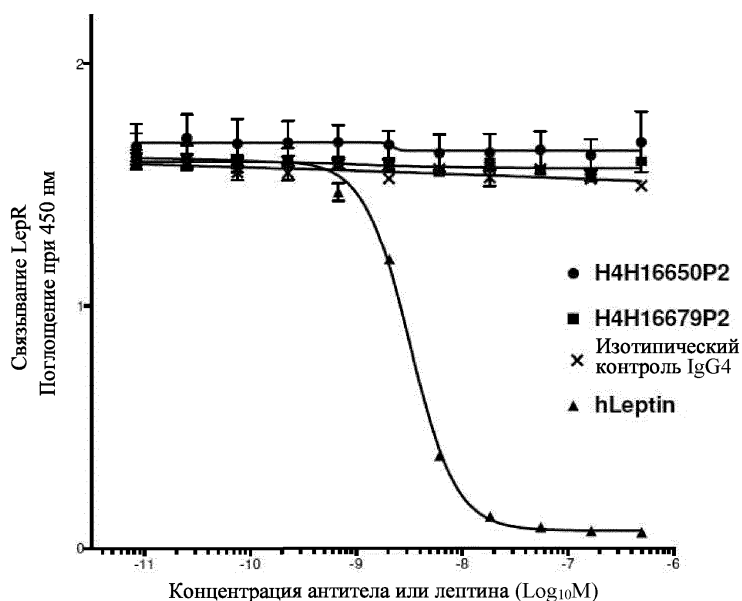
переменный участок тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 26.

21. Биспецифическое антитело, содержащее одно плечо, которое связывает лептиновый рецептор человека (LEPR), где одно плечо биспецифического антитела содержит

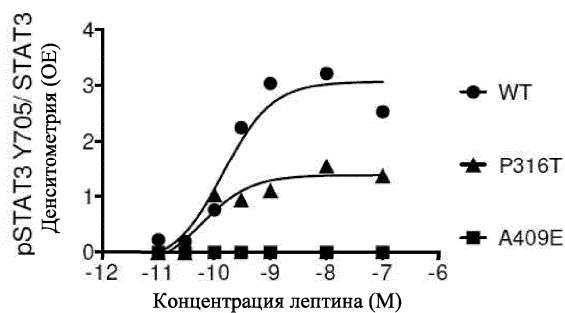
переменный участок легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 10; и

переменный участок тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 26.

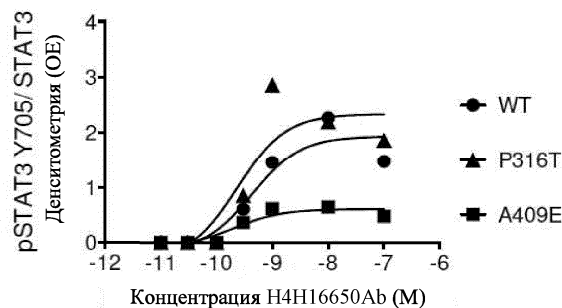
Блокирование связывания 10 нМ hLEPR ecto-hFc с hLeptin



