(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110167965 A
(43)申请公布日 2019.08.23

(21)申请号 201780082335.4

(22)申请日 2017.11.08

(30)优先权数据
62/419,062 2016.11.08 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2019.07.04

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2017/060690 2017.11.08

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2018/089532 EN 2018.05.17

(71)申请人 瑞泽恩制药公司
地址 美国纽约州

(72)发明人 J·科洛马达 P·史蒂维斯
J·阿尔塔雷霍斯

(74)专利代理机构 北京市君合律师事务所 11517
代理人 吴瑜 顾云峰

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

权利要求书2页 说明书37页
序列表48页 附图3页

(54)发明名称

拮抗瘦素受体的抗原结合蛋白

(57)摘要

本发明提供了与瘦素受体(LEPR)结合的抗体和抗体的抗原结合片段,以及使用它们的方法。根据某些实施方案,本发明包括结合LEPR并拮抗LEPR信号传导的抗体和抗体的抗原结合片段。在某些实施方案中,本发明包括在存在或不存在瘦素的情况下结合LEPR的抗体和抗体的抗原结合片段。在其他实施方案中,本发明包括表现出对LEPR的信号传导有部分激动作用的抗体和抗体的抗原结合片段。本发明的抗体和抗原结合片段可用于治疗各种疾病,包括但不限于充血性心力衰竭恶病质、肺恶病质和癌症恶病质、自身免疫性疾病(如炎性肠病、红斑狼疮、多发性硬化症、牛皮癣)、心血管疾病、血压升高、神经退行性疾病、抑郁症、癌症(如肝细胞癌、黑色素瘤、乳腺癌)以及与瘦素信号传导升高相关或由其导致的其他疾病和病症。

CN 110167965 A

1.一种分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段结合人瘦素受体(LEPR)并拮抗LEPR信号传导,同时不阻断瘦素和LEPR之间的相互作用,其中,通过体外瘦素结合测定测得所述抗体或其抗原结合片段不阻断所述相互作用超过40%。

2.根据权利要求1所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段表现出一种或多种选自下组的其他性质:

(i)通过表面等离子共振测得在25℃下以小于约10nM的K_D结合单体人LEPR;

(ii)通过表面等离子共振测得在25℃下以大于约5分钟的$t_{1/2}$结合单体人LEPR;

(iii)通过表面等离子共振测得在25℃下以小于约2.0nM的K_D结合二聚体人LEPR;

(iv)通过表面等离子共振测得在25℃下以大于约20分钟的$t_{1/2}$结合二聚体人LEPR;

(v)结合与人瘦素复合的人LEPR;

(vi)在存在和不存在人瘦素的情况下结合细胞表面表达的LEPR;和

(vii)在基于细胞的报告分子测定中以小于约3.0nM的IC_{50}抑制瘦素诱导的LEPR信号传导。

3.根据权利要求1或权利要求2所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其中在基于细胞的报告分子测定中所述抗体或其抗原结合片段在不存在人瘦素的情况下表现出对LEPR信号传导的至少部分激活。

4.一种结合人瘦素受体(LEPR)的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含:(a)重链可变区(HCVR)的互补决定区(CDR),所述重链可变区包含SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:42和SEQ ID NO:58所示的氨基酸序列,以及(b)轻链可变区(LCVR)的CDR,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列。

5.根据权利要求4所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段包含HCVR/LCVR氨基酸序列对的重链和轻链CDR,所述氨基酸序列对选自下组:SEQ ID NO:2/10、42/10和58/10。

6.根据权利要求5所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含HCVR/LCVR氨基酸序列对,所述氨基酸序列对选自下组:SEQ ID NO:2/10、42/10和58/10。

7.根据权利要求6所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段拮抗LEPR的信号传导。

8.根据权利要求1-3中任一项所述的结合人瘦素受体(LEPR)的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含:(a)重链可变区(HCVR)的互补决定区(CDR),所述重链可变区包含SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:42和SEQ ID NO:58所示的氨基酸序列,以及(b)轻链可变区(LCVR)的CDR,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列。

9.根据权利要求1至4中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段与参照抗体竞争结合LEPR,所述参照抗体包含选自下组的HCVR/LCVR氨基酸序列对:SEQ ID NO:2/10、42/10和58/10。

10.根据权利要求1至9中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段结合的LEPR上的表位与参照抗体结合的LEPR上的表位相同,所述参照抗体包含选自下组的HCVR/LCVR氨基酸序列对:SEQ ID NO:2/10、42/10和58/10。

11.一种药物组合物,所述药物组合物包含权利要求1至10中任一项所述的抗体或其抗

原结合片段,以及药学上可接受的运载体或稀释剂。

12.一种用于治疗与瘦素信号传导相关或由其导致的疾病的方法,所述方法包括将权利要求11所述的药物组合物施用给有需要的个体。

13.根据权利要求12所述的方法,其中所述与瘦素信号传导相关或由其导致的疾病或病症选自下组:厌食症或其他精神疾病进食障碍、慢性肾病恶病质、其他恶病质(如充血性心力衰竭恶病质、肺恶病质、放射恶病质和癌症恶病质)、自身免疫性疾病(如炎性肠病、红斑狼疮、多发性硬化症、牛皮癣)、心血管疾病、血压升高、抑郁症、非酒精性脂肪肝病、神经退行性疾病、抑郁症、癌症(如肝细胞癌、黑色素瘤和乳腺癌)。

14.一种治疗与激活LEPR突变相关或由其导致的疾病或病症的方法,所述方法包括将权利要求11所述的药物组合物施用给有需要的个体。

15.根据权利要求14所述的方法,其中所述LEPR突变为LEPR Q223R。

16.根据权利要求14或15所述的方法,其中所述与激活LEPR突变相关或由其导致的疾病或病症是恶病质。

17.根据权利要求12-16中任一项所述的方法,其还包括向所述个体施用第二治疗剂,其中所述第二治疗剂选自下组:抗抑郁剂、食欲刺激剂、针对厌食和恶病质的治疗物、COX-2抑制剂、NSAID、用于逆转肌肉量、肌肉功能和/或肌肉力量的损失(可以具有或不具有恶病质)的治疗物、非酒精性脂肪肝病(NAFLD)的治疗物、HIV/AIDS感染的治疗物、TNF-α的产生的阻断剂、抗氧化剂、肿瘤坏死因子(TNF)的拮抗剂、B-淋巴细胞刺激剂、血管紧张素转换酶(ACE)抑制剂、激酶抑制剂和化学治疗剂。

拮抗瘦素受体的抗原结合蛋白

背景技术

[0001] 瘦素是主要由脂肪组织表达的多肽激素，参与对代谢、能量平衡和食物摄入的调节。瘦素的活性通过与瘦素受体相互作用和通过瘦素受体的信号传导来介导。瘦素受体(也称为“LEPR”、“WSX”、“OB受体”、“OB-R”和“CD295”)是I型细胞因子受体家族的单次跨膜受体，具有较大的(含有818个氨基酸)细胞外结构域。瘦素、Ob-R瘦素受体或两者的表达升高会导致多种疾病，包括但不限于厌食症或其他精神疾病进食障碍、慢性肾病恶病质、其他恶病质(如充血性心力衰竭恶病质、肺恶病质、辐射恶病质和癌症恶病质)、自身免疫性疾病(如炎性肠病、红斑狼疮、多发性硬化症、牛皮癣)、心血管疾病、血压升高、抑郁症、非酒精性脂肪肝病、神经退行性疾病、抑郁症、癌症(如肝细胞癌、黑色素瘤和乳腺癌)。

[0002] 用于解决高瘦素信号传导的建议性治疗方法包括使用瘦素受体肽拮抗剂和拮抗剂突变体如可溶性瘦素受体变体、竞争性的LEPR拮抗剂如抗体9F8(Fazeli et al.(2006)J Immunological Methods 312,190-200)或靶向瘦素受体的纳米抗体(McMurphy et al.,PLOS One(2014)9(2):e89895)、纤连蛋白III结构域、促食欲物质(例如，生长激素释放肽和NPY)、阻断瘦素的下游介导物(例如，黑皮质素受体4)和/或生活方式的改变。然而，这些方法通常显示出有限的功效。因此，本领域需要替代方法来治疗瘦素抗性和与血清瘦素水平升高和/或过量的LEPR信号传导相关的其他疾病。

序列表

[0003] 序列表的正式副本通过EFS-Web以ASCII格式的序列表与说明书同时提交，其文件名为2017_11_08_10271W001_SEQ_LIST_ST25.TXT，创建日期为2017年11月8日，大小为约87.4千字节。该ASCII格式文档中包含的序列表是说明书的一部分，并且其全部内容通过引用并入本文。

发明概述

[0004] 本发明提供了结合人瘦素受体(LEPR)的抗体及其抗原结合片段。本发明的抗体是拮抗剂抗体；即，本发明的抗LEPR的抗体与LEPR的结合导致细胞中瘦素受体信号传导的阻断或下调。因此，在各种实施方案中，本发明的拮抗剂抗体表现出较弱的部分激动剂活性。但是，本发明的抗体可用于例如下调个体中瘦素的生物学活性。因此，本发明的抗体和抗原结合片段可用于与升高的瘦素信号传导相关的疾病和病症的治疗性处理中。

[0005] 本发明的抗体可以是全长的(例如，IgG1或IgG4抗体)或者可以仅包含抗原结合部分(例如，Fab、F(ab')$_2$或scFv片段)，并且可以对其进行修饰以影响功能，例如，消除残余效应子功能(Reddy et al.,2000,J.Immunol.164:1925-1933)。

[0006] 本发明的示例性LEPR拮抗剂抗体列于本文的表1和2中。表1示出了所述示例性LEPR拮抗剂抗体的重链可变区(HCVR)、轻链可变区(LCVR)、重链互补决定区(HCDR1、HCDR2和HCDR3)和轻链互补决定区(LCDR1、LCDR2)的氨基酸序列标识符。表2示出了所述示例性LEPR拮抗剂抗体的HCVR、LCVR、HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3的核酸序列标识符。

[0007] 本发明提供了特异性结合LEPR的抗体或其抗原结合片段，所述抗体或其抗原结合

片段包含HCVR,所述HCVR包含选自表1中列出的任何HCVR氨基酸序列的氨基酸序列,或与其基本相似的序列,所述基本相似的序列与其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性。

[0008] 本发明还提供了特异性结合LEPR的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含LCVR,所述LCVR包含选自表1中列出的任何LCVR氨基酸序列的氨基酸序列,或与其基本相似的序列,所述基本相似的序列与其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性。

[0009] 本发明还提供了特异性结合LEPR的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含HCVR和LCVR氨基酸序列对(HCVR/LCVR),所述序列对包含表1中列出的任何HCVR氨基酸序列,所述HCVR氨基酸序列与表1中列出的任何LCVR氨基酸序列配对。根据某些实施方案,本发明提供了抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含在表1中列出的任何示例性抗LEPR抗体中包含的HCVR/LCVR氨基酸序列对。在某些实施方案中,所述HCVR/LCVR氨基酸序列对选自下组:SEQ ID NO:2/10、18/10、26/10、34/10、42/10、50/10、58/10、66/10和74/82。

[0010] 本发明还提供了特异性结合LEPR的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含重链CDR1(HCDR1),所述HCDR1包含选自表1中列出的任何HCDR1氨基酸序列的氨基酸序列或与其基本相似的序列,所述基本相似的序列与其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性。

[0011] 本发明还提供了特异性结合LEPR的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含重链CDR2(HCDR2),所述HCDR2包含选自表1中列出的任何HCDR2氨基酸序列的氨基酸序列或与其基本相似的序列,所述基本相似的序列与其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性。

[0012] 本发明还提供了特异性结合LEPR的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含重链CDR3(HCDR3),所述HCDR3包含选自表1中列出的任何HCDR3氨基酸序列的氨基酸序列或与其基本相似的序列,所述基本相似的序列与其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性。

[0013] 本发明还提供了特异性结合LEPR的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含轻链CDR1(LCDR1),所述LCDR1包含选自表1中列出的任何LCDR1氨基酸序列的氨基酸序列或与其基本相似的序列,所述基本相似的序列与其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性。

[0014] 本发明还提供了特异性结合LEPR的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含轻链CDR2(LCDR2),所述LCDR2包含选自表1中列出的任何LCDR2氨基酸序列的氨基酸序列或与其基本相似的序列,所述基本相似的序列与其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性。

[0015] 本发明还提供了特异性结合LEPR的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含轻链CDR3(LCDR3),所述LCDR3包含选自表1中列出的任何LCDR3氨基酸序列的氨基酸序列或与其基本相似的序列,所述基本相似的序列与其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性。

[0016] 本发明还提供了特异性结合LEPR的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结

合片段包含HCDR3和LCDR3氨基酸序列对(HCDR3/LCDR3)，所述序列对包含表1中列出的任何HCDR3氨基酸序列，所述HCVR3氨基酸序列与表1中列出的任何LCDR3氨基酸序列配对。根据某些实施方案，本发明提供了抗体或其抗原结合片段，所述抗体或其抗原结合片段包含在表1中列出的任何示例性抗LEPR抗体中包含的HCDR3/LCDR3氨基酸序列对。在某些实施方案中，所述HCDR3/LCDR3氨基酸序列对选自下组：SEQ ID NO:8/16、24/16、32/16、40/16、48/16、56/16、64/16、72/16、80/16和80/88。

[0017] 本发明还提供了特异性结合LEPR的抗体或其抗原结合片段，所述抗体或其抗原结合片段包含表1中列出的任何示例性抗LEPR抗体中包含的一组六个CDR(即，HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3)。在某些实施方案中，所述HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3氨基酸序列组选自下组：SEQ ID NO:4、6、8、12、14、16；20、22、24、12、14、16；28、30、32、12、14、16；36、38、40、12、14、16；52、54、56、12、14、16；60、62、64、12、14、16；68、70、72、12、14、16；和76、78、80、84、86、88。

[0018] 在相关的实施方案中，本发明提供了特异性结合LEPR的抗体或其抗原结合片段，所述抗体或其抗原结合片段包含表1中列出的任何示例性抗LEPR抗体所定义的氨基酸序列对中包含的一组六个CDR(即，HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3)。例如，本发明包括特异性结合LEPR的抗体或其抗原结合片段，所述抗体或其抗原结合片段包含HCVR/LCVR氨基酸序列对中含有的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3氨基酸序列，所述HCVR/LCVR氨基酸序列对选自下组：SEQ ID NO:2/10、18/10、26/10、34/10、42/10、50/10、58/10、66/10和74/82。用于鉴定HCVR和LCVR氨基酸序列内的CDR的方法和技术是本领域熟知的，并且可用于鉴定本文公开的特定HCVR和/或LCVR氨基酸序列内的CDR。可用于鉴定CDR的边界的示例性约定包括，例如，Kabat定义、Chothia定义和AbM定义。一般来说，Kabat定义基于序列可变性，Chothia定义基于结构环区域的位置，AbM定义是Kabat和Chothia方法之间的折衷。参见，例如，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)；和Martin et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:9268-9272(1989)。也有公共数据库用于鉴定抗体内的CDR序列。

[0019] 本发明还提供了编码抗LEPR抗体或其部分的核酸分子。例如，本发明提供了编码表1中列出的任何HCVR氨基酸序列的核酸分子；在某些实施方案中，所述核酸分子包含选自表2中列出的任何HCVR核酸序列的多核苷酸序列或与其基本相似的序列，所述基本相似的序列与其具有至少90％、至少95％、至少98％或至少99％的序列同一性。

[0020] 本发明还提供了编码表1中列出的任何LCVR氨基酸序列的核酸分子；在某些实施方案中，所述核酸分子包含选自表2中列出的任何LCVR核酸序列的多核苷酸序列或与其基本相似的序列，所述基本相似的序列与其具有至少90％、至少95％、至少98％或至少99％的序列同一性。

[0021] 本发明还提供了编码表1中列出的任何HCDR1氨基酸序列的核酸分子；在某些实施方案中，所述核酸分子包含选自表2中列出的任何HCDR1核酸序列的多核苷酸序列或与其基本相似的序列，所述基本相似的序列与其具有至少90％、至少95％、至少98％或至少99％的序列同一性。

[0022] 本发明还提供了编码表1中列出的任何HCDR2氨基酸序列的核酸分子；在某些实施

方案中，所述核酸分子包含选自表2中列出的任何HCDR2核酸序列的多核苷酸序列或与其基本相似的序列，所述基本相似的序列与其具有至少90％、至少95％、至少98％或至少99％的序列同一性。

[0023] 本发明还提供了编码表1中列出的任何HCDR3氨基酸序列的核酸分子；在某些实施方案中，所述核酸分子包含选自表2中列出的任何HCDR3核酸序列的多核苷酸序列或与其基本相似的序列，所述基本相似的序列与其具有至少90％、至少95％、至少98％或至少99％的序列同一性。

[0024] 本发明还提供了编码表1中列出的任何LCDR1氨基酸序列的核酸分子；在某些实施方案中，所述核酸分子包含选自表2中列出的任何LCDR1核酸序列的多核苷酸序列或与其基本相似的序列，所述基本相似的序列与其具有至少90％、至少95％、至少98％或至少99％的序列同一性。

[0025] 本发明还提供了编码表1中列出的任何LCDR2氨基酸序列的核酸分子；在某些实施方案中，所述核酸分子包含选自表2中列出的任何LCDR2核酸序列的多核苷酸序列或与其基本相似的序列，所述基本相似的序列与其具有至少90％、至少95％、至少98％或至少99％的序列同一性。

[0026] 本发明还提供了编码表1中列出的任何LCDR3氨基酸序列的核酸分子；在某些实施方案中，所述核酸分子包含选自表2中列出的任何LCDR3核酸序列的多核苷酸序列或与其基本相似的序列，所述基本相似的序列与其具有至少90％、至少95％、至少98％或至少99％的序列同一性。

[0027] 本发明还提供了编码HCVR的核酸分子，其中所述HCVR包含一组三个CDR(即HCDR1、HCDR2、HCDR3)，其中所述HCDR1、HCDR2、HCDR3氨基酸序列组如表1中列出的任何示例性抗LEPR抗体所定义。

[0028] 本发明还提供了编码LCVR的核酸分子，其中所述LCVR包含一组三个CDR(即LCDR1、LCDR2、LCDR3)，其中所述LCDR1、LCDR2、LCDR3氨基酸序列组如表1中列出的任何示例性抗LEPR抗体所定义。

[0029] 本发明还提供了编码HCVR和LCVR的核酸分子，其中所述HCVR包含表1中列出的任何HCVR氨基酸序列的氨基酸序列，并且其中所述LCVR包含表1中列出的任何LCVR氨基酸序列的氨基酸序列。在某些实施方案中，所述核酸分子包含选自表2中列出的任何HCVR核酸序列的多核苷酸序列或与其基本相似的序列，所述基本相似的序列与其具有至少90％、至少95％、至少98％或至少99％的序列同一性，以及选自表2中列出的任何LCVR核酸序列的多核苷酸序列或与其基本相似的序列，所述基本相似的序列与其具有至少90％、至少95％、至少98％或至少99％的序列同一性。在根据本发明的这个方面的某些实施方案中，所述核酸分子编码HCVR和LCVR，其中所述HCVR和LCVR均衍生自表1中列出的同一个抗LEPR抗体。

[0030] 本发明还提供了能够表达包含抗LEPR抗体的重链或轻链可变区的多肽的重组表达载体。例如，本发明包括重组的表达载体，所述重组的表达载体包含任何上述核酸分子，即编码表1中示出的任何HCVR、LCVR和/或CDR序列的核酸分子。还包括在本发明范围内的有：已引入了这些载体的宿主细胞，以及通过在允许产生抗体或抗体片段的条件下培养所述宿主细胞并回收以此产生的抗体和抗体片段来产生所述抗体或其部分的方法。

[0031] 在另一个方面，本发明提供了药物组合物，所述药物组合物包含特异性结合LEPR

的重组的人抗体或其片段和药学上可接受的运载体。在相关的方面，本发明的特征在于一种组合物，所述组合物是抗LEPR抗体和第二治疗剂的组合。在一个实施方案中，所述第二治疗剂是有利地与抗LEPR抗体组合的任何药剂。

[0032] 在又一个方面，本发明提供了使用抗LEPR抗体或本发明所述抗体的抗原结合部分来下调或消除LEPR信号传导的治疗方法。根据本发明的这个方面的所述治疗方法包括将治疗有效量的药物组合物施用给有需要的个体，所述药物组合物包含抗体或本发明所述抗体的抗原结合片段。所治疗的病症是通过下调或消除LEPR信号传导或通过阻断瘦素的活性而得到改善、缓解、抑制或预防的任何疾病或病症。

[0033] 通过阅读随后的详细描述，其他实施方案将变得显而易见。

附图简述

[0034] 图1显示了经30mg/kg抗LEPR抗体H4H17322P2、H4H18457P2或H4H18464或用同种型对照抗体处理的小鼠的食物摄入变化百分比。

[0035] 图2显示了经30mg/kg抗LEPR抗体H4H17322P2、H4H18457P2或H4H18464或用同种型对照抗体处理的小鼠的体重平均变化百分比。

[0036] 图3显示了经30mg/kg抗LEPR抗体H4H17322P2、H4H18457P2或H4H18464或用同种型对照抗体处理的小鼠的平均脂肪质量。

发明详述

[0037] 在描述本发明之前，应理解本发明不限于所述的特定方法和实验条件，因为这些方法和条件可以变化。还应理解，本文使用的术语仅用于描述特定实施方案的目的，而不是限制性的，因为本发明的范围仅受权利要求书的限制。

[0038] 除非有另外定义，否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同的含义。本文所用的术语“约”，当用于提及具体列举的数值时，是指该值可以与所列举的值相差不超过1％。例如，本文所用的“约100”的表述包括99和101以及它们之间的所有值(例如，99.1、99.2、99.3、99.4等)。

[0039] 尽管与本文描述的方法和材料类似或等同的任何方法和材料可用于本发明的实践或测试，但本文描述的是优选的方法和材料。在本说明书中提及的所有专利、申请和非专利出版物均通过引用整体并入本文。

定义

[0040] 本文所用的表述“瘦素受体”、“LEPR”等是指人瘦素受体，其包含SEQ ID NO:89所示的氨基酸序列(也参见UniProtKB/Swiss-Prot登记号P48357)。科学文献中使用的LEPR的替代名称包括“OB受体”、“OB-R”和“CD295”。LEPR也称为“WSX”(参见，例如，美国专利号7,524,937)。表述“LEPR”包括单体和多聚体的(例如，二聚体)LEPR分子。本文所用的表述“单体人LEPR”是指LEPR蛋白或其部分，所述LEPR蛋白或其部分不含或不具有任何多聚化结构域，并且在正常条件下作为单个LEPR分子存在，与另一个LEPR分子没有直接的物理连接。示例性的单体LEPR分子如本文中称为“hLEPR.mmh”的分子，其包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列(参见，例如，本文实施例3)。本文所用的表述“二聚体人LEPR”是指包含两个LEPR分子的构建体，所述两个LEPR分子通过接头、共价键、非共价键，或通过多聚化结构域(例如抗体Fc结构域)彼此连接。示例性的二聚体LEPR分子如本文中称为“hLEPR.mFc”的分子，其包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列(参见，例如，本文实施例3)，或如本文中称为“hLEPR.hFc”的分子，

其包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列。除非另外特别指出，否则本文所用的表述如“抗LEPR抗体”、“特异性结合LEPR的抗体”、“LEPR特异性结合蛋白”等是指这样的分子：其结合全长人LEPR、单体人LEPR、二聚体人LEPR、或包含LEPR细胞外结构域或由其组成的其他构建体。

[0041] 除非明确指出来自非人类物种，否则本文对蛋白质、多肽和蛋白质片段的所有提及旨在表示相应蛋白质、多肽或蛋白质片段的人类形式。因此，除非指定来自非人物种，例如“小鼠LEPR”、“猴子LEPR”等，否则“LEPR”的表述表示人LEPR。

[0042] 本文所用的表述“细胞表面表达的LEPR”是指一种或多种LEPR蛋白或其细胞外结构域，其在体外或在体内的条件下在细胞表面上表达，使得至少一部分LEPR蛋白暴露于细胞膜的细胞外侧，并且可以接近抗体的抗原结合部分。“细胞表面表达的LEPR”可以包含在细胞表面上表达的LEPR蛋白或由其组成，所述细胞通常(例如，在天然或野生型状态下)表达LEPR蛋白。或者，“细胞表面表达的LEPR”可以包含在细胞表面上表达的LEPR蛋白质或由其组成，所述细胞通常在其表面上不表达人LEPR，但是已经被人工改造成在其表面上表达LEPR。

[0043] 本文所用的“抗LEPR抗体”或“结合人瘦素受体的抗体”等表述包括具有单一特异性的单价抗体，以及包含结合LEPR的第一臂和结合第二(靶)抗原的第二臂的双特异性抗体，其中所述抗LEPR臂包含本文表1中示出的任何HCVR/LCVR或CDR序列。

