



(21)申請案號：112125041 (22)申請日：中華民國 105 (2016) 年 10 月 07 日

(51)Int. Cl. : C07K16/28 (2006.01) A61K39/395 (2006.01)
A61P3/00 (2006.01) A61P3/10 (2006.01)
A61P25/00 (2006.01)

(30)優先權：2015/10/12 美國 62/240,021
2016/07/08 美國 62/359,757
2016/08/16 美國 62/375,495
2016/09/12 美國 62/393,143

(71)申請人：美商再生元醫藥公司 (美國) REGENERON PHARMACEUTICALS, INC. (US)
美國

(72)發明人：格羅馬達 加斯帕 GROMADA, JESPER (DK)；史戴維斯 帕娜伊奧蒂斯 STEVIS,
PANAYIOTIS (US)；阿爾塔雷霍斯 朱迪斯 ALTAREJOS, JUDITH (CA)

(74)代理人：何愛文；王仁君

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：34 項 圖式數：7 共 79 頁

(54)名稱
活化瘦素受體的抗原結合蛋白

(57)摘要

本發明係提供與瘦素受體(LEPR)結合之抗體和抗體的抗原結合片段，以及彼等之使用方法。根據特定的實施例，本發明係包括結合 LEPR 和活化 LEPR 訊號傳遞之抗體和抗體的抗原結合片段。在其他的實施例中，本發明係包括與 LEPR 結合及增進 LEPR 對抗原之敏感性的抗體和抗體的抗原結合片段。在特定的實施例中，本發明係包括在有和無瘦素的存在下與 LEPR 結合之抗體和抗體的抗原結合片段。在特定的實施例中，本發明係包括在表現 LEPR 突變之細胞中引發訊傳遞之抗體和抗體的抗原結合片段，其中該突變係在瘦素的存在下具有缺陷和損傷的訊號傳遞。本發明之抗體和抗原結合片段可用於治療脂質失養和其他由瘦素缺乏或瘦素阻抗所造成或與其相關的疾病和病症。

The present invention provides antibodies and antigen-binding fragments of antibodies that bind to leptin receptor (LEPR), and methods of using the same. According to certain embodiments, the invention includes antibodies and antigen-binding fragments of antibodies that bind LEPR and activate LEPR signaling. In other embodiments, the invention includes antibodies and antigen-binding fragments of antibodies that bind to LEPR and enhance sensitization of LEPR to an antigen. In certain embodiments, the invention includes antibodies and antigen-binding fragments of antibodies that bind LEPR in the presence and absence of leptin. In certain embodiments, the invention includes antibodies and antigen-binding fragments of antibodies that induce signaling in cells expressing LEPR mutants that otherwise exhibit defective or impaired signaling in the presence of leptin. The antibodies and antigen-binding fragments of the present invention are useful for the treatment of lipodystrophies and other diseases and disorders associated with or caused by leptin deficiency or leptin resistance.