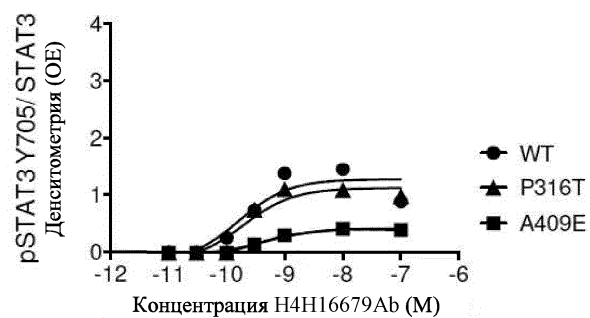
Фиг. 1



Фиг. 2А

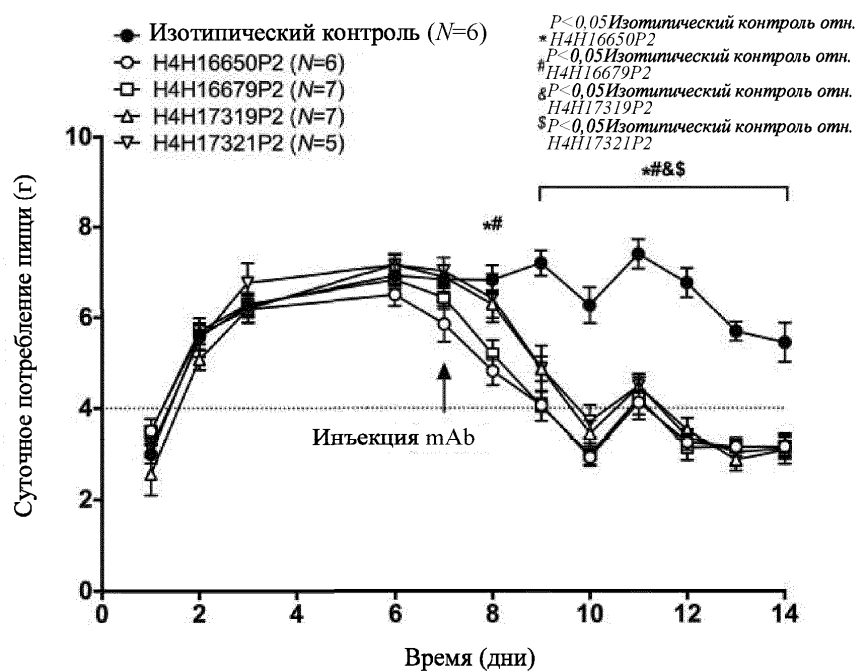


Фиг. 2В



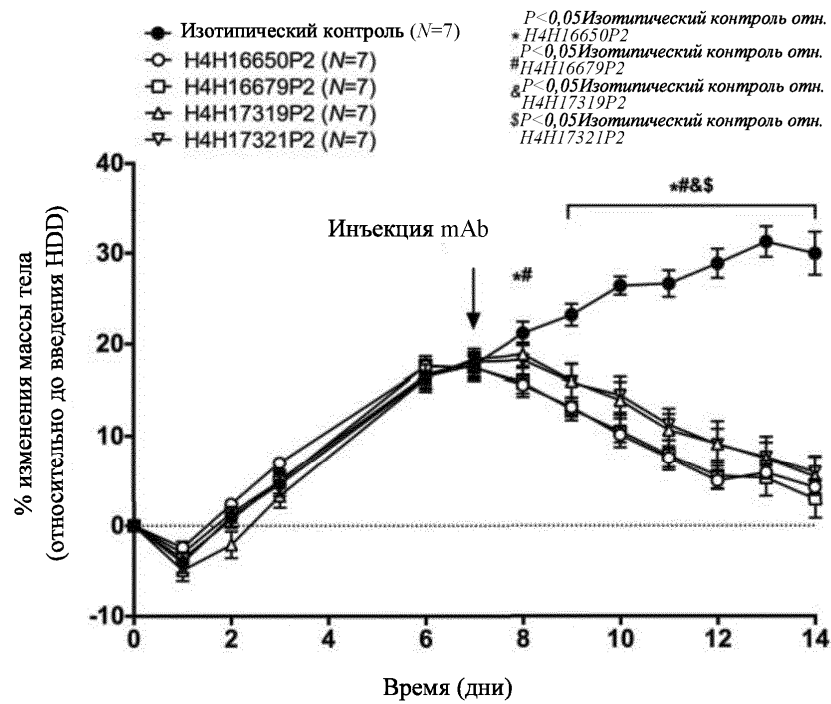
Фиг. 2С

Суточное потребление пищи



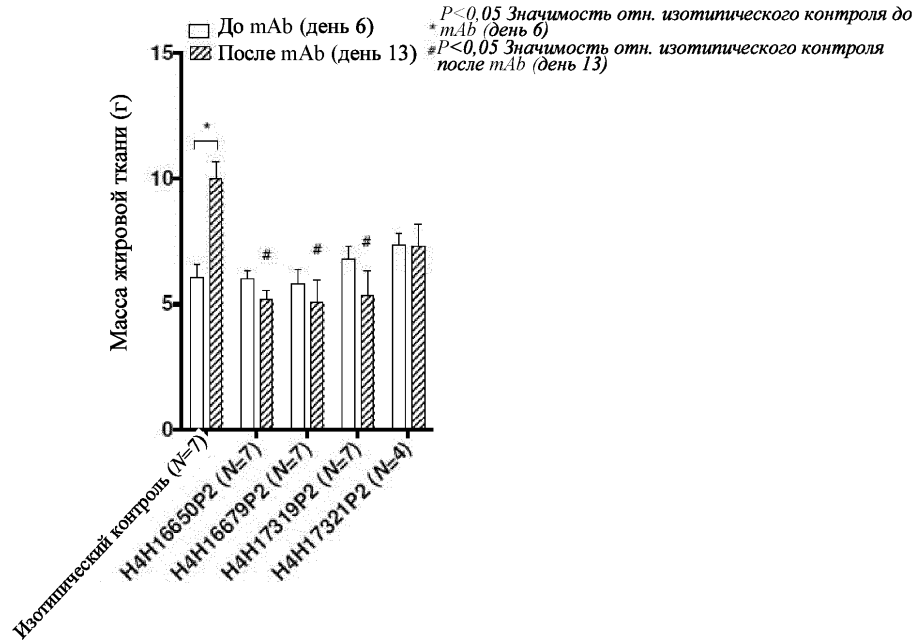
Фиг. 3

Изменение массы тела

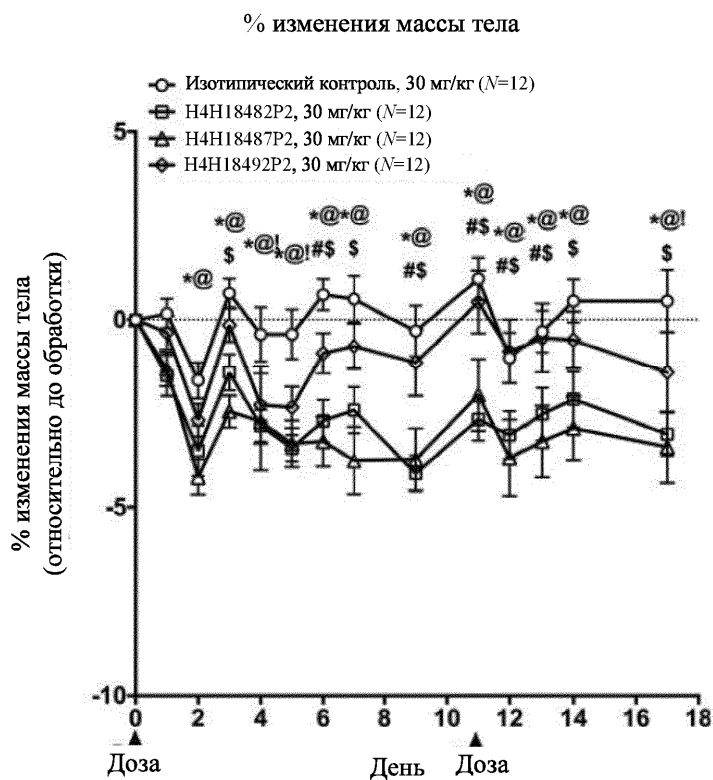


Фиг. 4