[0044] 本文所用的术语“抗体”是指包含至少一个互补决定区(CDR)的任何抗原结合分子或分子复合物，所述互补决定区与特定抗原(例如LEPR)特异性结合或相互作用。术语“抗体”包括免疫球蛋白分子，所述免疫球蛋白分子包含四条多肽链，通过二硫键相互连接的两条重(H)链和两条轻(L)链，及其多聚体(例如IgM)。每条重链包含重链可变区(本文中缩写为HCVR或V_H)和重链恒定区。所述重链恒定区包含三个结构域，C_H1、C_H2和C_H3。每条轻链包含轻链可变区(本文中缩写为LCVR或V_L)和轻链恒定区。所述轻链恒定区包含一个结构域(C_L1)。所述V_H和V_L区可以进一步细分为称为互补决定区(CDR)的高变区，其与称为框架区(FR)的更保守的区域相互穿插。每个V_H和V_L由三个CDR和四个FR组成，按照从氨基末端到羧基末端的以下顺序排列：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。在本发明的不同实施方案中，所述抗LEPR抗体(或其抗原结合部分)的FR可以与人种系序列相同，或者可以进行天然的或人工的修饰。可以基于对两个或更多个CDR的并列分析来定义氨基酸共有序列。

[0045] 本文所用的术语“抗体”还包括完整抗体分子的抗原结合片段。本文所用的术语抗体的“抗原结合部分”、抗体的“抗原结合片段”等包括任何天然存在的、可酶促获得的、合成的或基因改造的多肽或糖蛋白，所述多肽或糖蛋白特异性结合抗原形成复合物。抗体的抗原结合片段可以，例如，通过使用任何合适的标准技术从完整的抗体分子衍生出，所述合适的标准技术例如蛋白水解消化或涉及操纵和表达编码抗体可变结构域和任选地恒定结构域的DNA的重组基因工程技术。这种DNA是已知的和/或容易从例如商业来源、DNA文库(包括例如噬菌体-抗体文库)获得，或可以合成得到。DNA可以通过化学方法或通过使用分子生物学技术进行测序和操作，从而例如，将一个或多个可变和/或恒定结构域排列成合适的构型，或引入密码子，产生半胱氨酸残基，修饰、添加或删除氨基酸等。

[0046] 抗原结合片段的非限制性实例包括：(i)Fab片段；(ii)F(ab')2片段；(iii)Fd片段；(iv)Fv片段；(v)单链Fv(scFv)分子；(vi)dAb片段；和(vii)模拟抗体高变区的氨基酸残基组成的最小识别单位(例如，分离的互补决定区(CDR)如CDR3肽)或受约束的FR3-CDR3-

FR4肽。其他改造的分子，如结构域特异性抗体、单域抗体、域缺失抗体、嵌合抗体、CDR嫁接抗体、双抗体、三抗体、四抗体、微抗体、纳米抗体(例如，单价纳米抗体、二价纳米抗体等)、小模块化免疫药物(SMIP)和鲨鱼变体IgNAR结构域也包括在本文所用的“抗原结合片段”表述内。

[0047] 抗体的抗原结合片段通常包含至少一个可变结构域。所述可变结构域可以具有任何大小或氨基酸组成，并且通常包含至少一个CDR，所述CDR与一个或多个框架序列相邻或在框内。在具有与V_L结构域相关的V_H结构域的抗原结合片段中，所述V_H和V_L结构域可以以任何合适的排列彼此相对定位。例如，所述可变区可以是二聚体的并含有V_H-V_H、V_H-V_L或V_L-V_L二聚体。或者，抗体的抗原结合片段可含有单体V_H或V_L结构域。

[0048] 在某些实施方案中，抗体的抗原结合片段可含有至少一个与至少一个恒定结构域共价连接的可变结构域。可以在本发明的抗体的抗原结合片段中存在的可变和恒定结构域的非限制性示例性构型包括：(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；和(xiv)V_L-C_L。在可变和恒定结构域的任何构型(包括上文列出的任何示例性构型)中，所述可变和恒定结构域可以彼此直接连接或可以通过完整的或部分的铰链或连接区连接。铰链区可以由至少2个(例如，5、10、15、20、40、60或更多个)氨基酸组成，这导致了单个多肽分子中相邻的可变和/或恒定结构域之间的柔性或半柔性连接。此外，本发明的抗体的抗原结合片段可以包含上文列出的任何可变和恒定结构域的同二聚体或异二聚体(或其他多聚体)，其彼此非共价结合和/或与一个或多个单体V_H或V_L结构域(例如，通过二硫键)非共价结合。

[0049] 与完整的抗体分子一样，抗原结合片段可以是单特异性或多特异性的(例如，双特异性的)。抗体的多特异性抗原结合片段通常包含至少两个不同的可变结构域，其中每个可变结构域能够特异性结合单独的抗原或结合同一抗原上的不同表位。可以使用本领域已有的常规技术，将任何多特异性抗体形式(包括本文公开的示例性双特异性抗体形式)进行改变以适用于本发明抗体的抗原结合片段。

[0050] 在本发明的某些实施方案中，本发明的抗LEPR抗体是人抗体。本文所用的术语“人抗体”旨在包括具有衍生自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗体。本发明的人抗体可以包括不由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如，通过体外随机或位点特异性诱变或通过体内体细胞突变引入的突变)，例如在CDR中，特别是在CDR3中。然而，本文所用的术语“人抗体”不旨在包括这样的抗体：其中的衍生自另一种哺乳动物物种(例如小鼠)种系的CDR序列已经被移植到了人框架序列上。

[0051] 在一些实施方案中，本发明的抗体可以是重组的人抗体。本文所用的术语“重组的人抗体”旨在包括通过重组方式制备、表达、产生或分离的所有人抗体，例如使用转染到宿主细胞中的重组表达载体表达的抗体(在下文进一步描述)，从重组的组合型人抗体文库中分离的抗体(在下文进一步描述)，从转有人免疫球蛋白基因的转基因动物(例如小鼠)分离出的抗体(参见例如Taylor et al.(1992)Nucl.Acids Res.20:6287-6295)或通过涉及将人免疫球蛋白基因序列剪接到其他DNA序列的任何其他方法制备、表达、产生或分离的抗体。此类重组人抗体具有衍生自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区。然而，在某些实施方案中，对这种重组人抗体进行体外诱变(或者，当使用转有人Ig序列的转基因动物时进

行体内体细胞诱变)，并且由此所述重组抗体的V_H和V_L区的氨基酸序列是这样的序列：其虽然衍生自人种系V_H和V_L序列并与之相关，但是其在体内可能并不天然存在于人抗体种系库中。

[0052] 本发明包括在铰链、C_H2或C_H3区域具有一个或多个突变的抗体，其可能是例如在生产中所需的，以提高所需抗体形式的产量。

[0053] 本发明的抗体可以是分离的抗体。本文所用的“分离的抗体”是指已经从其天然环境的至少一种组分中鉴定和分离和/或回收的抗体。例如，已经从生物体的至少一种组分分离或除去的抗体，或者从有抗体天然存在的或天然产生的组织或细胞中分离或除去的抗体是用于本发明目的的“分离的抗体”。分离的抗体还包括重组细胞内的原位抗体。分离的抗体是已经经过至少一个纯化或分离步骤的抗体。根据某些实施方案，分离的抗体可以基本上不含其他细胞材料和/或化学物质。

[0054] 本发明包括本文公开的抗LEPR抗体的变体，所述变体与衍生出所述抗体的相应种系序列相比，在重链和轻链可变结构域的框架和/或CDR区中包含一个或多个氨基酸替换、插入和/或缺失。通过将本文公开的氨基酸序列与可从例如公共抗体序列数据库获得的种系序列进行比较，可以很容易地确定这种突变。本发明包括抗体及其抗原结合片段，其衍生自本文公开的任何氨基酸序列，其中一个或多个框架和/或CDR区内的一个或多个氨基酸突变为衍生出所述抗体的种系序列的相应残基，或突变为另一人种系序列的相应残基，或突变为相应种系残基的保守性氨基酸替换(此类序列变化在本文中统称为“种系突变”)。本领域普通技术人员从本文公开的重链和轻链可变区序列开始，可以容易地产生许多抗体和抗原结合片段，所述抗体和抗原结合片段包含一个或多个个体种系突变或其组合。在某些实施方案中，所述V_H和/或V_L结构域内的所有框架和/或CDR残基突变回在衍生出所述抗体的原始种系序列中存在的残基。在其他实施方案中，仅将某些残基突变回所述原始种系序列，例如，仅在FR1的前8个氨基酸内或在FR4的最后8个氨基酸内存在的突变残基，或仅在CDR1、CDR2或CDR3中存在的突变残基。在其他实施方案中，将所述框架和/或CDR残基中的一个或多个突变为不同种系序列(即，与原始衍生出所述抗体的种系序列不同的种系序列)的相应残基。此外，本发明的抗体可以含有所述框架和/或CDR区内的两个或更多个种系突变的任意组合，例如，其中某些个体残基突变为特定种系序列的相应残基，而某些不同于原始种系序列的其他残基维持了下来或突变为不同种系序列的相应残基。一旦获得含有一个或多个种系突变的抗体和抗原结合片段，就可以容易地就一种或多种所需特性对它们进行测试，所述特性例如，改善的结合特异性，提升的结合亲和力，改善或增强的拮抗或激动的生物学特性(视情况而定)，降低的免疫原性等。以这种一般方式获得的抗体和抗原结合片段包括在本发明中。

[0055] 本发明还包括抗LEPR抗体，其包含具有一个或多个保守替换的本文公开的任何HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列的变体。例如，本发明包括这样的抗LEPR抗体：相对于本文表1中示出的任何HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列，其具有的HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列具有例如，10个或更少的、8个或更少的、6个或更少的、4个或更少的(等)保守的氨基酸替换。在某些实施方案中，本发明提供抗LEPR抗体，其相对于本文表1中示出的序列，包含变体HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列(例如，包含保守的氨基酸替换)，其中此类变体抗体仍然表现出本文公开的示例性抗LEPR抗体的一种或多种功能和/或性质。

[0056] 术语“表位”是指抗原决定簇，所述抗原决定簇与称为互补位的抗体分子可变区中的特定抗原结合位点相互作用。单个抗原可以具有多于一个的表位。因此，不同的抗体可以结合抗原上的不同区域并且可以具有不同的生物学效应。表位可以是构象的也可以是线性的。构象表位是通过来自线性多肽链的不同区段的空间并列的氨基酸产生。线性表位是由多肽链中的相邻氨基酸残基产生的表位。在某些情况下，表位可包括抗原上的糖、磷酰基或磺酰基部分。

[0057] 本发明包括抗LEPR抗体及其抗原结合片段，其包含与本文公开的任何示例性抗LEPR中发现的一个或多个可变结构域或CDR氨基酸序列基本相似或基本相同的氨基酸序列。

[0058] 当应用于多肽时，术语“基本相似性”或“基本相似”是指当最佳比对时，例如通过GAP或BESTFIT程序使用默认空位权重时，两个肽序列享有至少95％的序列同一性，甚至更优选地至少98％或99％的序列同一性。优选地，不相同的残基位置因保守的氨基酸替换而不同。“保守的氨基酸替换”是这样的替换：其中氨基酸残基被具有拥有相似化学性质(例如电荷或疏水性)的侧链(R基团)的另一氨基酸残基替换。通常，保守的氨基酸替换不会显著改变蛋白质的功能特性。在通过保守取代使两个或更多个氨基酸序列彼此不同的情况下，可以向上调整序列同一性百分比或相似程度以校正替换的保守性质。进行这种调节的方法是本领域技术人员熟知的。参见，例如，Pearson(1994)Methods Mol.Biol.24:307-331，在此作为参考引入。具有拥有相似化学性质的侧链的氨基酸组的实例包括(1)脂族侧链：甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸；(2)脂肪族-羟基侧链：丝氨酸和苏氨酸；(3)含酰胺的侧链：天冬酰胺和谷氨酰胺；(4)芳香族侧链：苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸；(5)碱性侧链：赖氨酸、精氨酸和组氨酸；(6)酸性侧链：天冬氨酸和谷氨酸，和(7)含硫侧链的是半胱氨酸和甲硫氨酸。优选的保守氨基酸替换组为：缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸，苯丙氨酸-酪氨酸，赖氨酸-精氨酸，丙氨酸-缬氨酸，谷氨酸-天冬氨酸，以及天冬酰胺-谷氨酰胺。或者，保守替换是在Gonnet et al.(1992)Science 256:1443-1445(在此通过引用并入)中公开的PAM250对数似然矩阵中具有正值的任何变化。“适度保守的”替换是在PAM250对数似然矩阵中具有非负值的任何变化。

[0059] 通常使用序列分析软件测量多肽的序列相似性(也称为序列同一性)。蛋白质分析软件使用分配给各种替换、缺失和其他修饰(包括保守的氨基酸替换)的相似性测量来匹配相似的序列。例如，GCG软件包含可以用默认参数进行使用的程序如Gap和Bestfit，以确定密切相关的多肽(例如来自不同生物物种的同源多肽)之间或野生型蛋白质与其突变蛋白之间的序列同源性或序列同一性。参见，例如，GCG 6.1版本。也可以使用FASTA用默认或推荐的参数(GCG 6.1版本中的程序)比较多肽序列。FASTA(例如，FASTA2和FASTA3)能提供查询和搜索序列之间最佳重叠区域的比对和百分比序列同一性(Pearson(2000)，同上)。在将本发明的序列与包含来自不同生物的大量序列的数据库进行比较时，另一种优选的算法是使用默认参数的计算机程序BLAST，尤其是BLASTP或TBLASTN。参见，例如，Altschul et al.(1990)J.Mol.Biol.215:403-410和Altschul et al.(1997)Nucleic Acids Res.25:3389-402，每个通过引用并入本文。

包含Fc变体的抗LEPR抗体

[0060] 根据本发明的某些实施方案，提供了包含Fc结构域的抗LEPR抗体，所述Fc结构域

包含一个或多个突变，所述突变增强或减弱抗体与FcRn受体的结合(例如，与中性pH相比，在酸性pH下)。例如，本发明包括抗LEPR抗体，所述抗体包含Fc结构域的C_H2或C_H3区域中的突变，其中所述突变在酸性环境中(例如，在pH范围为约5.5至约6.0的内体中)提升Fc结构域对FcRn的亲和力。当被施用给动物时，这种突变可导致抗体的血清半衰期的升高。此类Fc修饰的非限制性实例包括，例如，在第250位(例如，E或Q)；250和428(例如，L或F)位；252(例如，L/Y/F/W或T)、254(例如，S或T)和256(例如，S/R/Q/E/D或T)位的修饰；或在428和/或433(例如，H/L/R/S/P/Q或K)和/或434(例如，H/F或Y)位的修饰；或在250和/或428位的修饰；或在307或308(例如，308F、V308F)和434位处的修饰。在一个实施方案中，所述修饰包括428L(例如，M428L)和434S(例如，N434S)修饰；428L、259I(例如，V259I)和308F(例如，V308F)修饰；433K(例如，H433K)和434(例如，434Y)修饰；252、254和256(例如，252Y、254T和256E)修饰；250Q和428L修饰(例如，T250Q和M428L)；307和/或308修饰(例如，308F或308P)。

[0061] 例如，本发明包括包含Fc结构域的抗LEPR抗体，所述Fc结构域包含选自下组的一个或多个突变对或突变组：250Q和248L(例如，T250Q和M248L)；252Y、254T和256E(例如，M252Y、S254T和T256E)；428L和434S(例如，M428L和N434S)；以及433K和434F(例如，H433K和N434F)。前述Fc结构域突变的所有可能的组合，以及本文公开的抗体可变结构域内的其他突变都在本发明的范围内。

[0062] 本发明的抗LEPR抗体可包含具有降低的效应子功能的修饰的Fc结构域。本文所用的“具有降低的效应子功能的修饰的Fc结构域”是指相对于野生型的天然存在的Fc结构域，已经被修饰、突变、截短等的免疫球蛋白的任何Fc部分，使得相对于包含所述野生型天然存在版的Fc部分的比较分子，包含所述修饰的Fc的分子表现出选自下组的至少一种效应的严重性或程度的降低：细胞杀伤(例如，ADCC和/或CDC)、补体激活、吞噬作用和调理作用。在某些实施方案中，“具有降低的效应子功能的修饰的Fc结构域”是与Fc受体(例如，Fc γ R)的结合降低或减弱的Fc结构域。

[0063] 在本发明的某些实施方案中，所述修饰的Fc结构域是变体IgG1Fc或在铰链区中包含替换的变体IgG4Fc。例如，用于本发明上下文的修饰的Fc可包含变体IgG1Fc，其中所述IgG1Fc铰链区的至少一个氨基酸被来自所述IgG2Fc铰链区的相应氨基酸替换。或者，用于本发明上下文的修饰的Fc可包含变体IgG4Fc，其中所述IgG4Fc铰链区的至少一个氨基酸被来自所述IgG2Fc铰链区的相应氨基酸替换。可以在本发明的上下文中使用的非限制性的示例性的修饰的Fc区示于美国专利申请公开号2014/0243504中，其公开内容通过引用整体并入本文，以及其中示出的修饰的Fc区的任何功能等同变体。

[0064] 可以在本发明的上下文中使用的其他修饰的Fc结构域和Fc修饰包括US 2014/0171623；US 8,697,396；US 2014/0134162；WO 2014/043361(它们的公开内容通过引用整体并入本文)中所示的任何修饰。构建包含本文所述的修饰的Fc结构域的抗体或其他抗原结合融合蛋白的方法是本领域已知的。

抗体的生物学表征

[0065] 本发明包括与人LEPR结合并拮抗LEPR信号传导的抗体及其抗原结合片段。此类抗体在本文中可称为“拮抗剂抗体”。在本发明的上下文中，“LEPR信号传导的拮抗剂”是指结合LEPR并抑制细胞内效应的抗体或其片段，所述抑制细胞内效应通常由瘦素与表达LEPR的细胞中的LEPR的相互作用产生。在各种实施方案中，本发明的拮抗剂抗体抑制LEPR激动剂

的功能和/或LEPR部分激动剂的功能。在某些实施方案中，“拮抗LEPR信号传导”是指抑制瘦素刺激的STAT3转录激活，所述抑制可以使用能直接或间接测量或鉴定STAT3活性的任何方法(例如，使用在报告细胞系中表达的标记形式的STAT3)检测。例如，本发明包括这样的拮抗剂抗体及其抗原结合片段：其在实施例6中所述的基于细胞的报告分子测定或基本上类似的测定中下调LEPR信号传导。本发明还包括这样的拮抗剂抗体及其抗原结合片段：其在实施例6的测定或基本上类似的测定中以723pM至1.8nM范围的IC_{50}值完全抑制瘦素诱导的LEPR信号传导。检测与表达LEPR的细胞结合的抗体的基于细胞的结合测定(例如本文实施例5中描述的测定)显示了与HEK293/hLEPR-GPI细胞的结合，在没有瘦素的条件下结合比率为824至3187倍，在存在1μM瘦素的条件下结合比率为398至3106倍。发现本发明的抗体即使在存在过量的(1μM)瘦素的条件下也能结合LEPR，表明本发明的LEPR抗体结合hLEPR上的不与瘦素结合位点重叠的位点。本发明还包括拮抗瘦素信号传导但也能在不存在瘦素的情况下促进部分LEPR信号传导的抗LEPR抗体；此类抗体在本文中也称为“部分激动剂”或“表现出对LEPR信号传导的激动作用的抗体”。

[0066] 在本发明的某些示例性实施方案中，提供了抗LEPR抗体，所述抗体在存在或不存在瘦素的情况下结合人二聚体LEPR(hLEPR.hFc，SEQ ID NO:92)，而例如通过使用本文实施例4中定义的测定形式或基本上类似的测定发现，本发明的抗体均未显示能将LEPR:瘦素的相互作用阻断40％以上。

[0067] 本发明包括以高亲和力结合单体人LEPR的抗体及其抗原结合片段。例如，本发明包括这样的抗LEPR抗体：通过例如使用如本文实施例3中定义的测定形式或基本上类似的测定，在25℃下用表面等离子体共振测得其以小于约10nM的K_D结合单体人LEPR(例如，hLEPR.mmh，SEQ ID NO:90)，或在37℃下用表面等离子体共振测得其以小于约25nM的K_D结合单体人LEPR(例如，hLEPR.mmh，SEQ ID NO:90)。根据某些实施方案，提供了在25℃下以小于约12nM、小于约11nM、小于约10nM、小于约9nM、小于约8nM、小于约7nM、小于约6nM、小于约5nM、小于约4nM、小于约3nM、小于约2nM、小于约1nM、小于约900pM、小于约800pM、小于约700pM、小于约600pM、小于约500pM、小于约400pM、小于约300pM、小于约200pM或小于约100pM的K_D结合单体人LEPR的抗LEPR抗体，所述K_D通过使用表面等离子共振测得，例如如本文实施例3中定义的测定形式或基本上类似的测定。

[0068] 本发明还包括这样的抗体及其抗原结合片段：通过例如使用如本文实施例3中定义的测定形式或基本上类似的测定，在25℃下用表面等离子体共振测得其以大于约5分钟的解离半衰期(t1/2)结合单体人LEPR(例如，hLEPR.mmh，SEQ ID NO:90)，或在37℃下用表面等离子体共振测得其以大于约1分钟的解离半衰期结合单体人LEPR(例如，hLEPR.mmh，SEQ ID NO:90)。根据某些实施方案，提供了这样的抗LEPR抗体：通过例如使用如本文实施例3中定义的测定形式或基本上类似的测定，用表面等离子体共振测得其在25℃下以大于约5分钟、大于约10分钟、大于约20分钟、大于约40分钟、大于约50分钟或更长的t1/2结合单体人LEPR。

[0069] 本发明还包括以高亲和力结合二聚体人LEPR(例如，hLEPR.mFc，SEQ ID NO:91)的抗体及其抗原结合片段。例如，本发明包括这样的抗LEPR抗体：通过例如使用如本文实施例3中定义的测定形式或基本上类似的测定，在25℃或37℃下用表面等离子体共振测得其以小于约4nM的K_D结合二聚体人LEPR(例如，hLEPR.mFc，SEQ ID NO:91)。根据某些实施方案，

提供了在25℃下以小于约15nM、小于约10nM、小于约9.0nM、小于约8.0nM、小于约7.0nM、小于约6.0nM、小于约5.0nM、小于约4.0nM、小于约3.0nM、小于约2.0nM、小于约1.0nM、小于约900pM、小于约800pM、小于约700pM、小于约600pM、小于约500pM、小于约400pM、小于约300pM、小于约200pM或小于约100pM的K_D结合二聚体人LEPR的抗LEPR抗体，所述K_D通过表面等离子共振测得，例如使用如本文实施例3中定义的测定形式或基本上类似的测定。

[0070] 本发明还包括这样的抗体及其抗原结合片段：通过例如使用如本文实施例3中定义的测定形式或基本上类似的测定，在25℃或37℃下用表面等离子体共振测得其以大于约10分钟的解离半衰期(t1/2)结合二聚体人LEPR(例如，hLEPR.mFc，SEQ ID NO:91)。根据某些实施方案，提供了这样的抗LEPR抗体：通过例如使用如本文实施例3中定义的测定形式或基本上类似的测定，用表面等离子体共振测得其在25℃下以大于约15分钟、约20分钟、大于约30分钟、大于约40分钟、大于50分钟、大于约60分钟、大于约70分钟、大于80分钟、大于90分钟、大于100分钟或更长的t1/2结合二聚体人LEPR。

[0071] 本发明还包括结合与人瘦素复合的LEPR的抗体及其抗原结合片段(“与人瘦素复合的LEPR”也可用“瘦素:LEPR”的表述表示)。例如，本发明包括能够结合包含hLEPR和人瘦素的预形成复合物的抗体及其抗原结合片段。也就是说，根据某些实施方案，与LEPR复合的瘦素的存在不会抑制抗LEPR抗体和LEPR之间的相互作用；同样地，根据本发明的这个方面，抗LEPR抗体的存在不会抑制瘦素和LEPR之间的相互作用。用于确定抗体或其抗原结合片段是否结合与人瘦素复合的LEPR的示例性测定形式示于本文的实施例4中。

[0072] 本发明还包括在存在和/或不存在人瘦素的条件下结合细胞表面表达的LEPR的抗体及其抗原结合片段。细胞表面表达的LEPR是指天然地或者在改造的细胞系中，在细胞表面上表达的LEPR或其部分(例如，LEPR的细胞外部分)，从而抗体或其抗原结合片段能够与LEPR分子结合。在某些实施方案中，细胞表面表达的LEPR包括重组的复合物，其包含LEPR的细胞外结构域，所述细胞外结构域经由标签或锚(例如，本文实施例6中所示的GPI锚)连接至细胞。根据本发明的这个方面，提供了这样的抗体：所述抗体能够在不存在瘦素的情况下结合细胞表面表达的LEPR，并且还能够在存在瘦素的条件下(即，在瘦素能够与细胞表面表达的LEPR结合的条件下)结合细胞表面表达的LEPR。也就是说，根据某些实施方案，与细胞表面表达的LEPR复合的瘦素的存在不会抑制抗LEPR抗体与细胞表面表达的LEPR之间的相互作用。根据本发明的这个方面，抗体能够在细胞表面形成三元复合物，所述复合物包含所述抗体、细胞表面表达的LEPR和瘦素。用于确定抗体或其抗原结合片段是否能够在存在和不存在人瘦素的情况下结合细胞表面表达的LEPR的示例性测定形式示于本文的实施例5中。

[0073] 本发明的抗体可具有一种或多种前述生物学特征，或其任意组合。本发明的抗体的上述生物学特征列表并非详尽无遗。通过阅读本公开内容(包括本文的工作实施例)，本发明的抗体的其他生物学特征对于本领域普通技术人员而言是显而易见的。

表位作图和相关技术

[0074] 本发明的抗体结合的表位可以由LEPR蛋白的3个或更多个(例如，3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个或更多个)氨基酸的单个连续序列组成。或者，所述表位可以由LEPR的多个非连续氨基酸(或氨基酸序列)组成。在一些实施方案中，所述表位位于LEPR的瘦素结合结构域上或位于其附近。在其他实施方案中，所述表位位于不同于