指定代表圖：

阻斷 10 nM hLepR ecto-hFc 與人類瘦素(hLeptin)結合

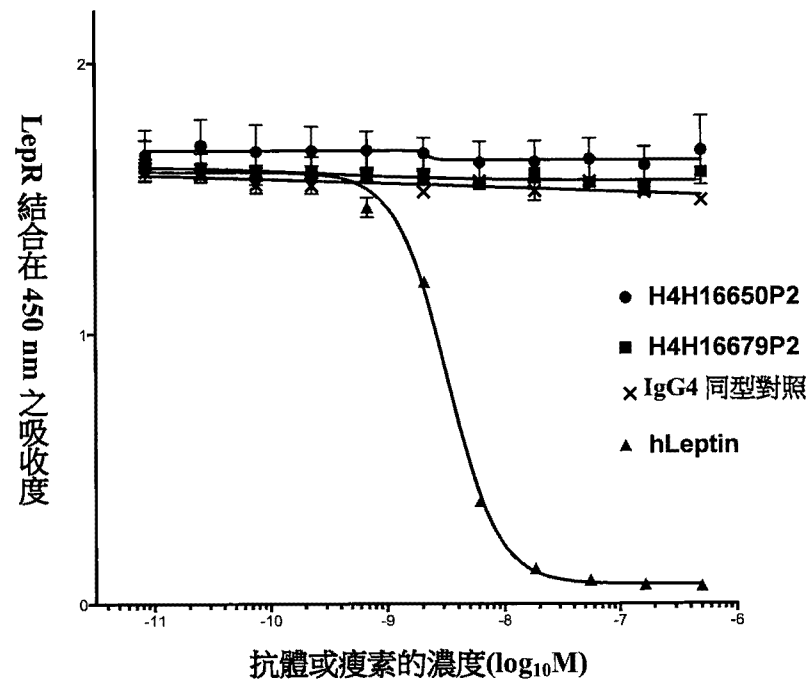


圖 1

發明摘要

【發明名稱】（中文/英文）

活化瘦素受體的抗原結合蛋白

ANTIGEN-BINDING PROTEINS THAT ACTIVATE THE LEPTIN
RECEPTOR

【中文】

本發明係提供與瘦素受體(LEPR)結合之抗體和抗體的抗原結合片段，以及彼等之使用方法。根據特定的實施例，本發明係包括結合LEPR和活化LEPR訊號傳遞之抗體和抗體的抗原結合片段。在其他的實施例中，本發明係包括與LEPR結合及增進LEPR對抗原之敏感性的抗體和抗體的抗原結合片段。在特定的實施例中，本發明係包括在有和無瘦素的存在下與LEPR結合之抗體和抗體的抗原結合片段。在特定的實施例中，本發明係包括在表現LEPR突變之細胞中引發訊傳遞之抗體和抗體的抗原結合片段，其中該突變係在瘦素的存在下具有缺陷和損傷的訊號傳遞。本發明之抗體和抗原結合片段可用於治療脂質失養和其他由瘦素缺乏或瘦素阻抗所造成或與其相關的疾病和病症。

【英文】

The present invention provides antibodies and antigen-binding fragments of antibodies that bind to leptin receptor (LEPR), and methods of using the same. According to certain embodiments, the invention includes antibodies and antigen-binding fragments of antibodies that bind LEPR and activate LEPR

signaling. In other embodiments, the invention includes antibodies and antigen-binding fragments of antibodies that bind to LEPR and enhance sensitization of LEPR to an antigen. In certain embodiments, the invention includes antibodies and antigen-binding fragments of antibodies that bind LEPR in the presence and absence of leptin. In certain embodiments, the invention includes antibodies and antigen-binding fragments of antibodies that induce signaling in cells expressing LEPR mutants that otherwise exhibit defective or impaired signaling in the presence of leptin. The antibodies and antigen-binding fragments of the present invention are useful for the treatment of lipodystrophies and other diseases and disorders associated with or caused by leptin deficiency or leptin resistance.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（1）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

活化瘦素受體的抗原結合蛋白

ANTIGEN-BINDING PROTEINS THAT ACTIVATE THE LEPTIN
RECEPTOR

【技術領域】

【0001】 本發明係提供與瘦素受體(LEPR)結合之抗體和抗體的抗原結合片段，以及彼等之使用方法。根據特定的實施例，本發明係包括結合LEPR和活化LEPR訊號傳遞之抗體和抗體的抗原結合片段。在其他的實施例中，本發明係包括與LEPR結合及增進LEPR對抗原之敏感性的抗體和抗體的抗原結合片段。在特定的實施例中，本發明係包括在有和無瘦素的存在下與LEPR結合之抗體和抗體的抗原結合片段。在特定的實施例中，本發明係包括在表現LEPR突變之細胞中引發訊傳遞之抗體和抗體的抗原結合片段，其中該突變係在瘦素的存在下具有缺陷和損傷的訊號傳遞。本發明之抗體和抗原結合片段可用於治療脂質失養和其他由瘦素缺乏或瘦素阻抗所造成或與其相關的疾病和病症。