Масса жировой ткани



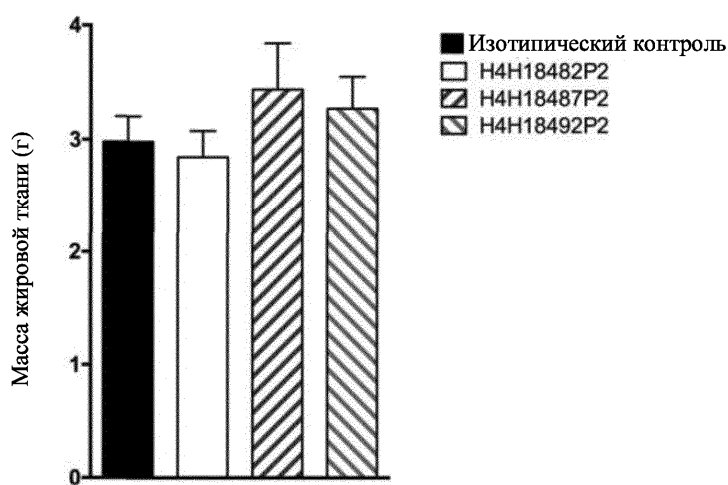
Фиг. 5



*P<0,05, Изотипический контроль отн. H4N18482P2
 @P<0,05, Изотипический контроль отн. H4N18487P2
 !P<0,05, Изотипический контроль отн. H4N18492P2
 #P<0,05, H4N18492P2 отн. H4N18482P2
 \$P<0,05, H4N18492P2 отн. H4N18487P2