LEPR的瘦素结合结构域的区域，例如，位于LEPR表面上的位置，在所述位置处，当抗体与此类表位结合时，其不会干扰瘦素与LEPR的结合。

[0075] 可以使用本领域普通技术人员已知的各种技术来鉴定由特定抗体识别的表位内的氨基酸。示例性技术包括，例如，丙氨酸扫描突变分析、肽印迹分析和肽切割分析。另外，可以使用诸如表位切除、表位提取和抗原化学修饰的方法(Tomer(2000)Protein Science 9:487-496)。可用于鉴定与抗体相互作用的多肽内的氨基酸的另一种方法是通过质谱法检测的氢/氘交换。一般来说，所述氢/氘交换方法涉及对目的蛋白质进行氘标记，然后使抗体与所述氘标记的蛋白质结合。接下来，将蛋白质/抗体复合物转移到水中以允许在除抗体保护的残基(其保持为氘标记的)之外的所有残基处发生氢-氘交换。在抗体解离后，对靶蛋白进行蛋白酶切割和质谱分析，从而揭示氘标记的残基，所述残基对应于与抗体相互作用的特定氨基酸。参见，例如，Ehring(1999)Analytical Biochemistry 267(2):252-259;Engen and Smith(2001)Anal.Chem.73:256A-265A。对于与抗体相互作用的多肽内的氨基酸，也可通过对与抗原复合的抗体进行X射线晶体学分析来进行鉴定。

[0076] 本发明还包括这样的抗LEPR抗体：其结合的表位与本文所述的任何特定示例性抗体(例如，包含本文表1中列出的任何氨基酸序列的抗体)结合的表位相同。同样地，本发明还包括这样的抗LEPR抗体：其与本文所述的任何特定示例性抗体(例如，包含本文表1中列出的任何氨基酸序列的抗体)竞争结合LEPR。

[0077] 通过使用本领域已知的和本文示例的常规方法，可以确定是否抗体结合的表位与参照抗LEPR抗体结合的表位相同，或抗体与参照抗LEPR抗体是否竞争结合。例如，为了确定测试抗体结合的表位是否与本发明所述参照抗LEPR抗体结合的表位相同，允许所述参照抗体结合LEPR蛋白。接下来，评估测试抗体结合LEPR分子的能力。如果所述测试抗体在所述参照抗LEPR抗体饱和结合后能够结合LEPR，则可以得出结论，认为所述测试抗体结合的表位与所述参照抗LEPR抗体结合的表位不同。另一方面，如果所述测试抗体在所述参照抗LEPR抗体饱和结合后不能结合所述LEPR分子，那么所述测试抗体可以结合与本发明所述参照抗LEPR抗体结合的表位相同的表位。然后可以进行额外的常规实验(例如，肽突变和结合分析)来确认观察到的与测试抗体的不结合是否实际上是由于与参照抗体结合相同的表位，或者是否是空间阻断(或另一个现象)导致观察到的不结合。可以使用ELISA、RIA、Biacore、流式细胞术或本领域可用的任何其他定量或定性抗体结合测定来进行这种实验。根据本发明的某些实施方案，如果在竞争性结合测定中测得过量的例如1、5、10、20或100倍的一个抗体将另一个抗体的结合抑制了至少50％(优选75％、90％或者甚至99％)，则两个抗体结合相同(或重叠)的表位。(参见，例如，Junghans et al.(1990)Cancer Res.50:1495-1502)。或者，如果抗原中基本上所有能减少或消除一个抗体的结合的氨基酸突变减少或消除了另一个抗体的结合，则认为两个抗体结合相同的表位。如果减少或消除一个抗体的结合的氨基酸突变中仅有一小类能减少或消除另一个抗体的结合，则认为两个抗体具有“重叠表位”。

[0078] 为了确定抗体是否与参照抗LEPR抗体竞争结合(或交叉竞争结合)，以两个方向执行上述结合方法：在第一个方向上，使所述参照抗体在饱和条件下与LEPR蛋白结合，然后评估所述测试抗体与所述LEPR分子的结合。在第二方向上，允许所述测试抗体在饱和条件下与LEPR分子结合，然后评估所述参照抗体与所述LEPR分子的结合。如果在两个方向上都是

仅第一(饱和)抗体能够结合所述LEPR分子,则推断所述测试抗体和所述参照抗体竞争结合LEPR。如本领域普通技术人员所理解的,与参照抗体竞争结合的抗体的结合表位可能不一定与所述参照抗体结合的表位相同,而是可以通过结合重叠或相邻的表位来以空间的方式阻断所述参照抗体的结合。

人抗体的制备

[0079] 本发明的抗LEPR抗体可以是完全的人抗体。用于产生单克隆抗体(包括完全的人单克隆抗体)的方法是本领域已知的。任何这种已知的方法都可用于本发明的上下文中,以用于制备特异性结合人LEPR的人抗体。

[0080] 通过例如使用VELOCIMMUNE™技术或任何其他类似的已知方法用于产生完全的人单克隆抗体,最初可以分离出针对LEPR的高亲和力嵌合抗体,其具有人可变区和小鼠恒定区。如下面的实验部分中所述,对所述抗体进行表征和并就想要的特征进行选择,所述特征包括亲和力、配体阻断活性、选择性、表位等。如果需要,将小鼠恒定区替换为想要的人恒定区,例如野生型或修饰的IgG1或IgG4,以产生完全的人抗LEPR抗体。虽然所选的恒定区可根据具体用途而变化,但是可变区中存在高亲和力抗原结合和靶特异性特征。在某些情况下,直接从抗原阳性的B细胞中分离出完全的人抗LEPR抗体。

生物等效物

[0081] 本发明的抗LEPR抗体和抗体片段包括具有这样的氨基酸序列的蛋白质:所述氨基酸序列不同于所述抗体的氨基酸序列但保留了结合人LEPR的能力。当与亲本序列比较时,此类变体抗体和抗体片段包含一个或多个氨基酸的添加、缺失或替换,但显示出与所述抗体的生物学活性基本等效的生物学活性。同样地,当与公开的序列相比时,本发明所述编码抗LEPR抗体的DNA序列包括这样的序列:其包含一个或多个核苷酸的添加、缺失或替换,但编码与本发明的抗LEPR抗体或抗体片段基本上生物等效的抗LEPR抗体或抗体片段。上文中讨论了这种变体氨基酸和DNA序列的实例。

[0082] 如果例如两种抗原结合蛋白或抗体是药物等效物或药物替代物,如当在相似实验条件下以相同的摩尔剂量单剂量或多剂量施用时,它们的吸收率和吸收程度未显示显著差异,则认为所述两种抗原结合蛋白或抗体是生物等效的。如果一些抗体在吸收程度上等效而在其吸收率上不等效,则可被视为等效物或药物替代物,并且还能被认为是生物等效的,因为吸收率上的这种差异是有意为之的并且反映在标记中,对于达到有效体内药物浓度(例如长期使用中)不是必需的,并且被认为对于所研究的特定药物产品而言是医学上无关紧要的。

[0083] 在一个实施方案中,如果两种抗原结合蛋白在其安全性、纯度和效力上没有临床意义上的差异,则它们是生物等效的。

[0084] 在一个实施方案中,如果患者可以在参照产品和生物学产品之间切换一次或多次并且与没有这种转换的持续治疗相比没有预期的不良效应(包括免疫原性的临床显著变化或有效性降低)风险增加,则这两种抗原结合蛋白是生物等效的。

[0085] 在一个实施方案中,如果两种抗原结合蛋白均通过共同机制或作用机制起作用(如已知的此类机制的程度),则它们是生物等效的。

[0086] 生物等效性可以通过体内和体外方法证明。生物等效性的测量包括,例如,(a)在人或其他哺乳动物中的体内试验,其中以时间函数的形式测量血液、血浆、血清或其他生物

液体中抗体或其代谢物的浓度;(b)与人的体内生物利用度数据相关并可合理预测的体外试验;(c)在人或其他哺乳动物中的体内试验,其中以时间函数测量抗体(或其靶标)的适当急性药理效应;和(d)确定抗体的安全性、有效性或生物利用度或生物等效性的具有良好控制的临床试验。

[0087] 本发明所述抗LEPR抗体的生物等效物变体可以通过例如制备残基或序列的各种替换或缺失生物活性不需要的末端或内部残基或序列来构建。例如,可以删除不是生物活性必需的半胱氨酸残基或用其他氨基酸替换,以防止在复性时形成不必要的或不正确的分子内二硫键。在其他情况下,生物等效抗体可包括抗LEPR抗体变体,其包含修饰抗体糖基化特征的氨基酸变化,例如消除或去除糖基化的突变。

物种选择性和物种交叉反应性

[0088] 根据某些实施方案,本发明提供了与人LEPR结合但不与来自其他物种的LEPR结合的抗LEPR抗体。本发明还包括与人LEPR以及与来自一种或多种非人物种的LEPR结合的抗LEPR抗体。例如,本发明的抗LEPR抗体可以与人LEPR结合,并且可以结合或不结合(视情况而定)小鼠、大鼠、豚鼠、仓鼠、沙鼠、猪、猫、狗、兔、山羊、绵羊、牛、马、骆驼、食蟹猴、狨猴、恒河猴或黑猩猩LEPR中的一种或多种。根据本发明的某些示例性实施方案,提供了特异性结合人LEPR和食蟹猴(例如,食蟹猕猴(Macaca fascicularis))LEPR的抗LEPR抗体。本发明的其他抗LEPR抗体结合人LEPR但不结合(或仅很弱地结合)食蟹猴LEPR。

多特异性抗体

[0089] 本发明的抗体可以是单特异性或多特异性的(例如,双特异性的)。多特异性抗体可以对一种靶多肽的不同表位具有特异性,或者可以含有特异性针对多于一种靶多肽的抗原结合结构域。参见,例如,Tutt et al.(1991)J.Immunol.147:60-69;Kufer et al.(2004)Trends Biotechnol.22:238-244。本发明的抗LEPR抗体可以与另一种功能分子(例如另一种肽或蛋白质)连接或共表达。例如,抗体或其片段可以与一种或多种其他分子实体(例如另一种抗体或抗体片段)功能性连接(例如,通过化学偶联、遗传融合、非共价结合或其他方式功能性连接),以产生具有第二结合特异性的双特异性或多特异性抗体。

[0090] 本发明包括双特异性抗体,其中免疫球蛋白的一个臂结合人LEPR,而所述免疫球蛋白的另一个臂对第二抗原具有特异性。结合LEPR的臂可以包含本文表1中示出的任何HCVR/LCVR或CDR氨基酸序列。

[0091] 可以在本发明的上下文中使用的示例性双特异性抗体形式涉及使用第一免疫球蛋白(Ig)C_H3结构域和第二Ig C_H3结构域,其中所述第一和第二Ig C_H3结构域在至少一个氨基酸上彼此不同,并且其中至少一个氨基酸的差异使得所述双特异性抗体与缺乏所述氨基酸差异的双特异性抗体相比,其与蛋白A的结合有所降低。在一个实施方案中,所述第一Ig C_H3结构域结合蛋白A且第二Ig C_H3结构域含有能降低或消除蛋白A结合的突变,例如H95R修饰(通过IMGT外显子编号;H435R通过EU编号)。所述第二C_H3可进一步包含Y96F修饰(通过IMGT编号;Y436F通过EU编号)。所述第二C_H3中可能存在进一步修饰,包括:IgG1抗体情况下的D16E、L18M、N44S、K52N、V57M和V82I(通过IMGT编号;D356E、L358M、N384S、K392N、V397M和V422I通过EU编号);IgG2抗体情况下的N44S,K52N和V82I(通过IMGT编号;N384S,K392N和V422I通过EU编号);IgG4抗体情况下的Q15R、N44S、K52N、V57M、R69K、E79Q和V82I(通过IMGT编号;Q355R、N384S、K392N、V397M、R409K、E419Q和V422I通过EU编号)。上述双特异性抗体形

式的变化涵盖在本发明的范围内。

[0092] 可以在本发明的上下文中使用的其他示例性双特异性形式包括但不限于，例如，基于scFv的或双抗体双特异性形式，IgG-scFv融合体，双可变结构域(DVD)-Ig，四源杂交瘤(Quadroma)，孔洞结构(knobs-into-holes)，共同轻链(例如，带有孔洞结构的共同轻链等)，CrossMab，CrossFab，(SEED)体((SEED)body)，亮氨酸拉链，Duobody，IgG1/IgG2，双作用Fab(DAF)-IgG和Mab^{2}双特异性形式(关于前述形式的评述，参见，例如，Klein et al.(2012)mAbs 4:6,1-11，以及本文中引用的参考文献)。还可以使用肽/核酸缀合构建双特异性抗体，例如，其中使用具有正交化学反应性的非天然氨基酸来产生位点特异性抗体-寡核苷酸缀合物，然后所述抗体-寡核苷酸缀合物自组装成具有明确的组成、化合价和几何形状的多聚体复合物。(参见，例如，Kazane et al.,J.Am.Chem.Soc.[Epub:2012年12月4日]))。

治疗性制剂和施用

[0093] 本发明提供了包含本发明的抗LEPR抗体或其抗原结合片段的药物组合物。将本发明所述药物组合物与合适的运载体、赋形剂和其它能提供改善的转移、递送、耐受性等的试剂一起配制。在所有药物化学家都知道的处方集《雷明登氏药学全书》(Remington's Pharmaceutical Sciences,Mack Publishing Company,Easton,PA)中可以找到许多合适的制剂。这些制剂包括，例如，粉末、糊剂、软膏、凝胶、蜡、油、脂质、含有囊泡的脂质(阳离子或阴离子的)(例如LIPOFECTIN™,Life Technologies,Carlsbad,CA)、DNA缀合物、无水吸收膏、水包油和油包水乳液、卡波蜡乳剂(emulsions carbowax)(具有各种分子量的聚乙二醇)、半固体凝胶和含有卡波蜡(carbowax)的半固体混合物。另参见Powell et al."Compendium of excipients for parenteral formulations"PDA(1998)J Pharm Sci Technol 52:238-311。

[0094] 施用给患者的抗体剂量可以根据患者的年龄和体格、目标疾病、病症、施用途径等而变化。优选的剂量通常根据体重或体表面积算得。在成年患者中，通常以约0.01至约20mg/kg体重(更优选约0.02至约7，约0.03至约5、或约0.05至约3mg/kg体重)的单剂量静脉内施用本发明的抗体为宜。根据病情的严重程度，可以调整治疗的频率和持续时间。施用抗LEPR抗体的有效剂量和时间表可凭经验确定；例如，可以通过定期评估来监测患者进展，并相应调整剂量。此外，可以使用本领域熟知的方法对剂量进行物种间的等比例缩放(例如，Mordenti et al.(1991)Pharmaceut.Res.8:1351)。

[0095] 各种递送系统是已知的并且可用于施用本发明所述药物组合物，例如包封在脂质体、微粒、微胶囊中，能够表达突变病毒的重组细胞，受体介导的内吞作用(参见，例如，Wu et al.(1987)J.Biol.Chem.262:4429-4432)。引入方法包括但不限于，皮内、肌肉内、腹膜内、静脉内、皮下、鼻内、硬膜外和口服途径。所述组合物可以通过任何方便的途径进行施用，例如通过输注或快速注射，通过上皮或粘膜皮肤内层(mucocutaneous linings)(如口粘膜、直肠和肠粘膜等)吸收，并且可以与其他生物活性剂一起施用。施用可以是全身的或局部的。

[0096] 可以用标准注射针和注射器皮下或静脉内递送本发明所述药物组合物。另外，就皮下递送而言，笔式递送装置能方便地应用于递送本发明所述药物组合物。这种笔式递送装置可以是可重复使用的或一次性的。可重复使用的笔式递送装置通常使用含有药物组合物的可更换的药筒。一旦已经施用了药筒内的所有药物组合物并且所述药筒是空的，就可

以很方便地丢弃空药筒并用含有所述药物组合物的新药筒替换。然后可以重复使用所述笔式递送装置。在一次性笔式递送装置中，没有可更换的药筒。实际上，所述一次性笔式递送装置预先装有药物组合物，所述药物组合物保持在所述装置内的贮存器中。一旦所述储存器清空了所述药物组合物，就丢弃整个装置。

[0097] 许多可重复使用的笔式和自动注射器递送装置可应用于皮下递送本发明所述药物组合物。实例包括但不限于，AUTOPEN™(Owen Mumford,Inc.,Woodstock,UK)、DISETRONIC™笔(Disetronic Medical Systems,Bergdorf,Switzerland)、HUMALOG MIX 75/25™笔、HUMALOG™笔、HUMALIN 70/30™笔(Eli Lilly and Co.,Indianapolis,IN)、NOVOPEN™I,II和III(Novo Nordisk,Copenhagen,Denmark)、NOVOPEN JUNIOR™(Novo Nordisk,Copenhagen,Denmark)、BD™笔(Becton Dickinson,Franklin Lakes,NJ)、OPTIPEN™、OPTIPEN PRO™、OPTIPEN STARLET™和OPTICLIK™(sanofi-aventis,Frankfurt,Germany)(仅举几例)。能应用于皮下递送本发明所述药物组合物的一次性笔式递送装置的实例包括但不限于SOLOSTAR™笔(sanofi-aventis)、FLEXPEN™(Novo Nordisk)、以及KWIKPEN™(Eli Lilly)、SURECLICK™自动注射器(Amgen,Thousand Oaks,CA)、PENLET™(Haselmeier,Stuttgart,Germany)、PIPEN(Dey,L.P.)和HUMIRA™笔(Abbott Labs,Abbott Park IL)(仅举几例)。

[0098] 在某些情况下，可以在控释系统中递送所述药物组合物。在一个实施方案中，可以使用泵(参见Langer，同上；Sefton(1987)CRC Crit.Ref.Biomed.Eng.14:201)。在另一个实施方案中，可以使用聚合材料；参见，Medical Applications of Controlled Release,Langer and Wise(eds.)(1974)CRC Pres.,Boca Raton,Florida。在又一个实施方案中，可以将控释系统放置在组合物的靶点附近，因此仅需全身剂量的一小部分(参见，例如，Goodson(1984)in Medical Applications of Controlled Release,supra,vol.2,pp.115-138)。Langer(1990)Science 249:1527-1533的综述中讨论了其他控释系统。

[0099] 可注射制剂可包括用于静脉内、皮下、皮内和肌内注射、滴注等的剂型。这些可注射制剂可通过公知的方法制得。例如，所述可注射制剂可以通过例如将上述抗体或其盐溶解、悬浮或乳化在无菌水性介质或常规用于注射的油性介质中来制得。作为注射用的水性介质，有例如，可以与合适的增溶剂(如醇(例如，乙醇)、多元醇(例如，丙二醇、聚乙二醇))、非离子表面活性剂(例如，聚山梨醇酯80、HCO-50(氢化蓖麻油与聚氧乙烯(50mol)的加合物))等组合使用的生理盐水，含有葡萄糖和其他助剂的等渗溶液等。作为油性介质，使用例如芝麻油、大豆油等，其可以与增溶剂如苯甲酸苄酯、苯甲醇等组合使用。这样制得的注射剂优选填充在合适的安瓿中。

[0100] 有利的是，将上述用于口服或肠胃外使用的药物组合物制备成单位剂量的剂型，所述单位剂量适于与活性成分的剂量匹配。这种单位剂量的剂型包括，例如，片剂、丸剂、胶囊剂、注射剂(安瓿剂)、栓剂等。上述抗体在单位剂量中的含量通常为每种剂型约5至约500mg；特别地，在注射形式中，对于其它剂型，优选地，上述抗体的含量为约5至约100mg以及约10至约250mg。

抗体的治疗用途

[0100] 本发明包括这样的方法：其包括向有需要的个体施用治疗组合物，所述治疗组合物包含拮抗剂抗LEPR抗体(例如，包含本文表1中示出的任何HCVR/LCVR或CDR序列的抗LEPR

抗体)。所述治疗组合物可以包含本文公开的任何抗LEPR抗体,或其抗原结合片段,以及药学上可接受的运载体或稀释剂。

[0101] 本发明的抗体尤其可用于治疗、预防和/或缓解这样的疾病和病症:任何与升高的瘦素水平(高瘦素血症)和/或导致过量的LEPR信号传导的OB-R瘦素受体表达升高相关或由其介导的疾病或病症。在各种实施方案中,疾病或病症选自但不限于:厌食症或其他精神疾病进食障碍、慢性肾病恶病质、其他恶病质(如充血性心力衰竭恶病质、肺恶病质、放射恶病质和癌症恶病质)、自身免疫性疾病(如炎性肠病、红斑狼疮、多发性硬化症、牛皮癣)、心血管疾病、血压升高、抑郁症、神经退行性疾病、癌症(如肝细胞癌、黑色素瘤和乳腺癌)。

[0102] 本发明还包括可用于拮抗表达正常水平或高水平瘦素的细胞、组织和器官中的LEPR信号传导的抗LEPR抗体及其抗原结合片段。如本文所用,在存在瘦素的条件下表现出增强的信号传导的LEPR突变体(与野生型LEPR相比)被称为"信号传导增强的LEPR突变体"。示例性的信号传导增强的LEPR突变为LEPR-Q223R(Chagnon et al.(2009)Journal of Clinical Endocrinology&Metabolism 85(1):29-34)。因此,本发明包括可用于治疗、预防和/或缓解由信号传导增强的LEPR突变体引起或与之相关的疾病和病症的抗LEPR抗体及其抗原结合片段。

[0103] 在本文所述的治疗方法的背景下,所述抗LEPR抗体可以作为单一疗法(即,作为唯一的治疗剂)或与一种或多种其他治疗剂(其实例在本文的其他地方有描述)组合进行施用。

组合疗法和制剂

[0104] 本发明包括包含本文所述的任何抗LEPR抗体和一种或多种其他治疗活性组分的组合物和治疗制剂,以及包括向有此需要的个体施用这些组合物的治疗方法法。

[0105] 本发明的抗LEPR拮抗剂抗体可以与一种或多种其他治疗性活性成分共同配制和/或组合施用,如例如用于治疗以下疾病的药物产品:充血性心力衰竭恶病质、肺恶病质和癌症恶病质、自身免疫性疾病(如炎性肠病、红斑狼疮、多发性硬化症、牛皮癣)、心血管疾病、血压升高、神经退行性疾病、抑郁症、癌症(如肝细胞癌、黑色素瘤、乳腺癌)以及与瘦素信号传导降低相关或由其导致的其他疾病和病症。此类其它治疗活性组分的实例包括但不限于,例如,血管紧张素转换酶抑制剂(例如,ACE、ACE-I、贝那普利、卡托普利、依那普利、福辛普利、赖诺普利、莫昔普利、培哚普利、喹那普利、雷米普利、群多普利)、血管紧张素受体阻断剂(例如,ARB)、平滑肌松弛剂(例如,肼苯哒嗪)、长效硝酸盐(例如,有或没有如ACE-I和ARB的硝酸异山梨酯)、利尿剂(例如,袢利尿剂、噻嗪类利尿剂和保钾利尿剂)、缺铁性贫血治疗剂(如,肠胃外铁)、长期或短效的支气管扩张剂(例如,β2激动剂如阿福特罗、布酚宁、克仑特罗、多培沙明、肾上腺素、芬忒醇、福莫特罗、异他林、异丙肾上腺素、、左沙丁胺醇、奥西那林、吡布特罗、丙卡特罗、利托君、沙丁胺醇、特布他林、噻托溴铵)、抗胆碱能剂(例如,莨菪碱、阿托品、苯巴比妥、东莨菪碱、双环胺、苯巴比妥、甲哌佐酯以及如阿托品、莨菪碱、苯巴比妥和东莨菪碱的组合物)、皮质类固醇(例如,氢化可的松、氢化可的松-17-戊酸酯、氢化可的松-17-丁酸酯、泼尼松、泼尼松龙、曲安奈德、曲安西龙醇、倍他米松、地塞米松、氟可龙、氟尼缩松、布地奈德)、长期抗生素(例如,大环内酯如红霉素、阿奇霉素以及甲基黄嘌呤类如茶碱)非甾体类抗炎药(NSAID)(例如,阿司匹林、塞来昔布、双氯芬酸、二氟尼柳、依托度酸、布洛芬、吲哚美辛、酮洛芬、萘普生、奥沙普嗪、吡罗昔康、双水杨酸酯、舒林酸、托美