【先前技術】

【0002】 瘦素為一種多肽激素，主要係由脂肪組織表現且係涉及代謝、能量平衡和食物攝取之調節。瘦素活性係藉由與瘦素受體相互作用及經由瘦素受體傳遞訊號所媒介。瘦素受體(亦稱為「LEPR」、「WSX」、「OB」受體、「OB-R」和「CD295」)為一帶有大的(818個胺基酸)胞外區之第I類細胞激素受體家族的單次跨膜受體。瘦素缺乏、瘦素阻抗和特定LEPR訊號傳遞缺陷/訊號傳遞損傷突變，係與肥胖、第II型糖尿病、血脂異

常、脂質失養、脂肪肝、非酒精性和酒精性脂肪肝疾病、嚴重胰島素阻抗、矮妖精貌症候群(Leprechaunism/Donohue syndrome)、Rabson-Mendenhall症候群及相關併發症有關。解決瘦素阻抗、瘦素缺乏和低瘦蛋白血症(例如脂質失養)之治療方法大多數係集中在遞送補充的瘦素或瘦素類似物給患病個體。此等方法，然而，一般而言顯示有限的效用，特別是在瘦素阻抗的個體，且常常係與不良的副作用有關。因此，在本項技術中對於治療瘦素阻抗和其他與瘦素缺乏或低瘦蛋白血症有關症狀的替代方法係有需求存在。

【發明內容】

【0003】 本發明係提供與人類瘦素受體(LEPR)結合之抗體及其抗原結合片段。本發明之抗體為促效劑抗體，亦即本發明之抗-LEPR 抗體與 LEPR 結合造成，其中包括，細胞中瘦素受體訊號傳遞活化。在特定的實施例中，本發明之抗體不會與瘦素競爭和 LEPR 結合。本發明之抗體可用於，例如，在一患者中模擬、取代或補充正常瘦素正常活性。本發明之抗體和抗原結合片段因此可用於治療與瘦素阻抗和瘦素缺乏的疾病和病症。

【0004】 本發明之抗體可為全長的(例如，IgG1 或 IgG4 抗體)或可僅包含抗原結合部份(例如 Fab、F(ab')₂ 或 scFv 片段)，及可經修飾影響功能性，例如消除殘餘的效應子功能(Reddy 等人，2000, J. Immunol. 164:1925-1933)。

【0005】 例示的本發明之抗-LEPR 抗體係列於文中之表 1 和 2 中。表 1 係列出例示的抗-LEPR 抗體之重鏈可變區(HCVR)和輕鏈可變區(LCVR)、重鏈互補決定區(HCDR1、HCDR2 和 HCDR3)和輕鏈互補決定區(LCDR1、LCDR2 和 LCDR3)之胺基酸序列辨識碼。表 2 係列出例示的抗-LEPR 抗體之 HCVR、LCVR、HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、

LCDR2 和 LCDR3 之核酸序列辨識碼。

【0006】 本發明係提供包含一 HCVR 並與 LEPR 專一結合的抗體或其抗原結合片段，該 HCVR 係包含由表 1 所列的任何 HCVR 胺基酸序列中選出之胺基酸序列，或具有與其至少 90%、至少 95%、至少 98%或至少 99%序列相同度之實質上其類似序列。

【0007】 本發明係提供包含一 LCVR 並與 LEPR 專一結合的抗體或其抗原結合片段，該 LCVR 係包含由表 1 所列的任何 LCVR 胺基酸序列中選出之胺基酸序列，或具有與其至少 90%、至少 95%、至少 98%或至少 99%序列相同度之實質上其類似序列。