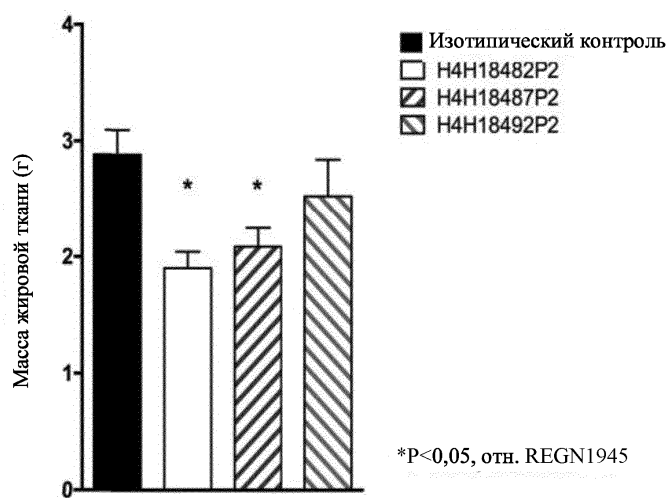
Фиг. 6

Масса жировой ткани до введения mAb
 (день -19)

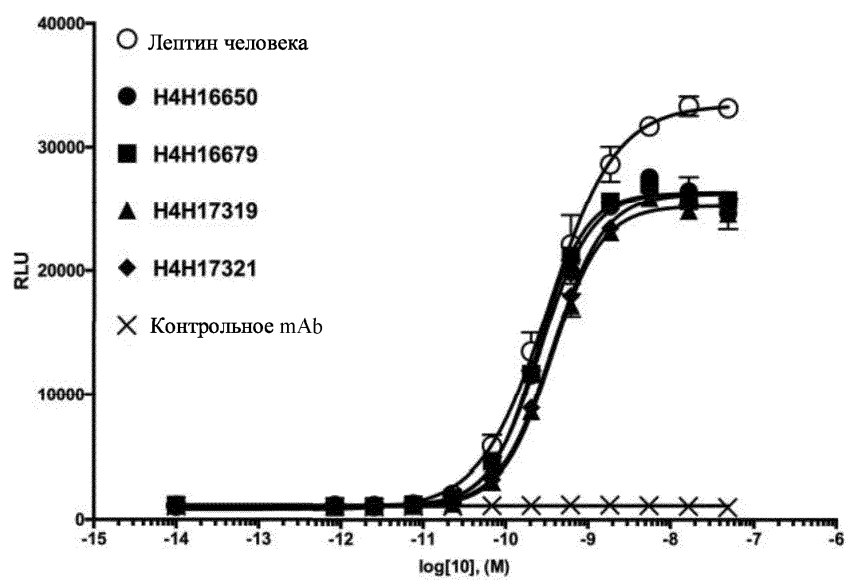


Фиг. 7А

Масса жировой ткани после введения mAb
(день 17)



Фиг. 7В



Фиг. 8



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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