汀等)、5-氨基水杨酸(5-ASA)(例如美沙拉嗪)、免疫抑制剂(如泼尼松、TNF抑制剂、硫唑嘌呤、甲氨蝶呤、6-巯基嘌呤)、复发-缓解型多发性硬化症治疗物(例如,干扰素β-1a、干扰素β-1b、醋酸格拉替雷、米托蒽醌、那他珠单抗、芬戈莫德、特立氟胺、富马酸二甲酯、阿仑单抗、达克珠单抗、CD20单克隆抗体如利妥昔单抗、奥瑞珠单抗和奥法木单抗)、用于治疗牛皮癣的局部药物(例如,局部药物如对氨基苯甲酸、椰子油、煤焦油、地蒽酚、皮质类固醇如去羟米松、醋酸氟轻松、维生素D_3和其他维生素D类似物,补骨脂素和全身药物如甲氨蝶呤、环孢素、羟基脲、富马酸盐如富马酸二甲酯和类视黄醇)、TNF-α拮抗剂(例如,英夫利昔单抗、阿达木单抗、戈利木单抗和赛妥珠单抗)、靶向T细胞的牛皮癣治疗物(例如,依法利珠单抗和阿法赛特),高血压和心血管疾病的治疗物(例如,阿司匹林,他汀类如阿托伐他汀、氟伐他汀、洛伐他汀、美伐他汀、匹伐他汀、普伐他汀、罗苏伐他汀、辛伐他汀以及组合物如辛伐他汀+依泽替米贝、洛伐他汀+烟酸、和阿托伐他汀+氨氯地平)、神经退行性疾病的治疗物(例如,迪姆朋(dimebon)和富含脯氨酸的肽(PRP)-1)、抗抑郁药(例如,舍曲林、西酞普兰、氟西汀、依他普仑、曲唑酮、文拉法辛、安非他酮、度洛西汀、帕罗西汀、阿米替林、文拉法辛、去甲文拉法辛和去甲替林)和抗癌治疗物(例如,索拉非尼、JX-594、白细胞介素-2、易普利姆玛(Yervoy)、纳武单抗(Opdivo)、帕博利珠单抗(Keytruda)、威罗菲尼(Zelboraf)、达帕菲尼(Tafinlar)、曲美替尼(Mekinist)、蒽环类抗生素如阿霉素(Adriamycin®)、表柔比星(Ellence®)、紫杉烷类如紫杉醇(Taxol®)和多西紫杉醇(Taxotere®)、5-氟尿嘧啶(5-FU)、环磷酰胺(Cytoxan®)、卡铂(Paraplatin®)或其组合)。

施用方案

[0106] 根据本发明的某些实施方案,可以在定义的时间进程内施用多个剂量的抗LEPR拮抗剂抗体(或包含抗LEPR拮抗剂抗体和本文提及的任何其他治疗性活性剂的组合的药物组合物)。根据本发明的这个方面所述的方法包括向个体依次施用多个剂量的本发明的抗LEPR抗体。本文所用的"依次施用"是指将每个剂量的抗LEPR抗体在不同时间点施用给个体,例如,在以预定间隔(例如数小时、数天、数周或数月)隔开的不同日施用。本发明包括这样的方法:其包括依次向患者施用单一初始剂量的抗LEPR抗体,然后施用一种或多种第二剂量的所述抗LEPR抗体,并且任选地随后施用一种或多种第三剂量的所述抗LEPR抗体。

[0107] 术语"初始剂量"、"第二剂量"和"第三剂量"是指施用本发明的抗LEPR抗体的时间顺序。因此,"初始剂量"是在治疗方案开始时所施用的剂量(也称为"基线剂量"、"负荷剂量","开始剂量"等);"第二剂量"是在初始剂量后施用的剂量;"第三剂量"是在第二剂量后施用的剂量。所述初始、第二和第三剂量可以全部含有相同量的抗LEPR抗体,但是在施用频率方面通常可以彼此不同。然而,在某些实施方案中,在所述初始、第二和/或第三剂量中包含的抗LEPR抗体的量在治疗过程中彼此不同(例如,在适当时向上或向下调整)。在某些实施方案中,两个或更多个(例如,2、3、4或5个)剂量在治疗方案开始时作为"负荷剂量"施用,然后以较小频率施用后续剂量(例如"维持剂量")。

抗体的诊断和分析用途

[0108] 本发明的抗LEPR抗体还可用于检测和/或测量样品中的LEPR或表达LEPR的细胞,用于例如诊断的目的。例如,抗LEPR抗体或其片段可用于诊断以LEPR的异常表达(例如,过表达、表达不足、不表达等)为特征的病症或疾病。针对LEPR的示例性诊断测定可以包括,例

如,使获自患者的样品与本发明的抗LEPR抗体接触,其中所述抗LEPR抗体被可检测的标记或报告分子标记。或者,未标记的抗LEPR抗体可以与第二抗体组合用于诊断应用,所述第二抗体本身是可检测标记的。可检测的标记或报告分子可以是放射性同位素,例如^{3}H、^{14}C、^{32}P、^{35}S或^{125}I;荧光或化学发光部分如异硫氰酸荧光素或罗丹明;或酶,如碱性磷酸酶、β-半乳糖苷酶、辣根过氧化物酶或荧光素酶。可用于检测或测量样品中LEPR的具体示例性测定包括酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)和荧光激活细胞分选术(FACS)。

[0109] 根据本发明,可用于LEPR诊断测定的样品包括可从患者处获得的任何组织或流体样品,所述组织或流体样品在正常或病理条件下含有可检测量的LEPR蛋白或其片段。通常会测定从健康患者(例如,未患有与异常的LEPR水平或活性相关的疾病或病症的患者)处获得的特定样品中的LEPR水平,以初始地建立LEPR的基线或标准水平。然后可将所述LEPR基线水平与在获自疑似患有LEPR相关疾病或病症的个体的样品中测得的LEPR水平进行比较。

实施例

[0110] 提出以下实施例以向本领域普通技术人员提供如何制备和使用本发明的方法和组合物的完整公开和描述,并且这些实施例不旨在限制发明人认为是他们的发明的范围。已经努力确保所使用的数字(例如,量,温度等)的准确性,但是仍应该考虑一些实验误差和偏差。除非另有说明,份数是重量份,分子量是平均分子量,温度是摄氏度,压力是大气压或接近大气压。

实施例1.特异性结合瘦素受体(LEPR)的抗原结合蛋白的产生

[0111] 通过用包含LEPR细胞外结构域的免疫原免疫VELOCIMMUNE®小鼠(即,包含编码人免疫球蛋白重链和κ轻链可变区的DNA的改造的小鼠)获得了抗LEPR抗体。通过LEPR特异性免疫测定监测抗体免疫应答。通过使用先前描述的技术,分离并纯化出了完全人抗LEPR抗体。

[0112] 在下面列出的实施例中详细描述了根据本实施例的方法产生的示例性抗LEPR抗体的某些生物学特性。

实施例2.重链和轻链可变区的氨基酸和核酸序列

[0113] 表1示出了选自本发明的抗LEPR抗体的重链和轻链可变区和CDR的氨基酸序列标识符。相应的核酸序列标识符示于表2中。

表1:氨基酸序列标识符

	序列编号（SEQ ID NO）：							
抗体名称	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H4H17322P2	2	4	6	8	10	12	14	16
H4H18437P2	18	20	22	24	10	12	14	16
H4H18439P2	26	28	30	32	10	12	14	16
H4H18440P2	34	36	38	40	10	12	14	16
H4H18457P2	42	44	46	48	10	12	14	16
H4H18462P2	50	52	54	56	10	12	14	16
H4H18464P2	58	60	62	64	10	12	14	16
H4H18466P2	66	68	70	72	10	12	14	16
H4H18508P2	74	76	78	80	82	84	86	88

表2:核酸序列标识符

	序列编号（SEQ ID NO）：							
抗体名称	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H4H17322P2	1	3	5	7	9	11	13	15
H4H18437P2	17	19	21	23	9	11	13	15
H4H18439P2	25	27	29	31	9	11	13	15
H4H18440P2	33	35	37	39	9	11	13	15
H4H18457P2	41	43	45	47	9	11	13	15
H4H18462P2	49	51	53	55	9	11	13	15
H4H18464P2	57	59	61	63	9	11	13	15
H4H18466P2	65	67	69	71	9	11	13	15
H4H18508P2	73	75	77	79	81	83	85	87

[0114] 本文通常根据以下命名法提及抗体:Fc前缀(例如“H4H”、“H1M”、“H2M”等),然后是数字标识符(例如“17322”、“18457”等),然后是“P”或“N”后缀。因此,根据该命名法,抗体在本文中可称为例如“H4H17322P2”、“H4H18457P2”等。本文使用的抗体名称上的Fc前缀(H4H、H1M和H2M)表示所述抗体的特定Fc区同种型。例如,“H4H”抗体具有人IgG4Fc,而“H1M”抗体具有小鼠IgG1Fc,(如抗体名称中的第一个“H”所示,所有可变区均为完全人的)。本领域普通技术人员应当理解,具有特定Fc同种型的抗体可以转化为具有不同Fc同种型的抗体(例如,具有小鼠IgG1Fc的抗体可以转化为具有人IgG4的抗体等),然而无论如何,由表1和2中所示的数字标识符表示的可变结构域(包括CDR)将保持不变,并且无论Fc结构域的性质如何,结合特性都预期相同或基本相似。

[0115] 比较抗体。以下实施例中使用的比较抗体是指Fab 9F8,其描述于Fazeli et al.(2006)J Immunol Methods 312:190-200和Carpenter et al.(2012)Structure 20(3):487-97.中。

实施例3.人单克隆抗LEPR抗体的表面等离子共振衍生的结合亲和力和动力学常数

[0116] 利用Biacore 4000仪器使用实时表面等离子共振生物传感器测定了抗原与本发明的纯化的抗LEPR单克隆抗体结合的平衡解离常数(K_D值)。所有的结合研究都在25℃和37℃下,在含有10mM HEPES、150mM NaCl、3mM EDTA和0.05％v/v表面活性剂吐温-20(pH 7.4)的运行缓冲液(HBS-ET运行缓冲液)中进行。Biacore传感器表面首先通过胺类与单克隆小

鼠抗人Fc抗体(GE,#BR-1008-39)偶联而衍生化为捕获抗LEPR单克隆抗体。就抗LEPR单克隆抗体的结合进行测试的LEPR试剂包括:表达出来具有C末端myc-myc-六组氨酸标签的重组人LEPR的细胞外结构域(hLEPR.MMH;SEQ ID NO:90)、表达出来具有C末端myc-myc-六组氨酸标签的重组食蟹猴LEPR的细胞外结构域(mfLEPR.MMH;SEQ ID NO:93)、表达出来具有C末端myc-myc-六组氨酸标签的重组小鼠LEPR的细胞外结构域(mLEPR.MMH;SEQ ID NO:94)、表达出来具有C末端myc-myc-六组氨酸标签的重组大鼠LEPR的细胞外结构域(rLEPR.MMH;SEQ ID NO:95),表达出来具有C末端小鼠IgG2a Fc标签的重组人LEPR的细胞外结构域(hLEPR.mFc;SEQ ID NO:91)。包含MMH标签的LEPR构建体是单体LEPR构建体,并且包含mFc标签的LEPR构建体是二聚体LEPR构建体。首先,在HBS-ET运行缓冲液中以3倍系列稀释度制备终浓度范围为100nM至3.7nM的不同浓度的LEPR试剂,然后以30μL/分钟的流速将其注射到抗LEPR单克隆抗体捕获表面,持续4分钟。在HBS-ET运行缓冲液中对单克隆抗体结合LEPR试剂的解离监测10分钟。通过使用Scrubber 2.0c曲线拟合软件将实时结合传感图拟合至具有质量转运限制的1:1结合模型来确定动力学结合(k_a)和解离(k_d)速率常数。根据动力学速率常数计算结合解离平衡常数(K_D)和解离半衰期(t1/2):

$$K_D\,(M) = \frac{kd}{ka} \text{ 和 } t½\,(min) = \frac{\ln(2)}{60*kd}。$$

[0117] 在25℃和37℃下,hLEPR-MMH、mfLEPR-MMH、hLEPR.mFc、mLEPR-MMH或rLEPR-MMH与本发明的不同抗LEPR单克隆抗体结合的结合动力学参数示于表3-13中。

表3:在25℃下抗LEPR抗体结合hLEPR-MMH的结合动力学参数

捕获的 mAb	mAb 捕获水平(RU)	结合的100nM hLEPR-MMH (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	t½ (min)
H4H17322P2	178 ± 1.2	66	4.38E+04	2.24E-04	5.11E-09	52
H4H18437P2	171 ± 0.5	56	5.74E+04	3.75E-03	6.53E-08	3.1
H4H18439P2	156 ± 0.7	21	1.07E+04	1.13E-03	1.06E-07	10
H4H18440P2	170 ± 0.5	71	4.23E+04	4.97E-04	1.18E-08	23
H4H18457P2	166 ± 0.9	119	2.55E+05	2.52E-03	9.89E-09	5
H4H18462P2	175 ± 0.6	34	6.79E+04	7.65E-03	1.13E-07	1.5
H4H18464P2	160 ± 0.4	60	1.24E+05	1.13E-03	9.09E-09	10
H4H18466P2	161 ± 0.5	24	2.64E+04	5.11E-03	1.94E-07	2.3
H4H18508P2	180 ± 1.5	127	1.76E+05	1.67E-03	9.53E-09	7
比较抗体	380 ± 8.2	26	4.48E+04	7.46E-05	1.66E-09	155
同种型对照抗体	171 ± 0.4	4	NB*	NB*	NB*	NB*

*NB表示在当前实验条件下未观察到结合。

表4:在37℃下抗LEPR抗体结合hLEPR-MMH的结合动力学参数

捕获的 mAb	mAb 捕获水平(RU)	结合的 100nM hLEPR-MMH (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (min)
H4H17322P2	225 ± 3	99	6.95E+04	8.12E-04	1.17E-08	14
H4H18437P2	213 ± 3	55	1.14E+05	8.84E-03	7.76E-08	1.3
H4H18439P2	180 ± 1.5	19	2.32E+04	4.69E-03	2.02E-07	2.5
H4H18440P2	207 ± 1.2	95	6.34E+04	1.73E-03	2.73E-08	7
H4H18457P2	198 ± 1.6	108	3.45E+05	8.55E-03	2.48E-08	1.4

表4:在37℃下抗LEPR抗体结合hLEPR-MMH的结合动力学参数

捕获的 mAb	mAb 捕获水平(RU)	结合的 100nM hLEPR-MMH (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (min)
H4H18462P2	204 ± 2.1	31	4.58E+04	1.14E-02	2.48E-07	1.0
H4H18464P2	185 ± 1.2	68	1.54E+05	3.15E-03	2.05E-08	3.7
H4H18466P2	184 ± 1.3	26	4.55E+04	6.74E-03	1.48E-07	1.7
H4H18508P2	204 ± 1.4	117	2.69E+05	6.88E-03	2.55E-08	1.7
比较抗体	315 ± 7.6	37	5.39E+04	4.81E-04	8.92E-09	24
同种型对照抗体	193 ± 1.5	6	NB*	NB*	NB*	NB*

*NB表示在当前实验条件下未观察到结合。

[0118] 如表3中所示,在25℃下,本发明的抗LEPR单克隆抗体以范围为5.11nM至194nM的K_D值与hLEPR-MMH结合。如表4中所示,在37℃下,本发明的抗LEPR单克隆抗体以范围为11.7nM至248nM的K_D值与hLEPR-MMH结合。

表5:在25℃下抗LEPR抗体结合mfLEPR-MMH的结合动力学参数

捕获的 mAb	mAb 捕获水平（RU）	结合的 100nM mfLEPR-MMH（RU）	k_a（1/Ms）	k_d（1/s）	K_D（M）	t½（min）
H4H17322P2	177 ± 0.5	102	7.02E+04	2.92E-04	4.16E-09	40
H4H18437P2	171 ± 0.3	70	6.87E+04	4.05E-03	5.89E-08	2.9
H4H18439P2	155 ± 0.5	22	1.57E+04	1.52E-03	9.63E-08	8
H4H18440P2	170 ± 0.9	67	4.95E+04	2.68E-03	5.41E-08	4.3
H4H18457P2	165 ± 0.4	133	2.73E+05	3.31E-03	1.22E-08	3.5
H4H18462P2	174 ± 0.4	42	7.42E+04	1.33E-02	1.79E-07	0.9
H4H18464P2	159 ± 0.4	15	3.82E+04	2.31E-03	6.04E-08	5.0
H4H18466P2	161 ± 0.5	30	4.50E+04	6.69E-03	1.48E-07	1.7
H4H18508P2	178 ± 0.4	145	2.04E+05	1.63E-03	8.00E-09	7
比较抗体	359 ± 4.8	1	NB*	NB*	NB*	NB*
同种型对照抗体	171 ± 0.4	0	NB*	NB*	NB*	NB*

*NB表示在当前实验条件下未观察到结合。

表6:在37℃下抗LEPR抗体结合mfLEPR-MMH的结合动力学参数

捕获的 mAb	mAb 捕获水平（RU）	结合的 100nM mfLEPR-MMH（RU）	k_a（1/Ms）	k_d（1/s）	K_D（M）	t½（min）
H4H17322P2	218 ± 1.7	142	1.43E+05	1.10E-03	7.72E-09	10
H4H18437P2	207 ± 1.4	58	8.69E+04	1.27E-02	1.47E-07	0.9
H4H18439P2	178 ± 1.4	14	4.69E+04	7.92E-03	1.69E-07	1.5
H4H18440P2	204 ± 1	66	7.15E+04	7.24E-03	1.01E-07	1.6
H4H18457P2	195 ± 1.4	117	3.47E+05	1.04E-02	3.00E-08	1.1
H4H18462P2	199 ± 1.1	28	1.29E+05	3.37E-02	2.61E-07	0.3
H4H18464P2	183 ± 0.6	13	3.92E+04	8.41E-03	2.15E-07	1.4
H4H18466P2	181 ± 0.9	27	8.43E+04	1.38E-02	1.64E-07	0.8
H4H18508P2	200 ± 1	125	2.85E+05	7.89E-03	2.77E-08	1.5
比较抗体	298 ± 3.2	-1	NB*	NB*	NB*	NB*
同种型对照抗体	190 ± 1	1	NB*	NB*	NB*	NB*

*NB表示在当前实验条件下未观察到结合。

[0119] 如表5中所示，在25℃下，本发明的抗LEPR单克隆抗体以范围为4.16nM至179nM的K_D值结合mfLEPR-MMH。如表6中所示，在37℃下，本发明的抗LEPR单克隆抗体以范围为

7.72nM至261nM的K_D值结合mfLEPR-MMH。

表7:在25℃下抗LEPR抗体结合hLEPR-mFc的结合动力学参数

捕获的 mAb	mAb 捕获水平（RU）	结合的100nM hLEPR-mFc（RU）	k_a（1/Ms）	k_d（1/s）	K_D（M）	t½（min）
H4H17322P2	176 ± 0.4	74	6.45E+04	1.14E-04	1.77E-09	102
H4H18437P2	169 ± 1.1	70	1.02E+05	5.36E-04	5.27E-09	22
H4H18439P2	155 ± 0.2	53	4.87E+04	1.80E-04	3.69E-09	64
H4H18440P2	169 ± 0.5	140	1.54E+05	6.82E-05	4.43E-10	169

表7:在25℃下抗LEPR抗体结合hLEPR-mFc的结合动力学参数

捕获的 mAb	mAb 捕获水平（RU）	结合的100nM hLEPR-mFc（RU）	k_a（1/Ms）	k_d（1/s）	K_D（M）	t½（min）
H4H18457P2	165 ± 0.8	149	4.91E+05	4.23E-04	8.63E-10	27
H4H18462P2	173 ± 0.5	68	9.08E+04	2.96E-04	3.26E-09	39
H4H18464P2	159 ± 0.4	84	2.11E+05	1.88E-04	8.91E-10	61
H4H18466P2	160 ± 0.2	37	3.97E+04	4.72E-04	1.19E-08	24
H4H18508P2	178 ± 0.4	138	2.21E+05	2.99E-04	1.35E-09	39
比较抗体	344 ± 4.9	36	1.56E+05	1.45E-05	9.28E-11	798
同种型对照抗体	170 ± 0.7	-2	NB*	NB*	NB*	NB*

*NB表示在当前实验条件下未观察到结合。

表8:在37℃下抗LEPR抗体结合hLEPR-mFc的结合动力学参数

捕获的 mAb	mAb 捕获水平（RU）	结合的 100nM hLEPR-mFc（RU）	k_a（1/Ms）	k_d（1/s）	K_D（M）	t½（min）
H4H17322P2	214 ± 1.8	105	1.33E+05	4.40E-04	3.31E-09	26
H4H18437P2	202 ± 1.1	88	1.29E+05	5.56E-04	4.30E-09	21
H4H18439P2	176 ± 0.7	67	6.09E+04	9.23E-04	1.51E-08	13
H4H18440P2	200 ± 1.4	181	2.12E+05	1.12E-04	5.27E-10	103
H4H18457P2	193 ± 1	166	5.56E+05	7.04E-04	1.27E-09	16
H4H18462P2	196 ± 0.9	84	1.28E+05	5.43E-04	4.26E-09	21
H4H18464P2	182 ± 0.4	105	4.04E+05	5.17E-04	1.28E-09	22
H4H18466P2	179 ± 1	52	5.87E+04	5.20E-04	8.86E-09	22
H4H18508P2	198 ± 1	146	4.71E+05	1.02E-03	2.16E-09	11
比较抗体	288 ± 2.5	50	1.50E+05	7.74E-05	5.14E-10	149
同种型对照抗体	188 ± 0.8	1	NB*	NB*	NB*	NB*

*NB表示在当前实验条件下未观察到结合。

[0120] 如表7中所示，在25℃下，本发明的抗LEPR单克隆抗体以范围为443pM至11.9nM的K_D值结合hLEPR-mFc。如表8中所示，在37℃下，本发明的抗LEPR单克隆抗体以范围为527pM至15.1nM的K_D值结合hLEPR-mFc。

表9：在25℃下抗LEPR抗体结合mLEPR-MMH的结合动力学参数

捕获的 mAb	mAb 捕获水平（RU）	结合的 100nM mLEPR-MMH（RU）	k_a（1/Ms）	k_d（1/s）	K_D（M）	t½（min）
H4H17322P2	176	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H18437P2	169	6	1.58E+04	4.18E-03	2.64E-07	2.8
H4H18439P2	155	-2	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H18440P2	169	-3	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H18457P2	164	1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H18462P2	173	2	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H18464P2	159	-1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H18466P2	160	1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H18508P2	177	25	2.78E+05	6.07E-02	2.18E-07	0.19
比较抗体	334 ± 2.5	2	NB*	NB*	NB*	NB*
同种型对照抗体	169	-2	NB*	NB*	NB*	NB*

*NB表示在当前实验条件下未观察到结合。

表10:在37℃下抗LEPR抗体结合mLEPR-MMH的结合动力学参数

捕获的 mAb	mAb 捕获水平（RU）	结合的 100nM mLEPR-MMH（RU）	k_a（1/Ms）	k_d（1/s）	K_D（M）	$t½$（min）
H4H17322P2	212	-1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H18437P2	201	6	1.15E+04	1.33E-02	1.16E-06	0.9
H4H18439P2	175	-1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H18440P2	200	-1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H18457P2	191	-1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H18462P2	194	3	IC*	IC*	IC*	IC*
H4H18464P2	181	1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H18466P2	178	3	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H18508P2	196	17	5.12E+05	1.05E-01	2.05E-07	0.11
比较抗体	283 ± 1.1	0	NB*	NB*	NB*	NB*
同种型对照抗体	187	0	NB*	NB*	NB*	NB*

*NB表示在当前实验条件下未观察到结合。

*IC表明观察到的结合是包容性的,并且在当前实验条件下不能拟合实时结合数据。

[0121] 如表9中所示,在25℃下,本发明的9种抗LEPR单克隆抗体中有2种以218nM和264nM的K_D值结合mLEPR-MMH。如表10中所示,在37℃下,本发明的9种抗LEPR单克隆抗体中有2种以205nM和1.16μM的K_D值结合mLEPR-MMH。

表11:在25℃下抗LEPR抗体结合rLEPR-MMH的结合动力学参数

捕获的 mAb	mAb 捕获水平（RU）	结合的 100nM rLEPR-MMH（RU）	k_a（1/Ms）	k_d（1/s）	K_D（M）	t½（min）
H4H17322P2	176 ± 0.9	10	IC*	IC*	IC*	IC*
H4H18437P2	169 ± 0.2	13	4.21E+04	1.38E-02	3.28E-07	0.8
H4H18439P2	155 ± 0.2	-1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H18440P2	169 ± 0.4	-2	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H18457P2	164 ± 0.5	18	2.83E+04	2.06E-02	7.30E-07	0.6
H4H18462P2	173 ± 0.2	5	3.21E+04	1.08E-02	3.36E-07	1.1
H4H18464P2	159 ± 0	-1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H18466P2	160 ± 0.6	5	2.10E+04	1.98E-02	9.43E-07	0.6
H4H18508P2	177 ± 0.1	22	1.39E+05	4.76E-02	3.41E-07	0.24
比较抗体	328 ± 1.6	1	NB*	NB*	NB*	NB*
同种型对照抗体	170 ± 0.2	-1	NB*	NB*	NB*	NB*

*NB表示在当前实验条件下未观察到结合。

*IC表明观察到的结合是包容性的，并且在当前实验条件下不能拟合实时结合数据。

表12：在37℃下抗LEPR抗体结合rLEPR-MMH的结合动力学参数

捕获的 mAb	mAb 捕获水平（RU）	结合的 100nM rLEPR-MMH（RU）	k_a（1/Ms）	k_d（1/s）	K_D（M）	t½（min）
H4H17322P2	212 ± 0.3	9	9.32E+04	3.28E-02	3.52E-07	0.4
H4H18437P2	200 ± 0	10	3.07E+04	1.93E-02	6.29E-07	0.6
H4H18439P2	175 ± 0.8	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H18440P2	200 ± 0.1	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H18457P2	192 ± 0.3	16	3.02E+04	1.75E-02	5.80E-07	0.7
H4H18462P2	194 ± 0.9	5	IC*	IC*	IC*	IC*
H4H18464P2	181 ± 0.1	1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H18466P2	177 ± 0.7	6	3.26E+04	2.52E-02	7.71E-07	0.5
H4H18508P2	196 ± 1.6	17	2.71E+05	4.57E-02	1.68E-07	0.25
比较抗体	279 ± 0.4	-1	NB*	NB*	NB*	NB*
同种型对照抗体	186 ± 0.1	0	NB*	NB*	NB*	NB*