【0008】 本發明亦提供包含 HCVR 和 LCVR 胺基酸序列對 (HCVR/LCVR)並與 LEPR 專一結合的抗體或其抗原結合片段，而該 HCVR 和 LCVR 胺基酸序列對係包括表 1 所列的任何 HCVR 胺基酸序列與表 1 所列的任何 LCVR 胺基酸序配對。根據特定的實施例，本發明係提供包括一 HCVR/LCVR 胺基酸序列對之抗體或其抗原結合片段，而該 HCVR/LCVR 胺基酸序列對係包含在表 1 所列的任何例示抗-LEPR 抗體中。在特定的實施例中，此 HCVR/LCVR 胺基酸序列對係由下列組成之群選出：SEQ ID NO: 2/10、18/10、26/10、34/10、42/10、50/10、58/66、74/66 和 82/66。

【0009】 本發明亦提供包含一重鏈 CDR1 (HCDR1)並與 LEPR 專一結合的抗體或其抗原結合片段，而該重鏈 CDR1 係包括一由表 1 所列的任何 HCDR1 胺基酸序列中選出之胺基酸序列，或具有至少 90%、至少 95%、至少 98%或至少 99%序列相同度之實質上其類似的序列。

【0010】 本發明亦提供包含一重鏈 CDR2 (HCDR2)並與 LEPR 專一結合的抗體或其抗原結合片段，而該重鏈 CDR2 係包括一由表 1 所列的任

何 HCDR2 胺基酸序列中選出之胺基酸序列，或具有至少 90%、至少 95%、至少 98%或至少 99%序列相同度之實質上其類似的序列。

【0011】 本發明亦提供包含一重鏈 CDR3 (HCDR3)並與 LEPR 專一結合的抗體或其抗原結合片段，而該重鏈 CDR3 係包括一由表 1 所列的任何 HCDR3 胺基酸序列中選出之胺基酸序列，或具有至少 90%、至少 95%、至少 98%或至少 99%序列相同度之實質上其類似的序列。

【0012】 本發明亦提供包含一輕鏈 CDR1 (LCDR1)並與 LEPR 專一結合的抗體或其抗原結合片段，而該輕鏈 CDR1 係包括一由表 1 所列的任何 LCDR1 胺基酸序列中選出之胺基酸序列，或具有至少 90%、至少 95%、至少 98%或至少 99%序列相同度之實質上其類似的序列。

【0013】 本發明亦提供包含一輕鏈 CDR2 (LCDR2)並與 LEPR 專一結合的抗體或其抗原結合片段，而該輕鏈 CDR2 係包括一由表 1 所列的任何 LCDR2 胺基酸序列中選出之胺基酸序列，或具有至少 90%、至少 95%、至少 98%或至少 99%序列相同度之實質上其類似的序列。

【0014】 本發明亦提供包含一輕鏈 CDR3 (LCDR2)並與 LEPR 專一結合的抗體或其抗原結合片段，而該輕鏈 CDR3 係包括一由表 1 所列的任何 LCDR3 胺基酸序列中選出之胺基酸序列，或具有至少 90%、至少 95%、至少 98%或至少 99%序列相同度之實質上其類似的序列。

【0015】 本發明亦提供包含一 HCDR3 和一 LCDR3 胺基酸序列對 (HCDR3/LCDR3)並與 LEPR 專一結合的抗體或其抗原結合片段，而該胺基酸序列對係包括表 1 所列的任何 HCDR3 胺基酸序列與表 1 所列的任何 LCDR3 胺基酸序配對。根據特定的實施例，本發明係提供包括一 HCDR3/LCDR3 胺基酸序列對之抗體或其抗原結合片段，而該 HCDR3/LCDR3 胺基酸序列對係包含在表 1 所列的任何例示抗-LEPR 抗體

中。在特定的實施例中，此 HCDR3/LCDR3 胺基酸序列對係由下列組成之群選出 SEQ ID NO: 8/16、24/16、32/16、40/16、48/16、56/16、64/72、80/72 和 88/72。