*NB表示在当前实验条件下未观察到结合。

*IC表明观察到的结合是包容性的，并且在当前实验条件下不能拟合实时结合数据。

[0122] 如表11中所示，在25℃下，本发明的9种抗LEPR单克隆抗体中有2种以范围为328nM

至943nM的K_D值结合rLEPR-MMH。如表12中所示，在37℃下，本发明的9种抗LEPR单克隆抗体中有5种以范围为168nM至771nM的K_D值结合rLEPR-MMH。

实施例4.本发明的抗LEPR抗体不阻断hLEPR-hFc与hLeptin的结合

[0123] 使用竞争性夹心ELISA测量了本发明的抗LEPR单克隆抗体阻断二聚体人LEPR与其天然配体人瘦素的结合的能力。

[0124] 对于ELISA，将5μg/mL浓度的人瘦素(hLeptin;R&D Systems,#398-LP-01M)PBS溶液在96孔微量滴定板上在4℃下包被过夜。随后使用含0.5％(w/v)BSA的PBS溶液封闭非特异性结合位点。用抗LEPR抗体、hLeptin蛋白或连续稀释范围为8.5pM至500nM的同种型对照抗体滴定10nM恒定量的LEPR蛋白细胞外结构域部分，所述细胞外结构域部分被表达成具有C-末端人Fc标签(hLEPR.hFc;SEQ ID NO:92)。然后将这些抗体-蛋白质或蛋白质-蛋白质复合物在室温(RT)下孵育1.5小时。随后将复合物转移至涂有hLeptin的微量滴定板上并在RT下孵育2小时，洗涤孔，并用缀合有辣根过氧化物酶(Jackson ImmunoResearch Inc,#109-035-098)的抗人IgG多克隆抗体检测与平板结合的hLEPR-hFc。样品用TMB溶液(BD Biosciences,#555214;按照制造商的说明以1:1的比例混合底物A和B)显色以产生比色反应，然后用1M硫酸中和，然后在Victor X5读板器上测量450nm处的吸光度。使用Prism™软件(GraphPad)内的S形剂量-应答(sigmoidal dose-response)模型进行数据分析。计算所测抗体最大浓度下的百分比阻断作为所述抗体阻断平板上10nM hLEPR-hFc与人瘦素结合的能力的指标。在计算中，将在没有抗体存在下的10nM hLEPR-hFc的结合信号称为100％结合或0％阻断;并将在不存在hLEPR-hFc条件下的单独缓冲液的基线信号称为0％结合或100％阻断。表13总结了500nM抗体浓度下的阻断数据。

表13:ELISA测定抗LEPR抗体阻断hLEPR-hFc与hLeptin的结合

抗体	500nM 抗体对 10nM hLEPR-hFc 结合 hLeptin 的阻断 (阻断%)
H4H18440P2	3
H4H18466P2	2
H4H18457P2	4
H4H18437P2	9
H4H18464P2	-5
H4H17322P2	13
H4H18439P2	-1
H4H18462P2	14
H4H18508P2	40
对照	
同种型对照抗体	-3
人瘦素	99
比较抗体	99
小鼠 IgG2a 同种型对照	32

[0125] 如表13中所示，对于hLEPR-hFc与包被于表面的hLeptin的结合，本发明的抗LEPR

抗体均未显示出>40％的阻断。然而，作为阳性对照的比较抗体和hLeptin能够将hLEPR-hFc与包被于表面的hLeptin的结合阻断99％。同种型对照抗体在高达500nM的浓度下未显示出可测得的阻断。

实施例5.通过FACS分析用HEK293/Mycx2-hLEPR(ecto)-GPI锚定细胞进行的细胞结合

[0126] 瘦素受体LEPR是I类细胞因子受体家族的单次通过跨膜受体，具有长818个氨基酸的大的细胞外结构域(Tartaglia(1997)J.Biol.Chem 7:272(10):6093-6)。LEPR可以与瘦素结合，瘦素是主要由脂肪组织表达的蛋白质，其参与食物摄入和代谢的调节(Friedman(2014)J Endocrinol 223(1):T1-8)。存在不同的LEPR同种型，其产生可溶性或膜结合形式的受体，并且膜结合形式的细胞内结构域的长度不同。具有最长细胞内结构域的同种型在下丘脑中高度表达，下丘脑是与肥胖相关的瘦素作用的重要部位(Friedman and Halaas(1998)Nature 395(6704):763-70)。LEPR主要位于细胞体内，其次是在细胞表面上。LEPR经历配体诱导的内化，从而增加瘦素信号传导的调节水平(Sweeney(2002)Cell Signal 14(8):655-63)。

[0127] 为了评估本发明的抗LEPR抗体对细胞的结合，产生了HEK293细胞系以稳定表达人LEPR的细胞外结构域(hLEPR;登录号为#P48357的第22-839位氨基酸，同种型B)，所述细胞外结构域具有N-末端myc-myc标签和来自人羧肽酶M的C-末端肽序列(Marcic et al.(2000)J Biol Chem.275(21):16110-8)，所述C-末端肽序列指导糖基磷脂酰肌醇(GPI)的添加，使得所述蛋白质可以通过GPI锚定在膜上。由于细胞系中的hLEPR不具有细胞内结构域，因此在配体结合时不会内化，从而大大提升了可用于抗体和/或配体结合的LEPR的量。在含有10％FBS、NEAA、青霉素/链霉素和500μg/mL G418的DMEM中选择细胞系，然后使用抗Myc抗体对受体高表达的进行分选。将得到的稳定细胞系(称为HEK293/hLEPR-GPI)保持在含有10％FBS、NEAA和青霉素/链霉素的DMEM中。

[0128] 对于FACS分析，分离HEK293亲本细胞和HEK293/hLEPR-GPI细胞，并在含有2％FBS(FACS缓冲液)的PBS中以5x 10^5个细胞/孔接种到96孔v-底的板上。为了测试结合细胞的抗hLEPR抗体是否受瘦素存在的影响，将含有或不含1μM人瘦素(R&D Systems,#398-LP)的FACS缓冲液与细胞一起在4℃下孵育30分钟，然后加入10nM的抗LEPR抗体或对照抗体的FACS缓冲液。随后将细胞在4℃下孵育30分钟，然后洗涤，再与16μg/mL的与Alexa Fluor®-647偶合的二抗(Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.,#109-547-003)在4℃下孵育30分钟。随后使用BD CytoFix™(Becton Dickinson,#554655)固定细胞，过滤，并在HyperCyt流式细胞仪(Beckman Coulter)上分析。对所有细胞系，还测试了未染色的和仅有二抗的对照。使用ForeCyt(IntelliCyt)和FlowJo版本10软件分析了结果，以确定活细胞的荧光的几何平均值。然后将每个样品的荧光几何平均值对未染色细胞的几何平均值进行基准化，以获得每种条件下的相对结合(“结合比”)，并且对于每种测试抗体，将这些结合比记录在表14中。

[0129] 如表14中所示，在10nM下测试的本发明的9种抗LEPR抗体显示出了与HEK293/hLEPR-GPI细胞的结合，结合比率范围为无瘦素条件下的824倍至3187倍，及存在1μM瘦素的条件下的398倍至3590倍。基于这些结合比率的相似性，本发明的抗LEPR抗体结合细胞上表达的LEPR的能力似乎不会显著地受到1μM过量瘦素存在的影响，表明LEPR上的抗LEPR抗体结合位点不与LEPR上的瘦素结合位点重合。本发明的抗LEPR抗体未显示出与HEK293亲本细

胞的任何显著结合，其中在具有和不具有1μM瘦素条件下的结合比率为1-9倍。在存在瘦素的条件下，比较抗体与表达有GPI锚定的LEPR的细胞的结合显著降低。同种型对照抗体和仅存在二抗的样品也未显示出与具有或不具有瘦素的任一细胞系的显著结合，结合比率范围为1-6倍。

表14：在+/-1μM人瘦素的条件下，10nM抗LEPR抗体与HEK293/hLEPR-GPI和HEK293亲本细胞的结合

	结合比率：对每个细胞系的未染色样品进行基准化			
	没有加瘦素		1μM 瘦素	
抗体	HEK293 亲本	HEK293/ hLEPR-GPI	HEK293 亲本	HEK293/ hLEPR-GPI
H4H17322P2	3	1307	6	1317
H4H18457P2	2	3187	3	3106
H4H18464P2	5	2318	7	3590
H4H18437P2	1	1314	2	1441
H4H18439P2	4	1533	6	2477
H4H18440P2	3	1640	7	2557
H4H18462P2	2	1173	3	759
H4H18466P2	1	824	2	398
H4H18508P2	1	1311	2	1873
比较抗体	6	2349	3	112

表14：在+/-1μM人瘦素的条件下，10nM抗LEPR抗体与HEK293/hLEPR-GPI和HEK293亲本细胞的结合

	结合比率：对每个细胞系的未染色样品进行基准化			
	没有加瘦素		1μM 瘦素	
抗体	HEK293 亲本	HEK293/ hLEPR-GPI	HEK293 亲本	HEK293/ hLEPR-GPI
人 IgG 同种型对照抗体	1	6	2	4
仅存在抗人 IgG 二抗	1	3	2	3
小鼠 IgG 同种型对照抗体	2	2	3	3
仅存在抗小鼠 IgG 二抗	2	2	2	2
未染色的	1	1	1	1

实施例6：在存在hLeptin的条件下本发明的抗LEPR抗体显示出对瘦素信号传导的完全抑制

[0130] 使用稳定表达全长人LEPR(hLEPR；登录号NP_002294.2的第1至1165位氨基酸)的报告细胞系以及IMR-32细胞系(一种人神经母细胞瘤细胞系)中的荧光素酶报告基因(STAT3-Luc；Qiagen，#CLS-6028L)开发出了检测经由LEPR活化的STAT3转录激活的生物测

定。将得到的稳定细胞系(称为IMR-32/STAT3-Luc/hLEPR)分离并保持在补充有10％FBS、NEAA、1ug/mL嘌呤霉素、100ug/mL潮霉素B和青霉素/链霉素/L-谷氨酰胺的MEM-Earl培养基(完全培养基)中。

[0131] 在存在或不存在瘦素的情况下,使用所得生物测定法测量本发明的抗LEPR抗体对LEPR信号传导的效应。对于生物测定,将IMR-32/STAT3-Luc/hLEPR细胞在完全培养基中以针对96孔格式的20,000个细胞/100ul/孔的密度接种,然后第二天用适当体积的补充有1％BSA和0.1％FBS(测定缓冲液)的Opti-MEM替换培养基30分钟。为了测量本发明的抗体在不存在瘦素的情况下的效应,将抗LEPR抗体或同种型对照抗体在测定缓冲液中半对数系列稀释至范围为100nM至300fM的终浓度,然后加入到细胞中,随后在37℃下在5％CO_2中孵育过夜。为了测量本发明的抗体在存在瘦素的情况下的效应,将在测定缓冲液中的200pM固定浓度的人瘦素(hLeptin;R&D Systems,#398-LP)加入细胞中,然后立即加入被半对数系列稀释至范围为100nM至300fM终浓度的抗LEPR抗体或同种型对照抗体。然后将样品在37℃下在5％CO_2中孵育过夜。然后将OneGlo试剂(Promega,#E6051)加入样品中,并在Envision多标记读板仪(Envision Multilable Plate Reader)(Perkin Elmer)上以发光模式测定荧光素酶活性。获得了相对光单位(RLU)值,并使用GraphPad Prism软件(GraphPad)用非线性回归分析结果。将从hLeptin剂量应答获得的最大RLU值定义为IMR-32/STAT3-Luc/hLEPR测定中的100％活化。

[0132] 如表15中所示,在不存在hLeptin的情况下,测试的抗LEPR抗体显示出对IMR-32/STAT3-Luc/hLEPR细胞的微弱刺激,最大活化分别为从hLeptin剂量应答获得的最大活化的4％至8％。一种具有弱刺激的抗体具有的EC_{50}值为1.27nM,而另一种抗体H4H18440P2不具有可测得的EC_{50}值。在存在200pM hLeptin的情况下,测试的抗LEPR抗体中有三种显示出对IMR-32/STAT3-Luc/hLEPR细胞中的瘦素的完全抑制,IC_{50}值范围为723pM(抗体H4H18457P2)至1.83nM(抗体H4H17322P2)或2.9nM(抗体H4H18464P2)。在存在200pM人瘦素的情况下,测试的抗LEPR抗体中有6种未显示出任何可测得的抑制。在任何测定中,同种型对照抗体均未显示出对IMR-32/STAT3-Luc/hLEPR细胞的任何可测得的刺激。

表15:抗LEPR抗体对hLEPR的活化和抑制

	IMR-32/LEPR 没有人瘦素		IMR-32/LEPR 具有 200pM 人瘦素	
抗体	EC_{50}（M）	% 活化	IC_{50}（M）	% 抑制
H4H18457P2	N/A	N/A	7.23E-10	100
H4H17322P2	1.27E-09	8	1.83E-09	100
H4H18464P2	1.30E-10	6	2.9E-09	100
H4H18437P2	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*
H4H18439P2	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*
H4H18440P2	IC*	4	N/A*	N/A*
H4H18462P2	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*
H4H18466P2	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*
H4H18508P2	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*
比较抗体	N/A*	N/A*	1.03E-09	100

*N/A表示在测定中没有可测得的抑制和/或活化

*IC表示不确定的结果，因为无法确定计算的EC_{50}值。

实施例7.不同抗LEPR单克隆抗体之间的Octet交叉竞争。

[0133] 在Octet HTX生物传感器平台(Pall ForteBio Corp.)上使用实时无标记的生物层干涉测定法测定了一组不同抗LEPR单克隆抗体之间的结合竞争。整个实验在25℃下在含有10mM HEPES、150mM NaCl、3mM EDTA和0.05％v/v表面活性剂吐温-20、1mg/mL BSA，pH为7.4的缓冲液(HBS-EBT)中进行，板以1000rpm的速度摇晃。

[0134] 为了评估两种抗体是否能够彼此竞争结合被表达成具有C末端myc-myc-六组氨酸标签的重组人LEPR(hLEPR.MMH;SEQ ID:90)，首先将约0.25nm的hLEPR-MMH捕获到抗五组氨酸抗体(anti-penta-His antibody)包被的Octet生物传感器尖端(Fortebio Inc，#18-5122)上，这通过将所述生物传感器尖端在含有20μg/mL hLEPR-MMH的孔中浸没5分钟实现。然后通过将捕获有抗原的生物传感器尖端在含有50μg/mL第一抗LEPR单克隆抗体(随后称为mAb-1)溶液的孔中浸入210秒，使其饱和。然后将生物传感器尖端在含有50μg/mL第二抗LEPR单克隆抗体溶液(随后称为mAb-2)的孔中浸入150秒。在实验的每个步骤之间，将生物传感器尖端在HBS-EBT缓冲液中洗涤。在整个实验过程中监测实时结合反应，并记录每个步骤结束时的结合反应。比较mAb-2与预先与mAb-1复合的hLEPR-MMH结合的反应，并测定不同抗LEPR单克隆抗体的竞争性/非竞争性行为，如表16所示。

表16.抗LEPR单克隆抗体之间的交叉竞争

与捕获的 hLEPR-MMH 结合的第一抗体（mAb-1）	显示与 mAb-1 竞争的第二抗体（mAb-2）
H4H18439P2	H4H18440P2
H4H18440P2	H4H18439P2
H4H18457P2	H4H18462P2 H4H18437P2 H4H18466P2 H4H18508P2
H4H18462P2	H4H18457P2 H4H18437P2 H4H18466P2

表16.抗LEPR单克隆抗体之间的交叉竞争

与捕获的 hLEPR-MMH 结合的第一抗体（mAb-1）	显示与 mAb-1 竞争的第二抗体（mAb-2）
H4H18437P2	H4H18457P2 H4H18462P2 H4H18466P2
H4H18466P2	H4H18457P2 H4H18462P2 H4H18437P2
H4H17322P2	无
H4H18464P2	无

[0135] 如表16中所示，抗体H4H18439P2和H4H18440P2彼此竞争结合其各自的表位。LEPR抗体H4H18457P2、H4H18462P2、H4H18437P2、H4H18466P2和H4H18508P2彼此竞争结合其各自的表位。抗体H4H17322P2和H4H18464P2不竞争结合H4H18439P2、H4H18440P2、H4H18457P2、H4H18462P2、H4H18437P2和H4H18466P2的各自表位。

实施例8:LEPR拮抗剂抗体在人源化LEPR小鼠中的体内功效测试。

[0136] 在单独圈养的遗传改造的$LEPR^{Hu/Hu}$小鼠中测定了本发明的三种特异性拮抗性抗LEPR抗体H4H17322P2、H4H18457P2和H4H18464P2对食物摄入、体重和肥胖的影响，所述小鼠表达瘦素受体，所述瘦素受体由代替鼠LEPR胞外域序列的人LEPR胞外域序列组成。

[0137] 在治疗前5天至1天(第-5天和第-1天)之间测量基线每日食物摄入量。在治疗前4天和治疗后6天(第-4天和第-6天)，通过μCT定量身体组成，包括肥胖情况。在第0天，基于治疗前1天(第-1天)的体重，将32只12至13周龄的雄性$LEPR^{HuHu}$小鼠随机分为4组，每组8只小鼠。在第0天，每组通过皮下注射接受单剂量的30mg/kg的同种型对照抗体、30mg/kg的H4H17322P2、30mg/kg的H4H18457P2或30mg/kg的H4H18464P2。同种型对照抗体不结合任何

已知的小鼠蛋白质。在研究持续期间，测量每只动物的食物摄入和体重。图1总结了在每个时间点上每个治疗组相对于平均基线每日食物摄入量的食物摄入变化百分比。计算每个动物从第0天开始的在每个时间点上的体重变化百分比。图2总结了每个治疗组中动物体重的平均变化百分比。图3总结了每个抗体治疗组中动物的平均脂肪量，所述平均脂肪量通过抗体治疗前6天和治疗后6天的μCT进行定量。所有结果表示成平均值±SEM。

[0138] 如图1和2所示，经抗LEPR拮抗剂抗体处理的小鼠表现出食物摄入变化百分比和体重变化百分比的增加。用同种型对照抗体处理的未观察到这些增加。如图1所示，与注射了同种型对照抗体的小鼠相比，经30mg/kg的H4H17322P2处理的小鼠在治疗后1天开始(第1天)以及在随后的时间点显示出食物摄入的显著增加。与注射了同种型对照抗体的小鼠相比，经30mg/kg的H4H18457P2处理的小鼠在第2天开始和随后的时间点显示出食物摄入的显著增加。与注射了同种型对照抗体的小鼠相比，经30mg/kg的H4H18464P2处理的小鼠从第2天开始以及在随后的时间点显示出食物摄入的显著增加，除了第4天以外。如图2所示，与注射了同种型对照抗体的小鼠相比，经30mg/kg的H4H17322P2处理的小鼠在治疗后4天(第4天)开始以及在随后的时间点显示出体重变化百分比的显著增加。与注射了同种型对照抗体的小鼠相比，经30mg/kg的H4H18457P2处理的小鼠从第3天开始以及在随后的时间点显示出体重变化百分比的显著增加。与注射了同种型对照抗体的小鼠相比，经30mg/kg的H4H18464P2处理的小鼠从第4天开始以及在随后的时间点显示出体重变化百分比的显著增加。如图3所示，治疗前(第-4天)各组之间脂肪量没有差异。与同种型对照抗体相比，经30mg/kg的H4H17322P2、H4H18457P2和H4H18464P2抗体处理的小鼠在处理后6天(第6天)显示出脂肪量的显著增加。总之，LEPR拮抗剂抗体的处理提升了小鼠的食物摄入、体重和肥胖，而同种型对照抗体则没有。

实施例9:确定本发明的抗LEPR抗体所结合的人LEPR表位

[0139] 为了确定本发明的抗LEPR抗体所结合的人LEPR表位，利用基于Luminex FLEXMAP(FM3DD,LuminexCorp)流式细胞术的分析来表征抗LEPR抗体与重组人LEPR蛋白质结构域的相互作用。对于该测定，将约300万个羧化的Microplex^{R}微球(Luminex,Cat#LC1000A)洗涤，涡旋并在0.1M $NaPO_4$(pH 6.2)(活化缓冲液)中超声处理，然后离心以除去上清液。将微球重新悬浮于120μL活化缓冲液中，通过在25℃下加入15μL 50mg/mL的N-羟基琥珀酰亚胺(NHS,Thermo Scientific,目录号24500)、然后加入15μL 50mg/mL的1-乙基-3-[3-二甲基氨基丙基]碳二亚胺(EDC,ThermoScientific,目录号22980)使羧酸酯基团(-COOH)活化。10分钟后，通过加入600μL 50mM的MES(pH 5)(偶联缓冲液)将反应pH降至5.0，涡旋微球，离心除去上清液。立即将活化的珠粒与500μL 20μg/mL的具有小鼠IgG或人IgG的单克隆抗myc抗体在偶联缓冲液中混合，并在25℃下孵育2小时。通过加入50μL的1M Tris-HCl(pH8.0)淬灭偶联反应，将微球快速涡旋，离心，并用1mL DPBS洗涤四次，以除去未偶联的蛋白质和其它反应物组分。

[0140] 将瞬时表达的LEPR蛋白悬浮于无血清CHO-S-SFM II培养基(Thermo Fisher,目录号31033020)中，然后通过离心澄清，其中LEPR蛋白包括被表达成具有C末端myc-myc六组氨酸标签的人LEPR细胞外结构域(人LEPR-MMH,SEQ ID NO:89)、被表达成具有C末端myc-myc六组氨酸标签的人LEPR CRH1(D1)(人LEPR CRH1(D1)-MMH,SEQ ID NO:89的第1-208位氨基酸，连上myc-myc六组氨酸标签，即第209-236位氨基酸)、被表达成具有C末端myc-myc六组

氨酸标签的人LEPR CRH1(D1,D2)结构域(人LEPR CRH1(D1,D2)-MMH,SEQ ID NO:89的第1-318位氨基酸,连上myc-myc六组氨酸标签,即第319-346位氨基酸),被表达成具有C末端myc-myc六组氨酸标签的人LEPR CRH1(D1,D2,D3)结构域(人LEPR CRH1(D1,D2,D3)-MMH,SEQ ID NO:89的第1-278位氨基酸,连上myc-myc六组氨酸标签,即第279-306位氨基酸)、被表达成具有C末端myc-myc六组氨酸标签的人LEPR CRH1-Ig(D2,D3)结构域(人LEPR CRH1-Ig(D2,D3)-MMH,SEQ ID NO:89的第1-198位氨基酸,连上myc-myc六组氨酸标签,即第199-226位氨基酸)、被表达成具有C末端myc-myc六组氨酸标签的人LEPR Ig(D3)结构域(人LEPR Ig(D3)-MMH,SEQ ID NO:89的第1-88位氨基酸,连上myc-myc六组氨酸标签,即第89-116位氨基酸)、被表达成具有C末端myc-myc六组氨酸标签的人LEPR CRH2结构域(人LEPR CRH2-MMH,SEQ ID NO:89的第1-207位氨基酸,连上myc-myc六组氨酸标签,即第208-235位氨基酸)、被表达成具有C末端myc-myc六组氨酸标签的人LEPR FNIII结构域(人LEPR FNIII-MMH,SEQ ID NO:89的第1-204位氨基酸,连上myc-myc六组氨酸标签,即第205-232位氨基酸)、以及被表达成具有C末端myc-myc六组氨酸标签的人LEPR Ig-CRH2-FNIII结构域(人LEPR Ig-CRH2-FNIII-MMH,SEQ ID NO:89的第1-510位氨基酸,连上myc-myc六组氨酸标签,即第511-538位氨基酸)。将如上所述制备的具有固定化抗myc单克隆抗体的微球等分试样分别加入1mL的这些蛋白质上清液中。轻轻混合微球,在25℃下孵育2小时,用1mL DBPS洗涤两次,离心除去上清液,最后重悬于1mL DPBS缓冲液中。从与全长人LEPR和每种人LEPR结构域蛋白进行的各个反应中取出48μL抗myc IgG偶联微球并在3.6mL PBS+20mg/mL BSA+0.05％叠氮化钠(阻断缓冲液)中混合在一起。

[0141] 从该混合池中,将75μL微球接种在96孔滤板(Millipore,目录号:MSBVN1250)的每孔中,并与25μL单独的抗人LEPR单克隆抗体(0.5或5μg/mL)混合,在25℃下孵育2小时,然后用200μL含0.05％吐温20的DPBS(洗涤缓冲液)洗涤两次。为了检测和量化与单个微球结合的抗LEPR抗体水平的量,加入100μL含2.5μg/mL R-藻红蛋白缀合的山羊抗人κ的F(ab')2(Southern Biotech,目录号2063-09)的封闭缓冲液或100μL含1.25μg/mL R-藻红蛋白缀合的AffiniPure F(ab')的封闭缓冲液或100μL含1.25μg/mL R-藻红蛋白缀合的山羊抗小鼠IgG的AffiniPure F(ab')2片段,F(ab')2片段特异性的(Jackson Immunoresearch,目录号:115-116-072)封闭缓冲液,并在25℃下孵育30分钟。30分钟后,用200μL洗涤缓冲液洗涤样品两次,并重悬于150μL洗涤缓冲液中。在Luminex分析仪中测量微球的中值荧光强度(MFI)。

[0142] 基于Luminex的分析的结果列于表17中。Luminex MFI信号强度表明,本发明的九种抗LEPR抗体与完整的人LEPR细胞外结构域结合。抗LEPR抗体H4H18439P2和H4H18440P2与人LEPR的CRH1D2结构域内的表位结合。抗LEPR抗体H4H17322P2和COMP3551与人LEPR的CRH2结构域内的表位结合。抗LEPR抗体H4H18437P2、H4H18457P2、H4H18508P2、H4H18466P2和H4H18462P2与人LEPR的FNIII结构域内的表位结合。抗LEPR抗体H4H18464P2与人LEPR的Ig(D3)结构域内的表位结合。

表17:抗LEPR抗体与用myc标签捕获的人LEPR全长细胞外结构域和分离的人LEPR结构域结合的Luminex MFI信号

抗体	CRH1（D1）	CRH1（D1,D2）	CRH1-Ig（D1,D2,D3）	CRH1-Ig（D2,D3）	Ig（D3）	CRH2	FNIII	Ig-CRH2-FNIII	全长细胞外结构域	可能的结合位点
H4H17322P2	14	50	31	58	26	19745	23	15097	8932	CRH2
H4H18437P2	21	82	34	43	26	25	1593	15625	8644	FNIII
H4H18457P2	13	53	31	43	18	18	1187	13235	7500	FNIII
H4H18508P2	10	274	217	372	24	18	741	13007	5865	FNIII
H4H18466P2	15	56	209	76	26	17	457	11270	5070	FNIII
H4H18439P2	11	21179	8021	10026	18	16	13	43	5472	CRH1 D2
H4H18440P2	8	19337	8245	9165	14	17	10	32	7035	CRH1 D2
H4H18464P2	13	59	5557	3742	27	24	23	15119	9385	Ig(D3)
H4H18462P2	5381	5731	3961	47	21	24	581	14858	5852	FNIII
H4H18462P2*	615	665	461	25	10	8	229	11153	3610	FNIII
比较抗体	-14	19	-57	27	10	9404	73	7112	3908	CRH2

*抗体以0.5μg/mL而非5μg/mL进行测试。

[0143] 本发明不限于本文所述的具体实施方案的范围。实际上，除了本文所述的那些之外，本发明的各种修改对于本领域技术人员来说将从前面的描述和附图中变得显而易见。这些修改应落入权利要求书的范围内。

序列表

<110> 瑞泽恩制药公司

J·科洛马达

P·史蒂维斯

J·阿尔塔雷霍斯

<120> 拮抗瘦素受体的抗原结合蛋白

<130> 070860-8040CN01

<140> PCT/US2017/060690

<141> 2017-11-08

<150> 62/419,062

<151> 2016-11-08

<160> 95

<170> PatentIn 3.5版本

<210> 1

<211> 378

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 1

cagctgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctggtgc ctctatcagc agtagtcgtt tctacggggg ctggatccgc 120
cagcccccag ggaagggtct ggagtggatt ggggatatct attatagtgg gaatacctac 180
tacaacccgt ccctccagag tcgagtcacc atatccgtag acacgtccaa gaatcagttc 240
tccctgaagc tgagctctgt gaccgccgca gacacggctg tgtattactg tgcgagacac 300
cttatgatta cgtttggggg acttatcgtc gagggttttg atatttgggg ccaagggaca 360
atggtcaccg tctcttca 378

<210> 2

<211> 126

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 2

Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ala Ser Ile Ser Ser Ser
20 25 30

Arg Phe Tyr Gly Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45
Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60
Leu Gln Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80
Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95
Cys Ala Arg His Leu Met Ile Thr Phe Gly Gly Leu Ile Val Glu Gly
100 105 110
Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 3
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 3
ggtgcctcta tcagcagtag tcgtttctac 30

<210> 4
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 4
Gly Ala Ser Ile Ser Ser Ser Arg Phe Tyr
1 5 10

<210> 5
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 5
atctattata gtgggaatac c 21

<210> 6
<211> 7

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 6
Ile Tyr Tyr Ser Gly Asn Thr
1 5
<210> 7
<211> 54
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 7
gcgagacacc ttatgattac gtttggggga cttatcgtcg agggttttga tatt 54
<210> 8
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 8
Ala Arg His Leu Met Ile Thr Phe Gly Gly Leu Ile Val Glu Gly Phe
1 5 10 15
Asp Ile
<210> 9
<211> 324
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 9
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccgtca 180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctccgat caccttcggc 300
caagggacac gactggagat taaa 324
<210> 10

<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 10

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro
85 90 95
Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 11
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 11

cagagcatta gcagctat 18

<210> 12
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 12

Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
1 5

<210> 13
<211> 9

<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 13
gctgcatcc 9
<210> 14
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 14
Ala Ala Ser
1
<210> 15
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 15
caacagagtt acagtacccc tccgatcacc 30
<210> 16
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 16
Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro Ile Thr
1 5 10
<210> 17
<211> 366
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 17

caggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatggca tccactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcatatg atggaaataa taaatactat 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggctgtat attactgtgc gaaagatcta 300
tttttggagt ggttatttca cggtatgggc gtctggggcc aagggaccac ggtcaccgtc 360
tcctca 366

<210> 18
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 18

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Asp Leu Phe Leu Glu Trp Leu Phe His Gly Met Gly Val Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 19
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 19

ggattcactt tcagtagcta tggc 24

<210> 20

<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 20
Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly
1 5
<210> 21
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 21
atatcatatg atggaaataa taaa 24
<210> 22
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 22
Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn Lys
1 5
<210> 23
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 23
gcgaaagatc tatttttgga gtggttattt cacggtatgg gcgtc 45
<210> 24
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的

<400> 24

Ala Lys Asp Leu Phe Leu Glu Trp Leu Phe His Gly Met Gly Val
1 5 10 15

<210> 25

<211> 372

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 25

cagctgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctagtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
acctgcattg tctctggtgg cgacatcacc agtagtagtt attactggaa ctggatccgc 120
cagcccccag ggaaagggct ggagtggatt gggaatatct attatagtgg aagcaccaac 180
tacaacccgt ccctcaagag tcgagtcacc atatccatag acacgtccaa gagccagttc 240
tccctgaagc tgaggtctgt gaccgccgca gacacggctg tttattactg tgcgagatta 300
ttacgatatt ttgactggtc aaaaggatac cttgactact ggggccaggg aaccctggtc 360
accgtctcct ca 372

<210> 26

<211> 124

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 26

Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ile Val Ser Gly Gly Asp Ile Thr Ser Ser
20 25 30
Ser Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45
Trp Ile Gly Asn Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser
50 55 60
Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Ile Asp Thr Ser Lys Ser Gln Phe
65 70 75 80
Ser Leu Lys Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95
Cys Ala Arg Leu Leu Arg Tyr Phe Asp Trp Ser Lys Gly Tyr Leu Asp
100 105 110
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 27
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 27
ggtggcgaca tcaccagtag tagttattac 30
<210> 28
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 28
Gly Gly Asp Ile Thr Ser Ser Ser Tyr Tyr
1 5 10
<210> 29
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 29
atctattata gtggaagcac c 21
<210> 30
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 30
Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr
1 5
<210> 31
<211> 48
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的
<400> 31
gcgagattat tacgatattt tgactggtca aaaggatacc ttgactac 48
<210> 32
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 32
Ala Arg Leu Leu Arg Tyr Phe Asp Trp Ser Lys Gly Tyr Leu Asp Tyr
1 5 10 15
<210> 33
<211> 369
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 33
caggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc atggtcaagc ctggagggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt gactactata tgagctggat ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctggagtg gatttcacac attagtatta ctggtagcac catatactac 180
gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagggaca acgccaagaa ttcactgtat 240
ttggaaatga acagactgag agacgaggac acggccgtat attactgtac gagagatgag 300
ccggatattg tactagtaag gtacggtatg gacgtctggg gccaagggac cacggtcacc 360
gtctcctca 369
<210> 34
<211> 123
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 34
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Met Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30
Tyr Met Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Ser His Ile Ser Ile Thr Gly Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Glu Met Asn Arg Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Arg Asp Glu Pro Asp Ile Val Leu Val Arg Tyr Gly Met Asp Val
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 35
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 35
ggattcacct tcagtgacta ctat 24

<210> 36
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 36
Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Tyr
1 5

<210> 37
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 37
attagtatta ctggtagcac cata 24

<210> 38
<211> 8
<212> PRT

<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 38
Ile Ser Ile Thr Gly Ser Thr Ile
1 5
<210> 39
<211> 48
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 39
acgagagatg agccggatat tgtactagta aggtacggta tggacgtc 48
<210> 40
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 40
Thr Arg Asp Glu Pro Asp Ile Val Leu Val Arg Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10 15
<210> 41
<211> 351
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 41
gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaagt gtggtacggc ctggggaatc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacatttgat gattatggca tgagctgggt ccgccaagct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctctggt attagttgga atggtggcat cacagtttat 180
gcagactctg tgaagggccg attcaccgtc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240
ctgcaaatga acagtctgag agccgaggac acggccctct atcactgtgc gagagcccgt 300
tatggtggcg ccgactactg gggccaggga accctggtca ccgtctcctc a 351
<210> 42
<211> 117
<212> PRT

<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 42

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Ser Val Val Arg Pro Gly Glu
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
20 25 30
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Gly Ile Ser Trp Asn Gly Gly Ile Thr Val Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr His Cys
85 90 95
Ala Arg Ala Arg Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 43
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 43

ggattcacat ttgatgatta tggc 24

<210> 44
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 44

Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Gly
1 5

<210> 45
<211> 24

<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 45
attagttgga atggtggcat caca 24
<210> 46
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 46
Ile Ser Trp Asn Gly Gly Ile Thr
1 5
<210> 47
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 47
gcgagagccc gttatggtgg cgccgactac 30
<210> 48
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 48
Ala Arg Ala Arg Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr
1 5 10
<210> 49
<211> 366
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 49

gaggtgcagc tggtggagtc tgggggagac ttggtacagc ctgggcggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agttttgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaggg gactggagtg ggtctcaagt ctcagtgata gtggtgataa cacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaaaaa tacgttgtat 240
ctgcaaatga acaacctgag agccgaggac acggccgttt attactgtgc gaaagatctc 300
ttttcggggt ggttattcca tggttttgat gtctggggcc aagggacaat ggtcaccgtc 360
tcttca 366

<210> 50
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 50

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ser Leu Ser Asp Ser Gly Asp Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Asp Leu Phe Ser Gly Trp Leu Phe His Gly Phe Asp Val Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 51
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 51

ggattcacct ttagcagttt tgcc 24

<210> 52

<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 52
Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Ala
1 5
<210> 53
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 53
ctcagtgata gtggtgataa caca 24
<210> 54
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 54
Leu Ser Asp Ser Gly Asp Asn Thr
1 5
<210> 55
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 55
gcgaaagatc tcttttcggg gtggttattc catggttttg atgtc 45
<210> 56
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的

<400> 56

Ala Lys Asp Leu Phe Ser Gly Trp Leu Phe His Gly Phe Asp Val
1 5 10 15

<210> 57

<211> 351

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 57

caggttcagc tggtgcagtc tggacctgaa gtgaaaaaac ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcttgtaagg gttctggtta cacctttcc tggtatggaa tcagctggat ccgacaggcc 120
cctggacacg gccttgaatg gatgggatgg atcagcgctt ccagtggtaa tacaagattt 180
gcacagaagg tccagggcag actcaccatg accacagaca catcgacgag tacagcctac 240
atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgttt attactgtgc gagaacgggg 300
actcggccct ttgactattg gggccaggga accctggtca ccgtctcctc a 351

<210> 58

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 58

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Trp Tyr
20 25 30
Gly Ile Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Ser Ala Ser Ser Gly Asn Thr Arg Phe Ala Gln Lys Val
50 55 60
Gln Gly Arg Leu Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Thr Gly Thr Arg Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 59
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 59
ggttacacct tttcctggta tgga 24
<210> 60
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 60
Gly Tyr Thr Phe Ser Trp Tyr Gly
1 5
<210> 61
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 61
atcagcgctt ccagtggtaa taca 24
<210> 62
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 62
Ile Ser Ala Ser Ser Gly Asn Thr
1 5
<210> 63
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>

<223> 合成的
<400> 63
gcgagaacgg ggactcggcc ctttgactat 30
<210> 64
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 64
Ala Arg Thr Gly Thr Arg Pro Phe Asp Tyr
1 5 10
<210> 65
<211> 366
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 65
gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtccagc cgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtacag cctctggatt caccttcagt agctatggtc tgcactgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gactggaata tgtttcaagt attaatcata atgggggtag taaatattat 180
gcagactctg tgaagggcag attcaccatc tccagagaca attcgaagaa cacgctgttt 240
cttcaaatgg gcagcctgaa aactgaggac atggctgttt attactgtgc gagagatctc 300
tttttggagt ggttattcca tggttttgat atctggggcc aagggacaat ggtcaccgtc 360
tcttca 366
<210> 66
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 66
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Gly Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Val
35 40 45

Ser Ser Ile Asn His Asn Gly Gly Ser Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe
65 70 75 80
Leu Gln Met Gly Ser Leu Lys Thr Glu Asp Met Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Leu Phe Leu Glu Trp Leu Phe His Gly Phe Asp Ile Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 67
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 67
ggattcacct tcagtagcta tggt 24

<210> 68
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 68
Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly
1 5

<210> 69
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 69
attaatcata atgggggtag taaa 24

<210> 70
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的
<400> 70
Ile Asn His Asn Gly Gly Ser Lys
1 5
<210> 71
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 71
gcgagagatc tctttttgga gtggttattc catggttttg atatc 45
<210> 72
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 72
Ala Arg Asp Leu Phe Leu Glu Trp Leu Phe His Gly Phe Asp Ile
1 5 10 15
<210> 73
<211> 357
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 73
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60
acctgttctg tctctggtgg ctccataaac actggttctt acttctggac ttggatccgc 120
cagcacccag gggagggcct ggagtggatt gggtacatct attacaatgg agacacctac 180
tacaatccgt ccctcaagag tcgagttacc ttatcactag acacgtctaa gaaccagttc 240
tccctgaagc tgaactctct gactgccggg gacacggccg tttattactg tgcgagaagt 300
gactggaact ccctttttga ccactggggc caggggaccc tggtcaccgt ctcctca 357
<210> 74
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的
<400> 74
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Ser Gly Gly Ser Ile Asn Thr Gly
20 25 30
Ser Tyr Phe Trp Thr Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Glu Gly Leu Glu
35 40 45
Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Asn Gly Asp Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60
Leu Lys Ser Arg Val Thr Leu Ser Leu Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80
Ser Leu Lys Leu Asn Ser Leu Thr Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95
Cys Ala Arg Ser Asp Trp Asn Ser Leu Phe Asp His Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115
<210> 75
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 75
ggtggctcca taaacactgg ttcttacttc 30
<210> 76
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 76
Gly Gly Ser Ile Asn Thr Gly Ser Tyr Phe
1 5 10
<210> 77
<211> 21
<212> DNA

<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 77
atctattaca atggagacac c 21
<210> 78
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 78
Ile Tyr Tyr Asn Gly Asp Thr
1 5
<210> 79
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 79
gcgagaagtg actggaactc ccttttgac cac 33
<210> 80
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 80
Ala Arg Ser Asp Trp Asn Ser Leu Phe Asp His
1 5 10
<210> 81
<211> 324
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 81
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcaccttg gacgttcggc 300
caagggacca aggtggaaat caaa 324

<210> 82
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 82

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45
Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95
Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 83
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 83

cagagtgtta gcagcagcta c 21

<210> 84
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> 合成的
<400> 84
Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr
1 5
<210> 85
<211> 9
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 85
ggtgcatcc 9
<210> 86
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 86
Gly Ala Ser
1
<210> 87
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 87
cagcagtatg gtagctcacc ttggacg 27
<210> 88
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 88
Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr
1 5
<210> 89

<211> 1165
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> hLEPR P48357
<400> 89

Met Ile Cys Gln Lys Phe Cys Val Val Leu Leu His Trp Glu Phe Ile
1 5 10 15
Tyr Val Ile Thr Ala Phe Asn Leu Ser Tyr Pro Ile Thr Pro Trp Arg
20 25 30
Phe Lys Leu Ser Cys Met Pro Pro Asn Ser Thr Tyr Asp Tyr Phe Leu
35 40 45
Leu Pro Ala Gly Leu Ser Lys Asn Thr Ser Asn Ser Asn Gly His Tyr
50 55 60
Glu Thr Ala Val Glu Pro Lys Phe Asn Ser Ser Gly Thr His Phe Ser
65 70 75 80
Asn Leu Ser Lys Thr Thr Phe His Cys Cys Phe Arg Ser Glu Gln Asp
85 90 95
Arg Asn Cys Ser Leu Cys Ala Asp Asn Ile Glu Gly Lys Thr Phe Val
100 105 110
Ser Thr Val Asn Ser Leu Val Phe Gln Gln Ile Asp Ala Asn Trp Asn
115 120 125
Ile Gln Cys Trp Leu Lys Gly Asp Leu Lys Leu Phe Ile Cys Tyr Val
130 135 140
Glu Ser Leu Phe Lys Asn Leu Phe Arg Asn Tyr Asn Tyr Lys Val His
145 150 155 160
Leu Leu Tyr Val Leu Pro Glu Val Leu Glu Asp Ser Pro Leu Val Pro
165 170 175
Gln Lys Gly Ser Phe Gln Met Val His Cys Asn Cys Ser Val His Glu
180 185 190
Cys Cys Glu Cys Leu Val Pro Val Pro Thr Ala Lys Leu Asn Asp Thr
195 200 205
Leu Leu Met Cys Leu Lys Ile Thr Ser Gly Gly Val Ile Phe Gln Ser
210 215 220
Pro Leu Met Ser Val Gln Pro Ile Asn Met Val Lys Pro Asp Pro Pro
225 230 235 240
Leu Gly Leu His Met Glu Ile Thr Asp Asp Gly Asn Leu Lys Ile Ser
245 250 255
Trp Ser Ser Pro Pro Leu Val Pro Phe Pro Leu Gln Tyr Gln Val Lys

260 265 270

Tyr Ser Glu Asn Ser Thr Thr Val Ile Arg Glu Ala Asp Lys Ile Val

275 280 285

Ser Ala Thr Ser Leu Leu Val Asp Ser Ile Leu Pro Gly Ser Ser Tyr

290 295 300

Glu Val Gln Val Arg Gly Lys Arg Leu Asp Gly Pro Gly Ile Trp Ser

305 310 315 320

Asp Trp Ser Thr Pro Arg Val Phe Thr Thr Gln Asp Val Ile Tyr Phe

325 330 335

Pro Pro Lys Ile Leu Thr Ser Val Gly Ser Asn Val Ser Phe His Cys

340 345 350

Ile Tyr Lys Lys Glu Asn Lys Ile Val Pro Ser Lys Glu Ile Val Trp

355 360 365

Trp Met Asn Leu Ala Glu Lys Ile Pro Gln Ser Gln Tyr Asp Val Val

370 375 380

Ser Asp His Val Ser Lys Val Thr Phe Phe Asn Leu Asn Glu Thr Lys

385 390 395 400

Pro Arg Gly Lys Phe Thr Tyr Asp Ala Val Tyr Cys Cys Asn Glu His

405 410 415

Glu Cys His His Arg Tyr Ala Glu Leu Tyr Val Ile Asp Val Asn Ile

420 425 430

Asn Ile Ser Cys Glu Thr Asp Gly Tyr Leu Thr Lys Met Thr Cys Arg

435 440 445

Trp Ser Thr Ser Thr Ile Gln Ser Leu Ala Glu Ser Thr Leu Gln Leu

450 455 460

Arg Tyr His Arg Ser Ser Leu Tyr Cys Ser Asp Ile Pro Ser Ile His

465 470 475 480

Pro Ile Ser Glu Pro Lys Asp Cys Tyr Leu Gln Ser Asp Gly Phe Tyr

485 490 495

Glu Cys Ile Phe Gln Pro Ile Phe Leu Leu Ser Gly Tyr Thr Met Trp

500 505 510

Ile Arg Ile Asn His Ser Leu Gly Ser Leu Asp Ser Pro Pro Thr Cys

515 520 525

Val Leu Pro Asp Ser Val Val Lys Pro Leu Pro Pro Ser Ser Val Lys

530 535 540

Ala Glu Ile Thr Ile Asn Ile Gly Leu Leu Lys Ile Ser Trp Glu Lys

545 550 555 560

Pro Val Phe Pro Glu Asn Asn Leu Gln Phe Gln Ile Arg Tyr Gly Leu

565 570 575

Ser Gly Lys Glu Val Gln Trp Lys Met Tyr Glu Val Tyr Asp Ala Lys
580 585 590
Ser Lys Ser Val Ser Leu Pro Val Pro Asp Leu Cys Ala Val Tyr Ala
595 600 605
Val Gln Val Arg Cys Lys Arg Leu Asp Gly Leu Gly Tyr Trp Ser Asn
610 615 620
Trp Ser Asn Pro Ala Tyr Thr Val Val Met Asp Ile Lys Val Pro Met
625 630 635 640
Arg Gly Pro Glu Phe Trp Arg Ile Ile Asn Gly Asp Thr Met Lys Lys
645 650 655
Glu Lys Asn Val Thr Leu Leu Trp Lys Pro Leu Met Lys Asn Asp Ser
660 665 670
Leu Cys Ser Val Gln Arg Tyr Val Ile Asn His His Thr Ser Cys Asn
675 680 685
Gly Thr Trp Ser Glu Asp Val Gly Asn His Thr Lys Phe Thr Phe Leu
690 695 700
Trp Thr Glu Gln Ala His Thr Val Thr Val Leu Ala Ile Asn Ser Ile
705 710 715 720
Gly Ala Ser Val Ala Asn Phe Asn Leu Thr Phe Ser Trp Pro Met Ser
725 730 735
Lys Val Asn Ile Val Gln Ser Leu Ser Ala Tyr Pro Leu Asn Ser Ser
740 745 750
Cys Val Ile Val Ser Trp Ile Leu Ser Pro Ser Asp Tyr Lys Leu Met
755 760 765
Tyr Phe Ile Ile Glu Trp Lys Asn Leu Asn Glu Asp Gly Glu Ile Lys
770 775 780
Trp Leu Arg Ile Ser Ser Ser Val Lys Lys Tyr Tyr Ile His Asp His
785 790 795 800
Phe Ile Pro Ile Glu Lys Tyr Gln Phe Ser Leu Tyr Pro Ile Phe Met
805 810 815
Glu Gly Val Gly Lys Pro Lys Ile Ile Asn Ser Phe Thr Gln Asp Asp
820 825 830
Ile Glu Lys His Gln Ser Asp Ala Gly Leu Tyr Val Ile Val Pro Val
835 840 845
Ile Ile Ser Ser Ser Ile Leu Leu Leu Gly Thr Leu Leu Ile Ser His
850 855 860
Gln Arg Met Lys Lys Leu Phe Trp Glu Asp Val Pro Asn Pro Lys Asn
865 870 875 880
Cys Ser Trp Ala Gln Gly Leu Asn Phe Gln Lys Pro Glu Thr Phe Glu

885 890 895

His Leu Phe Ile Lys His Thr Ala Ser Val Thr Cys Gly Pro Leu Leu

900 905 910

Leu Glu Pro Glu Thr Ile Ser Glu Asp Ile Ser Val Asp Thr Ser Trp

915 920 925

Lys Asn Lys Asp Glu Met Met Pro Thr Thr Val Val Ser Leu Leu Ser

930 935 940

Thr Thr Asp Leu Glu Lys Gly Ser Val Cys Ile Ser Asp Gln Phe Asn

945 950 955 960

Ser Val Asn Phe Ser Glu Ala Glu Gly Thr Glu Val Thr Tyr Glu Asp

965 970 975

Glu Ser Gln Arg Gln Pro Phe Val Lys Tyr Ala Thr Leu Ile Ser Asn

980 985 990

Ser Lys Pro Ser Glu Thr Gly Glu Glu Gln Gly Leu Ile Asn Ser Ser

995 1000 1005

Val Thr Lys Cys Phe Ser Ser Lys Asn Ser Pro Leu Lys Asp Ser

1010 1015 1020

Phe Ser Asn Ser Ser Trp Glu Ile Glu Ala Gln Ala Phe Phe Ile

1025 1030 1035

Leu Ser Asp Gln His Pro Asn Ile Ile Ser Pro His Leu Thr Phe

1040 1045 1050

Ser Glu Gly Leu Asp Glu Leu Leu Lys Leu Glu Gly Asn Phe Pro

1055 1060 1065

Glu Glu Asn Asn Asp Lys Lys Ser Ile Tyr Tyr Leu Gly Val Thr

1070 1075 1080

Ser Ile Lys Lys Arg Glu Ser Gly Val Leu Leu Thr Asp Lys Ser

1085 1090 1095

Arg Val Ser Cys Pro Phe Pro Ala Pro Cys Leu Phe Thr Asp Ile

1100 1105 1110

Arg Val Leu Gln Asp Ser Cys Ser His Phe Val Glu Asn Asn Ile

1115 1120 1125

Asn Leu Gly Thr Ser Ser Lys Lys Thr Phe Ala Ser Tyr Met Pro

1130 1135 1140

Gln Phe Gln Thr Cys Ser Thr Gln Thr His Lys Ile Met Glu Asn

1145 1150 1155

Lys Met Cys Asp Leu Thr Val

1160 1165

<210> 90

<211> 846

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> hLEPR-mmh aa 1-818: P48357的F22-D839 aa 819-846: myc-myc-六组氨酸标签