【0016】 本發明亦提供與 LEPR 專一結合的抗體或其抗原結合片段，其係包括一組六個包含在表 1 中之 CDR (亦即 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3)。在特定的實施例中，此 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 胺基酸序列係由下列組成之群中選出：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；44、46、48、12、14、16；52、54、56、12、14、16；60、62、64、68、70、72；76、78、80、68、70、72；及 84、86、88、68、70、72。

【0017】 在一相關的實施例中，本發明係提供與 LEPR 專一結合的抗體或其抗原結合片段，其係包括一組六個包含在如表 1 所列的任何例示抗-LEPR 抗體所定義的 HCVR/LCVR 胺基酸序列對中之 CDR (亦即 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3)。例如，本發明係包括與 LEPR 專一結合的抗體或其抗原結合片段，其係包括包含在由下列組成之群中選出的 HCVR/LCVR 胺基酸序列對內之 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 胺基酸序列組：SEQ ID NO: 2/10、18/10、26/10、34/10、42/10、50/10、58/66、74/66 和 82/66。用於鑑定 HCVR 和 LCVR 胺基酸序列中之 CDR 的方法和技術已為本項技術所熟知並可用於鑑別文中所揭示的特定 HCVR 及/或 LCVR 胺基酸序列內的 CDR。可用於鑑別 CDR 界限之例示性習用法包括，例如 Kabat 定義、Chothia 定義和 AbM 定義。一般而言，Kabat 定義係以序列變異性為基準，Chothia 定義係以結構環區域之位置為基準，而 AbM 定義為介於 Kabat 和 Chothia 法之

折衷。參見，例如 Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)；Al-Lazikani 等人, *J. Mol. Biol.* 273:927-948 (1997)；及 Martin 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:9268-9272 (1989)。亦可取得公開的資料庫用來鑑別抗體內的 CDR 序列。

【0018】 本發明亦提供編碼抗-LEPR 抗體或其部分之核酸分子。例如，本發明係提供編碼表 1 中所列的任何 HCVR 胺基酸序列之核酸分子；在特定的實施例中，此核酸分子係包含由表 2 所列的任何 HCVR 核酸序列中選出之多核苷酸序列，或具有與其至少 90%、至少 95%、至少 98% 或至少 99% 序列相同度之實質上其類似的序列。

【0019】 本發明亦提供編碼表 1 中所列的任何 LCVR 胺基酸序列之核酸分子；在特定的實施例中，此核酸分子係包含由表 2 所列的任何 LCVR 核酸序列中選出之多核苷酸序列，或具有與其至少 90%、至少 95%、至少 98% 或至少 99% 序列相同度之實質上其類似的序列。

【0020】 本發明亦提供編碼表 1 中所列的任何 HCDR1 胺基酸序列之核酸分子；在特定的實施例中，此核酸分子係包含由表 2 所列的任何 HCDR1 核酸序列中選出之多核苷酸序列，或具有與其至少 90%、至少 95%、至少 98% 或至少 99% 序列相同度之實質上其類似的序列。

【0021】 本發明亦提供編碼表 1 中所列的任何 HCDR2 胺基酸序列之核酸分子；在特定的實施例中，此核酸分子係包含由表 2 所列的任何 HCDR2 核酸序列中選出之多核苷酸序列，或具有與其至少 90%、至少 95%、至少 98% 或至少 99% 序列相同度之實質上其類似的序列。

【0022】 本發明亦提供編碼表 1 中所列的任何 HCDR3 胺基酸序列之核酸分子；在特定的實施例中，此核酸分子係包含由表 2 所列的任何

HCDR3 核酸序列中選出之多核苷酸序列，或具有與其至少 90%、至少 95%、至少 98%或至少 99%序列相同度之實質上其類似的序列。

【0023】 本發明亦提供編碼表 1 中所列的任何 LCDR1 胺基酸序列之核酸分子；在特定的實施例中，此核酸分子係包含由表 2 所列的任何 LCDR1 核酸序列中選出之多核苷酸序列，或具有與其至少 90%、至少 95%、至少 98%或至少 99%序列相同度之實質上其類似的序列。