<400> 90

Phe Asn Leu Ser Tyr Pro Ile Thr Pro Trp Arg Phe Lys Leu Ser Cys
1 5 10 15
Met Pro Pro Asn Ser Thr Tyr Asp Tyr Phe Leu Leu Pro Ala Gly Leu
20 25 30
Ser Lys Asn Thr Ser Asn Ser Asn Gly His Tyr Glu Thr Ala Val Glu
35 40 45
Pro Lys Phe Asn Ser Ser Gly Thr His Phe Ser Asn Leu Ser Lys Thr
50 55 60
Thr Phe His Cys Cys Phe Arg Ser Glu Gln Asp Arg Asn Cys Ser Leu
65 70 75 80
Cys Ala Asp Asn Ile Glu Gly Lys Thr Phe Val Ser Thr Val Asn Ser
85 90 95
Leu Val Phe Gln Gln Ile Asp Ala Asn Trp Asn Ile Gln Cys Trp Leu
100 105 110
Lys Gly Asp Leu Lys Leu Phe Ile Cys Tyr Val Glu Ser Leu Phe Lys
115 120 125
Asn Leu Phe Arg Asn Tyr Asn Tyr Lys Val His Leu Leu Tyr Val Leu
130 135 140
Pro Glu Val Leu Glu Asp Ser Pro Leu Val Pro Gln Lys Gly Ser Phe
145 150 155 160
Gln Met Val His Cys Asn Cys Ser Val His Glu Cys Cys Glu Cys Leu
165 170 175
Val Pro Val Pro Thr Ala Lys Leu Asn Asp Thr Leu Leu Met Cys Leu
180 185 190
Lys Ile Thr Ser Gly Gly Val Ile Phe Gln Ser Pro Leu Met Ser Val
195 200 205
Gln Pro Ile Asn Met Val Lys Pro Asp Pro Pro Leu Gly Leu His Met
210 215 220
Glu Ile Thr Asp Asp Gly Asn Leu Lys Ile Ser Trp Ser Ser Pro Pro
225 230 235 240
Leu Val Pro Phe Pro Leu Gln Tyr Gln Val Lys Tyr Ser Glu Asn Ser
245 250 255
Thr Thr Val Ile Arg Glu Ala Asp Lys Ile Val Ser Ala Thr Ser Leu

260 265 270

Leu Val Asp Ser Ile Leu Pro Gly Ser Ser Tyr Glu Val Gln Val Arg
275 280 285

Gly Lys Arg Leu Asp Gly Pro Gly Ile Trp Ser Asp Trp Ser Thr Pro
290 295 300

Arg Val Phe Thr Thr Gln Asp Val Ile Tyr Phe Pro Pro Lys Ile Leu
305 310 315 320

Thr Ser Val Gly Ser Asn Val Ser Phe His Cys Ile Tyr Lys Lys Glu
325 330 335

Asn Lys Ile Val Pro Ser Lys Glu Ile Val Trp Trp Met Asn Leu Ala
340 345 350

Glu Lys Ile Pro Gln Ser Gln Tyr Asp Val Val Ser Asp His Val Ser
355 360 365

Lys Val Thr Phe Phe Asn Leu Asn Glu Thr Lys Pro Arg Gly Lys Phe
370 375 380

Thr Tyr Asp Ala Val Tyr Cys Cys Asn Glu His Glu Cys His His Arg
385 390 395 400

Tyr Ala Glu Leu Tyr Val Ile Asp Val Asn Ile Asn Ile Ser Cys Glu
405 410 415

Thr Asp Gly Tyr Leu Thr Lys Met Thr Cys Arg Trp Ser Thr Ser Thr
420 425 430

Ile Gln Ser Leu Ala Glu Ser Thr Leu Gln Leu Arg Tyr His Arg Ser
435 440 445

Ser Leu Tyr Cys Ser Asp Ile Pro Ser Ile His Pro Ile Ser Glu Pro
450 455 460

Lys Asp Cys Tyr Leu Gln Ser Asp Gly Phe Tyr Glu Cys Ile Phe Gln
465 470 475 480

Pro Ile Phe Leu Leu Ser Gly Tyr Thr Met Trp Ile Arg Ile Asn His
485 490 495

Ser Leu Gly Ser Leu Asp Ser Pro Pro Thr Cys Val Leu Pro Asp Ser
500 505 510

Val Val Lys Pro Leu Pro Pro Ser Ser Val Lys Ala Glu Ile Thr Ile
515 520 525

Asn Ile Gly Leu Leu Lys Ile Ser Trp Glu Lys Pro Val Phe Pro Glu
530 535 540

Asn Asn Leu Gln Phe Gln Ile Arg Tyr Gly Leu Ser Gly Lys Glu Val
545 550 555 560

Gln Trp Lys Met Tyr Glu Val Tyr Asp Ala Lys Ser Lys Ser Val Ser
565 570 575

Leu Pro Val Pro Asp Leu Cys Ala Val Tyr Ala Val Gln Val Arg Cys
580 585 590
Lys Arg Leu Asp Gly Leu Gly Tyr Trp Ser Asn Trp Ser Asn Pro Ala
595 600 605
Tyr Thr Val Val Met Asp Ile Lys Val Pro Met Arg Gly Pro Glu Phe
610 615 620
Trp Arg Ile Ile Asn Gly Asp Thr Met Lys Lys Glu Lys Asn Val Thr
625 630 635 640
Leu Leu Trp Lys Pro Leu Met Lys Asn Asp Ser Leu Cys Ser Val Gln
645 650 655
Arg Tyr Val Ile Asn His His Thr Ser Cys Asn Gly Thr Trp Ser Glu
660 665 670
Asp Val Gly Asn His Thr Lys Phe Thr Phe Leu Trp Thr Glu Gln Ala
675 680 685
His Thr Val Thr Val Leu Ala Ile Asn Ser Ile Gly Ala Ser Val Ala
690 695 700
Asn Phe Asn Leu Thr Phe Ser Trp Pro Met Ser Lys Val Asn Ile Val
705 710 715 720
Gln Ser Leu Ser Ala Tyr Pro Leu Asn Ser Ser Cys Val Ile Val Ser
725 730 735
Trp Ile Leu Ser Pro Ser Asp Tyr Lys Leu Met Tyr Phe Ile Ile Glu
740 745 750
Trp Lys Asn Leu Asn Glu Asp Gly Glu Ile Lys Trp Leu Arg Ile Ser
755 760 765
Ser Ser Val Lys Lys Tyr Tyr Ile His Asp His Phe Ile Pro Ile Glu
770 775 780
Lys Tyr Gln Phe Ser Leu Tyr Pro Ile Phe Met Glu Gly Val Gly Lys
785 790 795 800
Pro Lys Ile Ile Asn Ser Phe Thr Gln Asp Asp Ile Glu Lys His Gln
805 810 815
Ser Asp Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Gly Glu Gln
820 825 830
Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu His His His His His His
835 840 845

<210> 91
<211> 1051
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> hLEPR-mFc aa 1-818: P48357的F22-D839 aa 819-1051: 小鼠IgG2a (P01863的E98-K330)

<400> 91

Phe Asn Leu Ser Tyr Pro Ile Thr Pro Trp Arg Phe Lys Leu Ser Cys
1 5 10 15
Met Pro Pro Asn Ser Thr Tyr Asp Tyr Phe Leu Leu Pro Ala Gly Leu
20 25 30
Ser Lys Asn Thr Ser Asn Ser Asn Gly His Tyr Glu Thr Ala Val Glu
35 40 45
Pro Lys Phe Asn Ser Ser Gly Thr His Phe Ser Asn Leu Ser Lys Thr
50 55 60
Thr Phe His Cys Cys Phe Arg Ser Glu Gln Asp Arg Asn Cys Ser Leu
65 70 75 80
Cys Ala Asp Asn Ile Glu Gly Lys Thr Phe Val Ser Thr Val Asn Ser
85 90 95
Leu Val Phe Gln Gln Ile Asp Ala Asn Trp Asn Ile Gln Cys Trp Leu
100 105 110
Lys Gly Asp Leu Lys Leu Phe Ile Cys Tyr Val Glu Ser Leu Phe Lys
115 120 125
Asn Leu Phe Arg Asn Tyr Asn Tyr Lys Val His Leu Leu Tyr Val Leu
130 135 140
Pro Glu Val Leu Glu Asp Ser Pro Leu Val Pro Gln Lys Gly Ser Phe
145 150 155 160
Gln Met Val His Cys Asn Cys Ser Val His Glu Cys Cys Glu Cys Leu
165 170 175
Val Pro Val Pro Thr Ala Lys Leu Asn Asp Thr Leu Leu Met Cys Leu
180 185 190
Lys Ile Thr Ser Gly Gly Val Ile Phe Gln Ser Pro Leu Met Ser Val
195 200 205
Gln Pro Ile Asn Met Val Lys Pro Asp Pro Pro Leu Gly Leu His Met
210 215 220
Glu Ile Thr Asp Asp Gly Asn Leu Lys Ile Ser Trp Ser Ser Pro Pro
225 230 235 240
Leu Val Pro Phe Pro Leu Gln Tyr Gln Val Lys Tyr Ser Glu Asn Ser
245 250 255
Thr Thr Val Ile Arg Glu Ala Asp Lys Ile Val Ser Ala Thr Ser Leu
260 265 270
Leu Val Asp Ser Ile Leu Pro Gly Ser Ser Tyr Glu Val Gln Val Arg
275 280 285

Gly Lys Arg Leu Asp Gly Pro Gly Ile Trp Ser Asp Trp Ser Thr Pro
290 295 300
Arg Val Phe Thr Thr Gln Asp Val Ile Tyr Phe Pro Pro Lys Ile Leu
305 310 315 320
Thr Ser Val Gly Ser Asn Val Ser Phe His Cys Ile Tyr Lys Lys Glu
325 330 335
Asn Lys Ile Val Pro Ser Lys Glu Ile Val Trp Trp Met Asn Leu Ala
340 345 350
Glu Lys Ile Pro Gln Ser Gln Tyr Asp Val Val Ser Asp His Val Ser
355 360 365
Lys Val Thr Phe Phe Asn Leu Asn Glu Thr Lys Pro Arg Gly Lys Phe
370 375 380
Thr Tyr Asp Ala Val Tyr Cys Cys Asn Glu His Glu Cys His His Arg
385 390 395 400
Tyr Ala Glu Leu Tyr Val Ile Asp Val Asn Ile Asn Ile Ser Cys Glu
405 410 415
Thr Asp Gly Tyr Leu Thr Lys Met Thr Cys Arg Trp Ser Thr Ser Thr
420 425 430
Ile Gln Ser Leu Ala Glu Ser Thr Leu Gln Leu Arg Tyr His Arg Ser
435 440 445
Ser Leu Tyr Cys Ser Asp Ile Pro Ser Ile His Pro Ile Ser Glu Pro
450 455 460
Lys Asp Cys Tyr Leu Gln Ser Asp Gly Phe Tyr Glu Cys Ile Phe Gln
465 470 475 480
Pro Ile Phe Leu Leu Ser Gly Tyr Thr Met Trp Ile Arg Ile Asn His
485 490 495
Ser Leu Gly Ser Leu Asp Ser Pro Pro Thr Cys Val Leu Pro Asp Ser
500 505 510
Val Val Lys Pro Leu Pro Pro Ser Ser Val Lys Ala Glu Ile Thr Ile
515 520 525
Asn Ile Gly Leu Leu Lys Ile Ser Trp Glu Lys Pro Val Phe Pro Glu
530 535 540
Asn Asn Leu Gln Phe Gln Ile Arg Tyr Gly Leu Ser Gly Lys Glu Val
545 550 555 560
Gln Trp Lys Met Tyr Glu Val Tyr Asp Ala Lys Ser Lys Ser Val Ser
565 570 575
Leu Pro Val Pro Asp Leu Cys Ala Val Tyr Ala Val Gln Val Arg Cys
580 585 590
Lys Arg Leu Asp Gly Leu Gly Tyr Trp Ser Asn Trp Ser Asn Pro Ala

595 600 605

Tyr Thr Val Val Met Asp Ile Lys Val Pro Met Arg Gly Pro Glu Phe

610 615 620

Trp Arg Ile Ile Asn Gly Asp Thr Met Lys Lys Glu Lys Asn Val Thr

625 630 635 640

Leu Leu Trp Lys Pro Leu Met Lys Asn Asp Ser Leu Cys Ser Val Gln

645 650 655

Arg Tyr Val Ile Asn His His Thr Ser Cys Asn Gly Thr Trp Ser Glu

660 665 670

Asp Val Gly Asn His Thr Lys Phe Thr Phe Leu Trp Thr Glu Gln Ala

675 680 685

His Thr Val Thr Val Leu Ala Ile Asn Ser Ile Gly Ala Ser Val Ala

690 695 700

Asn Phe Asn Leu Thr Phe Ser Trp Pro Met Ser Lys Val Asn Ile Val

705 710 715 720

Gln Ser Leu Ser Ala Tyr Pro Leu Asn Ser Ser Cys Val Ile Val Ser

725 730 735

Trp Ile Leu Ser Pro Ser Asp Tyr Lys Leu Met Tyr Phe Ile Ile Glu

740 745 750

Trp Lys Asn Leu Asn Glu Asp Gly Glu Ile Lys Trp Leu Arg Ile Ser

755 760 765

Ser Ser Val Lys Lys Tyr Tyr Ile His Asp His Phe Ile Pro Ile Glu

770 775 780

Lys Tyr Gln Phe Ser Leu Tyr Pro Ile Phe Met Glu Gly Val Gly Lys

785 790 795 800

Pro Lys Ile Ile Asn Ser Phe Thr Gln Asp Asp Ile Glu Lys His Gln

805 810 815

Ser Asp Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys

820 825 830

Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro

835 840 845

Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr

850 855 860

Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser

865 870 875 880

Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His

885 890 895

Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile

900 905 910

Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn
915 920 925
Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys
930 935 940
Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu
945 950 955 960
Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe
965 970 975
Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu
980 985 990
Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr
995 1000 1005
Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu
1010 1015 1020
Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn
1025 1030 1035
His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
1040 1045 1050

<210> 92
<211> 1045
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> hLEPR-hFc aa 1-818: P48357的F22-D839 aa 819-1045: 人IgG1 (P01857的D104-K330)
<400> 92

Phe Asn Leu Ser Tyr Pro Ile Thr Pro Trp Arg Phe Lys Leu Ser Cys
1 5 10 15
Met Pro Pro Asn Ser Thr Tyr Asp Tyr Phe Leu Leu Pro Ala Gly Leu
20 25 30
Ser Lys Asn Thr Ser Asn Ser Asn Gly His Tyr Glu Thr Ala Val Glu
35 40 45
Pro Lys Phe Asn Ser Ser Gly Thr His Phe Ser Asn Leu Ser Lys Thr
50 55 60
Thr Phe His Cys Cys Phe Arg Ser Glu Gln Asp Arg Asn Cys Ser Leu
65 70 75 80
Cys Ala Asp Asn Ile Glu Gly Lys Thr Phe Val Ser Thr Val Asn Ser
85 90 95
Leu Val Phe Gln Gln Ile Asp Ala Asn Trp Asn Ile Gln Cys Trp Leu

100 105 110

Lys Gly Asp Leu Lys Leu Phe Ile Cys Tyr Val Glu Ser Leu Phe Lys
115 120 125

Asn Leu Phe Arg Asn Tyr Asn Tyr Lys Val His Leu Leu Tyr Val Leu
130 135 140

Pro Glu Val Leu Glu Asp Ser Pro Leu Val Pro Gln Lys Gly Ser Phe
145 150 155 160

Gln Met Val His Cys Asn Cys Ser Val His Glu Cys Cys Glu Cys Leu
165 170 175

Val Pro Val Pro Thr Ala Lys Leu Asn Asp Thr Leu Leu Met Cys Leu
180 185 190

Lys Ile Thr Ser Gly Gly Val Ile Phe Gln Ser Pro Leu Met Ser Val
195 200 205

Gln Pro Ile Asn Met Val Lys Pro Asp Pro Pro Leu Gly Leu His Met
210 215 220

Glu Ile Thr Asp Asp Gly Asn Leu Lys Ile Ser Trp Ser Ser Pro Pro
225 230 235 240

Leu Val Pro Phe Pro Leu Gln Tyr Gln Val Lys Tyr Ser Glu Asn Ser
245 250 255

Thr Thr Val Ile Arg Glu Ala Asp Lys Ile Val Ser Ala Thr Ser Leu
260 265 270

Leu Val Asp Ser Ile Leu Pro Gly Ser Ser Tyr Glu Val Gln Val Arg
275 280 285

Gly Lys Arg Leu Asp Gly Pro Gly Ile Trp Ser Asp Trp Ser Thr Pro
290 295 300

Arg Val Phe Thr Thr Gln Asp Val Ile Tyr Phe Pro Pro Lys Ile Leu
305 310 315 320

Thr Ser Val Gly Ser Asn Val Ser Phe His Cys Ile Tyr Lys Lys Glu
325 330 335

Asn Lys Ile Val Pro Ser Lys Glu Ile Val Trp Trp Met Asn Leu Ala
340 345 350

Glu Lys Ile Pro Gln Ser Gln Tyr Asp Val Val Ser Asp His Val Ser
355 360 365

Lys Val Thr Phe Phe Asn Leu Asn Glu Thr Lys Pro Arg Gly Lys Phe
370 375 380

Thr Tyr Asp Ala Val Tyr Cys Cys Asn Glu His Glu Cys His His Arg
385 390 395 400

Tyr Ala Glu Leu Tyr Val Ile Asp Val Asn Ile Asn Ile Ser Cys Glu
405 410 415

Thr Asp Gly Tyr Leu Thr Lys Met Thr Cys Arg Trp Ser Thr Ser Thr
420 425 430
Ile Gln Ser Leu Ala Glu Ser Thr Leu Gln Leu Arg Tyr His Arg Ser
435 440 445
Ser Leu Tyr Cys Ser Asp Ile Pro Ser Ile His Pro Ile Ser Glu Pro
450 455 460
Lys Asp Cys Tyr Leu Gln Ser Asp Gly Phe Tyr Glu Cys Ile Phe Gln
465 470 475 480
Pro Ile Phe Leu Leu Ser Gly Tyr Thr Met Trp Ile Arg Ile Asn His
485 490 495
Ser Leu Gly Ser Leu Asp Ser Pro Pro Thr Cys Val Leu Pro Asp Ser
500 505 510
Val Val Lys Pro Leu Pro Pro Ser Ser Val Lys Ala Glu Ile Thr Ile
515 520 525
Asn Ile Gly Leu Leu Lys Ile Ser Trp Glu Lys Pro Val Phe Pro Glu
530 535 540
Asn Asn Leu Gln Phe Gln Ile Arg Tyr Gly Leu Ser Gly Lys Glu Val
545 550 555 560
Gln Trp Lys Met Tyr Glu Val Tyr Asp Ala Lys Ser Lys Ser Val Ser
565 570 575
Leu Pro Val Pro Asp Leu Cys Ala Val Tyr Ala Val Gln Val Arg Cys
580 585 590
Lys Arg Leu Asp Gly Leu Gly Tyr Trp Ser Asn Trp Ser Asn Pro Ala
595 600 605
Tyr Thr Val Val Met Asp Ile Lys Val Pro Met Arg Gly Pro Glu Phe
610 615 620
Trp Arg Ile Ile Asn Gly Asp Thr Met Lys Lys Glu Lys Asn Val Thr
625 630 635 640
Leu Leu Trp Lys Pro Leu Met Lys Asn Asp Ser Leu Cys Ser Val Gln
645 650 655
Arg Tyr Val Ile Asn His His Thr Ser Cys Asn Gly Thr Trp Ser Glu
660 665 670
Asp Val Gly Asn His Thr Lys Phe Thr Phe Leu Trp Thr Glu Gln Ala
675 680 685
His Thr Val Thr Val Leu Ala Ile Asn Ser Ile Gly Ala Ser Val Ala
690 695 700
Asn Phe Asn Leu Thr Phe Ser Trp Pro Met Ser Lys Val Asn Ile Val
705 710 715 720
Gln Ser Leu Ser Ala Tyr Pro Leu Asn Ser Ser Cys Val Ile Val Ser

725 730 735
Trp Ile Leu Ser Pro Ser Asp Tyr Lys Leu Met Tyr Phe Ile Ile Glu
740 745 750
Trp Lys Asn Leu Asn Glu Asp Gly Glu Ile Lys Trp Leu Arg Ile Ser
755 760 765
Ser Ser Val Lys Lys Tyr Tyr Ile His Asp His Phe Ile Pro Ile Glu
770 775 780
Lys Tyr Gln Phe Ser Leu Tyr Pro Ile Phe Met Glu Gly Val Gly Lys
785 790 795 800
Pro Lys Ile Ile Asn Ser Phe Thr Gln Asp Asp Ile Glu Lys His Gln
805 810 815
Ser Asp Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
820 825 830
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
835 840 845
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
850 855 860
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
865 870 875 880
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
885 890 895
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
900 905 910
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
915 920 925
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
930 935 940
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
945 950 955 960
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
965 970 975
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
980 985 990
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
995 1000 1005
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
1010 1015 1020
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
1025 1030 1035

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
1040 1045

<210> 93

<211> 844

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> MfLEPR-mmh aa 1-816: 食蟹猕猴LEPR (XP_005543194.1的F22-D837,具有T827A 替换) aa 817-844:
myc-myc-六组氨酸标签

<400> 93

Phe Asn Leu Ser Tyr Pro Ile Thr Pro Trp Arg Phe Lys Leu Ser Cys
1 5 10 15
Met Pro Pro Asn Ser Thr Tyr Asp Tyr Phe Leu Leu Pro Ala Gly Leu
20 25 30
Ser Lys Asn Thr Ser Asn Leu Asn Gly His Tyr Glu Thr Ala Val Glu
35 40 45
Phe Asn Ser Ser Asp Thr His Phe Ser Asn Leu Ser Lys Thr Thr Phe
50 55 60
His Cys Cys Phe Arg Ser Glu Gln Asp Arg Asn Cys Ser Leu Cys Ala
65 70 75 80
Asp Asn Ile Glu Gly Lys Thr Phe Val Ser Thr Val Asn Ser Ser Val
85 90 95
Phe Gln Gln Met Gly Ala Asn Trp Asn Ile Gln Cys Trp Leu Lys Gly
100 105 110
Asp Leu Lys Leu Phe Ile Cys Tyr Val Glu Ser Leu Phe Lys Asn Pro
115 120 125
Phe Lys Asn Tyr Lys His Lys Val His Leu Leu Tyr Val Leu Pro Glu
130 135 140
Val Leu Glu Asp Ser Pro Leu Val Pro Gln Lys Gly Ser Phe Gln Met
145 150 155 160
Val His Cys Asn Cys Ser Val His Glu Arg Cys Glu Cys Leu Val Pro
165 170 175
Val Pro Thr Ala Lys Leu Asn Asp Thr Leu Leu Met Cys Leu Lys Ile
180 185 190
Thr Ser Gly Gly Val Ile Phe Gln Ser Pro Leu Met Ser Val Gln Pro
195 200 205
Ile Asn Met Val Lys Pro Asp Pro Pro Leu Gly Leu Arg Met Glu Ile
210 215 220

Thr Asp Asp Gly Asn Leu Lys Ile Ser Trp Ser Ser Pro Pro Leu Val
225 230 235 240
Pro Phe Pro Leu Gln Tyr Glu Val Lys Tyr Ser Glu Asn Ser Thr Thr
245 250 255
Val Ile Arg Glu Ala Asp Lys Ile Val Ser Ala Thr Ser Leu Leu Val
260 265 270
Asp Gly Ile Leu Pro Gly Ser Ser Tyr Glu Val Gln Val Arg Gly Lys
275 280 285
Arg Leu Asp Gly Pro Gly Ile Trp Ser Asp Trp Ser Thr Pro His Val
290 295 300
Phe Thr Thr Gln Asp Val Ile Tyr Phe Pro Pro Lys Ile Leu Thr Ser
305 310 315 320
Val Gly Ser Asn Val Ser Phe His Cys Ile Tyr Lys Asn Glu Asn Lys
325 330 335
Ile Val Ser Ser Lys Lys Ile Val Trp Trp Met Asn Leu Ala Glu Lys
340 345 350
Ile Pro Gln Ser Gln Tyr Asp Val Val Ser Asp His Val Ser Lys Val
355 360 365
Thr Phe Phe Asn Leu Asn Glu Thr Lys Pro Arg Gly Lys Phe Thr Tyr
370 375 380
Asp Ala Val Tyr Cys Cys Asn Glu His Glu Cys His His Arg Tyr Ala
385 390 395 400
Glu Leu Tyr Val Ile Asp Val Asn Ile Asn Ile Ser Cys Glu Thr Asp
405 410 415
Gly His Leu Thr Lys Met Thr Cys Arg Trp Ser Thr Asn Thr Ile Gln
420 425 430
Ser Leu Ala Gly Ser Thr Leu Gln Leu Arg Tyr Arg Arg Ser Ser Leu
435 440 445
Tyr Cys Phe Asp Ile Pro Ser Ile His Pro Ile Ser Lys Pro Lys Asp
450 455 460
Cys Tyr Leu Gln Ser Asp Gly Phe Tyr Glu Cys Val Phe Gln Pro Ile
465 470 475 480
Phe Leu Leu Ser Gly Tyr Thr Met Trp Ile Arg Ile Asn His Pro Leu
485 490 495
Gly Ser Leu Asp Ser Pro Pro Thr Cys Val Leu Pro Asp Ser Val Val
500 505 510
Lys Pro Leu Pro Pro Ser Ser Val Lys Ala Glu Ile Ile Lys Asn Ile
515 520 525
Gly Leu Leu Lys Ile Ser Trp Glu Lys Pro Val Phe Pro Glu Asn Asn

530 535 540

Leu Gln Phe Gln Ile Arg Tyr Gly Leu Ser Gly Lys Glu Ile Gln Trp
545 550 555 560
Lys Met Tyr Asp Val Tyr Asp Ala Lys Ser Lys Ser Val Ser Leu Pro
565 570 575
Val Pro Asp Phe Cys Ala Val Tyr Ala Val Gln Val Arg Cys Lys Arg
580 585 590
Ser Asp Gly Leu Gly Leu Trp Ser Asn Trp Ser Asn Pro Ala Tyr Thr
595 600 605
Val Val Met Asp Ile Lys Val Pro Met Arg Gly Pro Glu Phe Trp Arg
610 615 620
Ile Ile Asn Gly Asp Thr Met Lys Lys Glu Lys Asn Val Thr Leu Leu
625 630 635 640
Trp Lys Pro Leu Met Lys Asn Asp Ser Leu Cys Ser Val Gln Arg Tyr
645 650 655
Val Ile Asn His His Thr Ser Cys Asn Gly Thr Trp Ser Glu Asp Val
660 665 670
Gly Asn His Thr Lys Phe Thr Phe Leu Trp Thr Glu Gln Ala His Thr
675 680 685
Val Thr Val Leu Ala Ile Asn Ser Ile Gly Ala Ser Val Ala Asn Phe
690 695 700
Asn Leu Thr Phe Ser Trp Pro Met Ser Lys Val Asn Ile Val Gln Ser
705 710 715 720
Leu Ser Ala Tyr Pro Leu Asn Ser Ser Cys Val Ile Leu Ser Trp Ile
725 730 735
Leu Ser Pro Ser Asp Tyr Lys Leu Met Tyr Phe Ile Ile Glu Trp Lys
740 745 750
Asn Leu Asn Glu Asp Gly Glu Ile Lys Trp Leu Arg Ile Ser Ser Ser
755 760 765
Val Lys Lys Tyr Tyr Ile His Asp His Phe Ile Pro Ile Glu Lys Tyr
770 775 780
Gln Phe Ser Leu Tyr Pro Ile Phe Met Glu Gly Val Gly Lys Pro Lys
785 790 795 800
Ile Ile Asn Ser Phe Ala Gln Asp Asn Thr Glu Lys His Gln Asn Asp
805 810 815
Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Gly Glu Gln Lys Leu
820 825 830
Ile Ser Glu Glu Asp Leu His His His His His His
835 840

<210> 94
<211> 846
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> mLEPR-mmh aa 1-818: 小鼠LEPR (L22-G839 of NP_666258.2) aa 819-846: myc-myc-六组氨酸标签
<400> 94

Leu Asn Leu Ala Tyr Pro Ile Ser Pro Trp Lys Phe Lys Leu Phe Cys
1 5 10 15
Gly Pro Pro Asn Thr Thr Asp Asp Ser Phe Leu Ser Pro Ala Gly Ala
20 25 30
Pro Asn Asn Ala Ser Ala Leu Lys Gly Ala Ser Glu Ala Ile Val Glu
35 40 45
Ala Lys Phe Asn Ser Ser Gly Ile Tyr Val Pro Glu Leu Ser Lys Thr
50 55 60
Val Phe His Cys Cys Phe Gly Asn Glu Gln Gly Gln Asn Cys Ser Ala
65 70 75 80
Leu Thr Asp Asn Thr Glu Gly Lys Thr Leu Ala Ser Val Val Lys Ala
85 90 95
Ser Val Phe Arg Gln Leu Gly Val Asn Trp Asp Ile Glu Cys Trp Met
100 105 110
Lys Gly Asp Leu Thr Leu Phe Ile Cys His Met Glu Pro Leu Pro Lys
115 120 125
Asn Pro Phe Lys Asn Tyr Asp Ser Lys Val His Leu Leu Tyr Asp Leu
130 135 140
Pro Glu Val Ile Asp Asp Ser Pro Leu Pro Pro Leu Lys Asp Ser Phe
145 150 155 160
Gln Thr Val Gln Cys Asn Cys Ser Leu Arg Gly Cys Glu Cys His Val
165 170 175
Pro Val Pro Arg Ala Lys Leu Asn Tyr Ala Leu Leu Met Tyr Leu Glu
180 185 190
Ile Thr Ser Ala Gly Val Ser Phe Gln Ser Pro Leu Met Ser Leu Gln
195 200 205
Pro Met Leu Val Val Lys Pro Asp Pro Pro Leu Gly Leu His Met Glu
210 215 220
Val Thr Asp Asp Gly Asn Leu Lys Ile Ser Trp Asp Ser Gln Thr Met
225 230 235 240
Ala Pro Phe Pro Leu Gln Tyr Gln Val Lys Tyr Leu Glu Asn Ser Thr

245 250 255
Ile Val Arg Glu Ala Ala Glu Ile Val Ser Ala Thr Ser Leu Leu Val
260 265 270
Asp Ser Val Leu Pro Gly Ser Ser Tyr Glu Val Gln Val Arg Ser Lys
275 280 285
Arg Leu Asp Gly Ser Gly Val Trp Ser Asp Trp Ser Ser Pro Gln Val
290 295 300
Phe Thr Thr Gln Asp Val Val Tyr Phe Pro Pro Lys Ile Leu Thr Ser
305 310 315 320
Val Gly Ser Asn Ala Ser Phe His Cys Ile Tyr Lys Asn Glu Asn Gln
325 330 335
Ile Ile Ser Ser Lys Gln Ile Val Trp Trp Arg Asn Leu Ala Glu Lys
340 345 350
Ile Pro Glu Ile Gln Tyr Ser Ile Val Ser Asp Arg Val Ser Lys Val
355 360 365
Thr Phe Ser Asn Leu Lys Ala Thr Arg Pro Arg Gly Lys Phe Thr Tyr
370 375 380
Asp Ala Val Tyr Cys Cys Asn Glu Gln Ala Cys His His Arg Tyr Ala
385 390 395 400
Glu Leu Tyr Val Ile Asp Val Asn Ile Asn Ile Ser Cys Glu Thr Asp
405 410 415
Gly Tyr Leu Thr Lys Met Thr Cys Arg Trp Ser Pro Ser Thr Ile Gln
420 425 430
Ser Leu Val Gly Ser Thr Val Gln Leu Arg Tyr His Arg Arg Ser Leu
435 440 445
Tyr Cys Pro Asp Ser Pro Ser Ile His Pro Thr Ser Glu Pro Lys Asn
450 455 460
Cys Val Leu Gln Arg Asp Gly Phe Tyr Glu Cys Val Phe Gln Pro Ile
465 470 475 480
Phe Leu Leu Ser Gly Tyr Thr Met Trp Ile Arg Ile Asn His Ser Leu
485 490 495
Gly Ser Leu Asp Ser Pro Pro Thr Cys Val Leu Pro Asp Ser Val Val
500 505 510
Lys Pro Leu Pro Pro Ser Asn Val Lys Ala Glu Ile Thr Val Asn Thr
515 520 525
Gly Leu Leu Lys Val Ser Trp Glu Lys Pro Val Phe Pro Glu Asn Asn
530 535 540
Leu Gln Phe Gln Ile Arg Tyr Gly Leu Ser Gly Lys Glu Ile Gln Trp
545 550 555 560

Lys Thr His Glu Val Phe Asp Ala Lys Ser Lys Ser Ala Ser Leu Leu
565 570 575
Val Ser Asp Leu Cys Ala Val Tyr Val Val Gln Val Arg Cys Arg Arg
580 585 590
Leu Asp Gly Leu Gly Tyr Trp Ser Asn Trp Ser Ser Pro Ala Tyr Thr
595 600 605
Leu Val Met Asp Val Lys Val Pro Met Arg Gly Pro Glu Phe Trp Arg
610 615 620
Lys Met Asp Gly Asp Val Thr Lys Lys Glu Arg Asn Val Thr Leu Leu
625 630 635 640
Trp Lys Pro Leu Thr Lys Asn Asp Ser Leu Cys Ser Val Arg Arg Tyr
645 650 655
Val Val Lys His Arg Thr Ala His Asn Gly Thr Trp Ser Glu Asp Val
660 665 670
Gly Asn Arg Thr Asn Leu Thr Phe Leu Trp Thr Glu Pro Ala His Thr
675 680 685
Val Thr Val Leu Ala Val Asn Ser Leu Gly Ala Ser Leu Val Asn Phe
690 695 700
Asn Leu Thr Phe Ser Trp Pro Met Ser Lys Val Ser Ala Val Glu Ser
705 710 715 720
Leu Ser Ala Tyr Pro Leu Ser Ser Ser Cys Val Ile Leu Ser Trp Thr
725 730 735
Leu Ser Pro Asp Asp Tyr Ser Leu Leu Tyr Leu Val Ile Glu Trp Lys
740 745 750
Ile Leu Asn Glu Asp Asp Gly Met Lys Trp Leu Arg Ile Pro Ser Asn
755 760 765
Val Lys Lys Phe Tyr Ile His Asp Asn Phe Ile Pro Ile Glu Lys Tyr
770 775 780
Gln Phe Ser Leu Tyr Pro Val Phe Met Glu Gly Val Gly Lys Pro Lys
785 790 795 800
Ile Ile Asn Gly Phe Thr Lys Asp Ala Ile Asp Lys Gln Gln Asn Asp
805 810 815
Ala Gly Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Gly Glu Gln
820 825 830
Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu His His His His His His
835 840 845

<210> 95
<211> 846
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> rLEPR-mmh aa 1-818: 大鼠LEPR (L22-G839 of NP_036728.1) aa 819-846: myc-myc-六组氨酸标签

<400> 95

Leu Asn Leu Ala Tyr Pro Thr Ser Pro Trp Arg Phe Lys Leu Phe Cys
1 5 10 15
Ala Pro Pro Ser Thr Thr Asp Asp Ser Phe Leu Ser Pro Ala Gly Val
20 25 30
Pro Asn Asn Thr Ser Ser Leu Lys Gly Ala Ser Glu Ala Leu Val Glu
35 40 45
Ala Lys Phe Asn Ser Thr Gly Ile Tyr Val Ser Glu Leu Ser Lys Thr
50 55 60
Ile Phe His Cys Cys Phe Gly Asn Glu Gln Gly Gln Asn Cys Ser Ala
65 70 75 80
Leu Thr Gly Asn Thr Glu Gly Lys Thr Leu Ala Ser Val Val Lys Pro
85 90 95
Leu Val Phe Arg Gln Leu Gly Val Asn Trp Asp Ile Glu Cys Trp Met
100 105 110
Lys Gly Asp Leu Thr Leu Phe Ile Cys His Met Glu Pro Leu Leu Lys
115 120 125
Asn Pro Phe Lys Asn Tyr Asp Ser Lys Val His Leu Leu Tyr Asp Leu
130 135 140
Pro Glu Val Ile Asp Asp Leu Pro Leu Pro Pro Leu Lys Asp Ser Phe
145 150 155 160
Gln Thr Val Gln Cys Asn Cys Ser Val Arg Glu Cys Glu Cys His Val
165 170 175
Pro Val Pro Arg Ala Lys Val Asn Tyr Ala Leu Leu Met Tyr Leu Glu
180 185 190
Ile Thr Ser Ala Gly Val Ser Phe Gln Ser Pro Leu Met Ser Leu Gln
195 200 205
Pro Met Leu Val Val Lys Pro Asp Pro Pro Leu Gly Leu Arg Met Glu
210 215 220
Val Thr Asp Asp Gly Asn Leu Lys Ile Ser Trp Asp Ser Gln Thr Lys
225 230 235 240
Ala Pro Phe Pro Leu Gln Tyr Gln Val Lys Tyr Leu Glu Asn Ser Thr
245 250 255
Ile Val Arg Glu Ala Ala Glu Ile Val Ser Asp Thr Ser Leu Leu Val
260 265 270

Asp Ser Val Leu Pro Gly Ser Ser Tyr Glu Val Gln Val Arg Ser Lys
275 280 285
Arg Leu Asp Gly Ser Gly Val Trp Ser Asp Trp Ser Leu Pro Gln Leu
290 295 300
Phe Thr Thr Gln Asp Val Met Tyr Phe Pro Pro Lys Ile Leu Thr Ser
305 310 315 320
Val Gly Ser Asn Ala Ser Phe Cys Cys Ile Tyr Lys Asn Glu Asn Gln
325 330 335
Thr Ile Ser Ser Lys Gln Ile Val Trp Trp Met Asn Leu Ala Glu Lys
340 345 350
Ile Pro Glu Thr Gln Tyr Asn Thr Val Ser Asp His Ile Ser Lys Val
355 360 365
Thr Phe Ser Asn Leu Lys Ala Thr Arg Pro Arg Gly Lys Phe Thr Tyr
370 375 380
Asp Ala Val Tyr Cys Cys Asn Glu Gln Ala Cys His His Arg Tyr Ala
385 390 395 400
Glu Leu Tyr Val Ile Asp Val Asn Ile Asn Ile Ser Cys Glu Thr Asp
405 410 415
Gly Tyr Leu Thr Lys Met Thr Cys Arg Trp Ser Pro Ser Thr Ile Gln
420 425 430
Ser Leu Val Gly Ser Thr Val Gln Leu Arg Tyr His Arg Arg Ser Leu
435 440 445
Tyr Cys Pro Asp Asn Pro Ser Ile Arg Pro Thr Ser Glu Leu Lys Asn
450 455 460
Cys Val Leu Gln Thr Asp Gly Phe Tyr Glu Cys Val Phe Gln Pro Ile
465 470 475 480
Phe Leu Leu Ser Gly Tyr Thr Met Trp Ile Arg Ile Asn His Ser Leu
485 490 495
Gly Ser Leu Asp Ser Pro Pro Thr Cys Val Leu Pro Asp Ser Val Val
500 505 510
Lys Pro Leu Pro Pro Ser Asn Val Lys Ala Glu Ile Thr Ile Asn Thr
515 520 525
Gly Leu Leu Lys Val Ser Trp Glu Lys Pro Val Phe Pro Glu Asn Asn
530 535 540
Leu Gln Phe Gln Ile Arg Tyr Gly Leu Asn Gly Lys Glu Ile Gln Trp
545 550 555 560
Lys Thr His Glu Val Phe Asp Ala Lys Ser Lys Ser Ala Ser Leu Pro
565 570 575
Val Ser Asp Leu Cys Ala Val Tyr Val Val Gln Val Arg Cys Arg Arg

580 585 590

Leu Asp Gly Leu Gly Tyr Trp Ser Asn Trp Ser Ser Pro Ala Tyr Thr
595 600 605

Leu Val Met Asp Val Lys Val Pro Met Arg Gly Pro Glu Phe Trp Arg
610 615 620

Ile Met Asp Gly Asp Ile Thr Lys Lys Glu Arg Asn Val Thr Leu Leu
625 630 635 640

Trp Lys Pro Leu Met Lys Asn Asp Ser Leu Cys Ser Val Arg Arg Tyr
645 650 655

Val Val Lys His Arg Thr Ala His Asn Gly Thr Trp Ser Gln Asp Val
660 665 670

Gly Asn Gln Thr Asn Leu Thr Phe Leu Trp Ala Glu Ser Ala His Thr
675 680 685

Val Thr Val Leu Ala Ile Asn Ser Ile Gly Ala Ser Leu Val Asn Phe
690 695 700

Asn Leu Thr Phe Ser Trp Pro Met Ser Lys Val Asn Ala Val Gln Ser
705 710 715 720

Leu Ser Ala Tyr Pro Leu Ser Ser Ser Cys Val Ile Leu Ser Trp Thr
725 730 735

Leu Ser Pro Asn Asp Tyr Ser Leu Leu Tyr Leu Val Ile Glu Trp Lys
740 745 750

Asn Leu Asn Asp Asp Asp Gly Met Lys Trp Leu Arg Ile Pro Ser Asn
755 760 765

Val Asn Lys Tyr Tyr Ile His Asp Asn Phe Ile Pro Ile Glu Lys Tyr
770 775 780

Gln Phe Ser Leu Tyr Pro Val Phe Met Glu Gly Val Gly Lys Pro Lys
785 790 795 800

Ile Ile Asn Gly Phe Thr Lys Asp Asp Ile Ala Lys Gln Gln Asn Asp
805 810 815

Ala Gly Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Gly Glu Gln
820 825 830

Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu His His His His His His
835 840 845

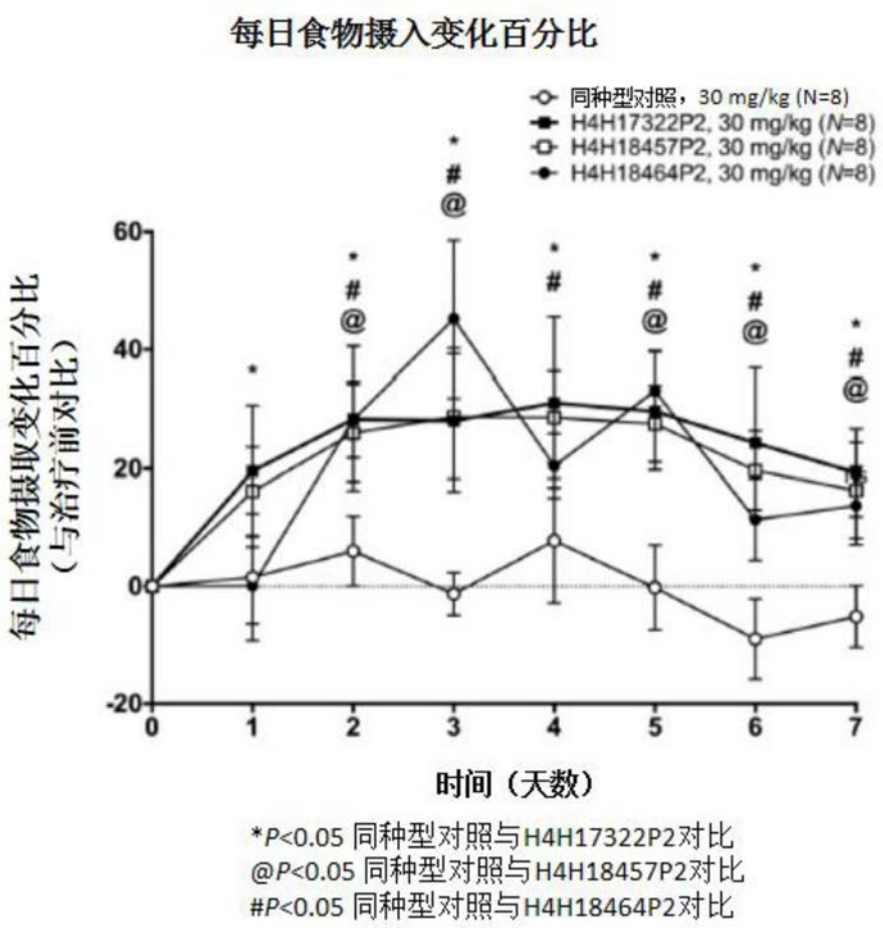
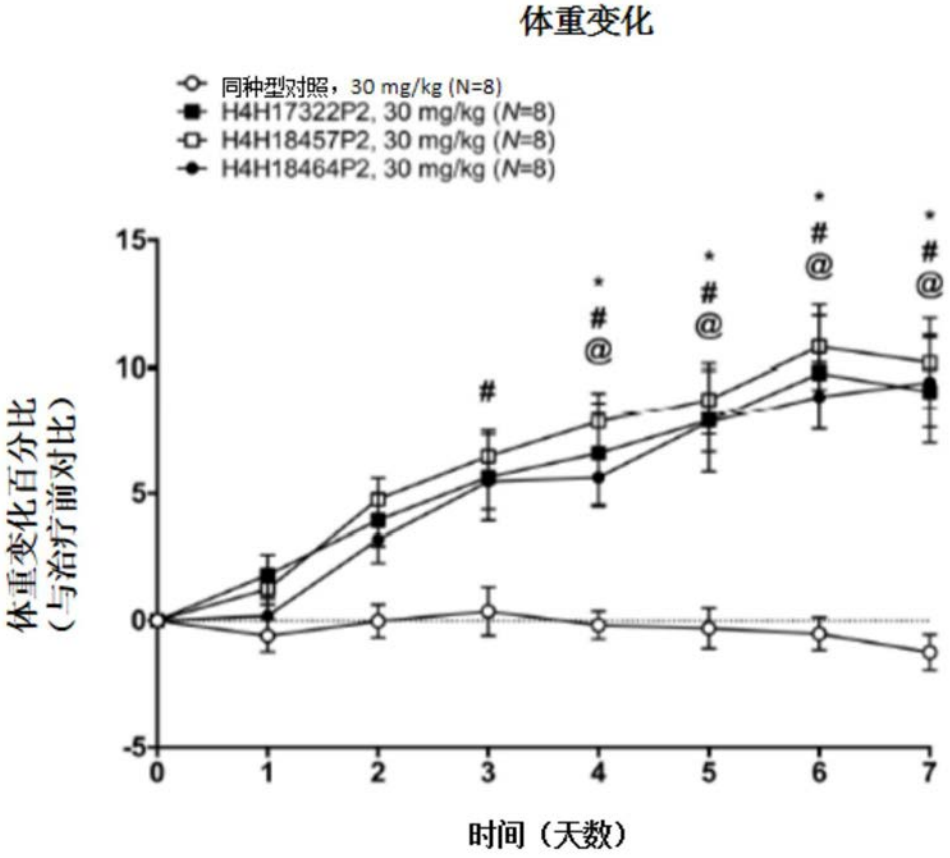

每日食物摄入变化百分比
同种型对照，30 mg/kg (N=8)
H4H17322P2, 30 mg/kg (N=8)
H4H18457P2, 30 mg/kg (N=8)
H4H18464P2, 30 mg/kg (N=8)
每日食物摄取变化百分比
（与治疗前对比）
60
40
20
0
-20
0
1
2
3
4
5
6
7
时间（天数）
*P<0.05 同种型对照与H4H17322P2对比
@P<0.05 同种型对照与H4H18457P2对比
#P<0.05 同种型对照与H4H18464P2对比

图1



*P<0.05 同种型对照与H4H17322P2对比
@P<0.05 同种型对照与H4H18457P2对比
#P<0.05 同种型对照与H4H18464P2对比

图2

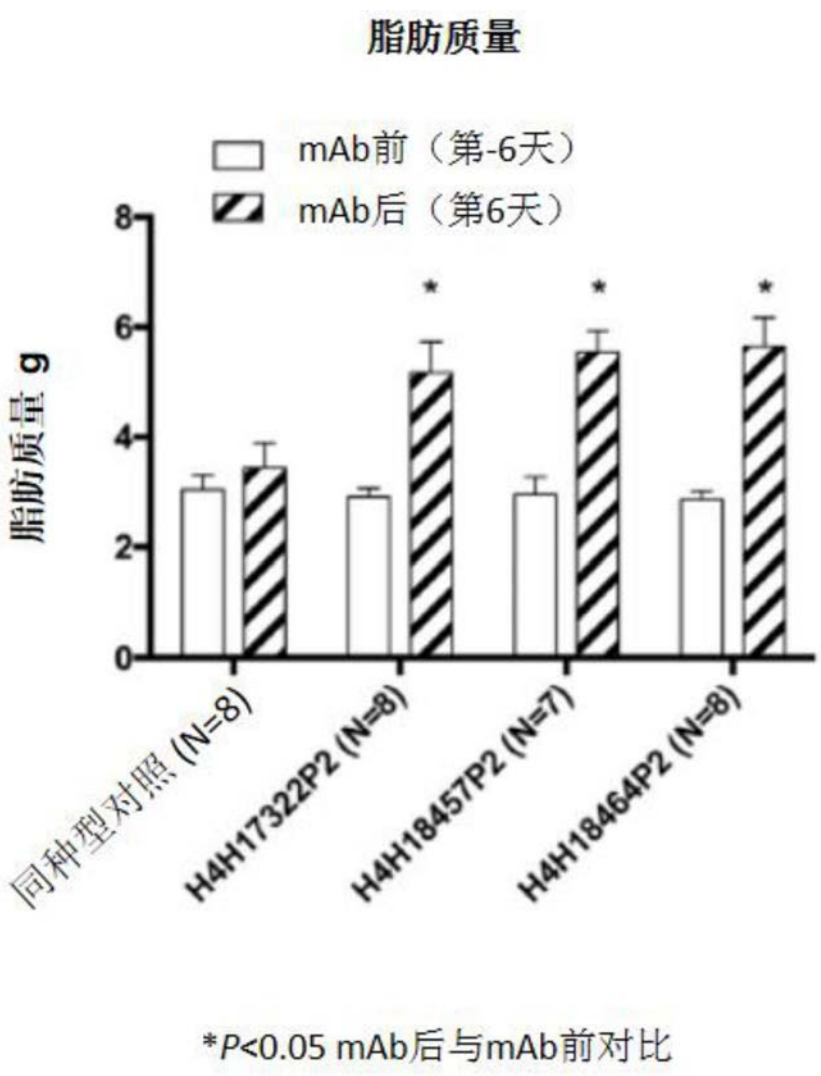

脂肪质量
mAb前（第-6天）
mAb后（第6天）
脂肪质量 g
8
6
4
2
0
*
*
*
同种型对照 (N=8)
H4H17322P2 (N=8)
H4H18457P2 (N=7)
H4H18464P2 (N=8)
*P<0.05 mAb后与mAb前对比

图3