【0024】 本發明亦提供編碼表 1 中所列的任何 LCDR2 胺基酸序列之核酸分子；在特定的實施例中，此核酸分子係包含由表 2 所列的任何 LCDR2 核酸序列中選出之多核苷酸序列，或具有與其至少 90%、至少 95%、至少 98%或至少 99%序列相同度之實質上其類似的序列。

【0025】 本發明亦提供編碼表 1 中所列的任何 LCDR3 胺基酸序列之核酸分子；在特定的實施例中，此核酸分子係包含由表 2 所列的任何 LCDR3 核酸序列中選出之多核苷酸序列，或具有與其至少 90%、至少 95%、至少 98%或至少 99%序列相同度之實質上其類似的序列。

【0026】 本發明亦提供編碼 HCVR 之核酸分子，其中該 HCVR 係包含一組三個 CDR(亦即 HCDR1、HCDR2、HCDR3)，其中該 HCDR1、HCDR2、HCDR3 胺基酸序列組係如表 1 中所列之任何例示的抗-LEPR 抗體所定義。

【0027】 本發明亦提供編碼 LCVR 之核酸分子，其中該 LCVR 係包含一組三個 CDR (亦即 LCDR1、LCDR2、LCDR3)，其中該 LCDR1、LCDR2、LCDR3 胺基酸序列組係如表 1 中所列之任何例示的抗-LEPR 抗體所定義。

【0028】 本發明亦提供編碼 HCVR 和 LCVR 二者之核酸分子，其中該 HCVR 係包含表 1 中所列的任何 HCVR 胺基酸序列之胺基酸序列，

及其中該 LCVR 係包含表 1 中所列的任何 LCVR 胺基酸序列之胺基酸序列。在特定的實施例中，此核酸分子係包含由表 2 所列的任何 HCVR 核酸序列中選出之多核苷酸序列，或具有與其至少 90%、至少 95%、至少 98%或至少 99%其序列相同度之實質上其類似的序列，及由表 2 所列的 LCVR 核酸序列中選出之多核苷酸序列，或具有與其至少 90%、至少 95%、至少 98%或至少 99%其序列相同度之實質上其類似的序列。在根據本發明此方面之特定的實施例中，此核酸分子係編碼 HCVR 和 LCVR，其中該 HCVR 和 LCVR 二者係衍生自表 1 中所列的相同抗-LEPR 抗體。

【0029】 本發明亦提供能表現包含一抗-LEPR 抗體之重鏈或輕鏈可變區之多肽的重組表現載體。例如，本發明係包括重組的表現載體，該載體係包含上文所提之任何核酸分子，亦即編碼表 1 中所列的任何 HCVR、LCVR 及/或 CDR 序列之核酸分子。本發明之範圍亦包括已導入此等載體之宿主細胞，以及藉由在得以產生抗體或抗體片段之條件下培養宿主細胞，並回收所產生的抗體和抗體片段來製造抗體或其部分之方法。

【0030】 在另一方面，本發明係提供包含專一與 LEPR 結合的重組人類抗體或其片段及一醫藥可接受載劑之醫藥組成物。在一相關的方面，本發明之特徵為組合抗-LEPR 抗體和第二治療劑之組成物。在一實施例中，此第二治療劑為有利地與抗-LEPR 抗體組合之任何試劑。

【0031】 又在另一方面，本發明係提供使用本發明之抗-LEPR 抗體或抗體之抗原結合部份來增進或刺激 LEPR 訊號傳遞之治療方法。根據本發明此方面，此等方法係包括將一治療上有效量之包括本發明抗體或抗體之抗原結合部份的醫藥組成物投予一有此需要的患者。所治療的病症為藉由刺激或活化 LEPR 訊號傳遞，或另外在活體外或活體內模擬瘦素天然活性而改進、改善、抑制或防止之任何疾病或病症。

【0032】 由審視隨後的詳細說明，其他實施例將變得顯而易見。

【圖式簡單說明】

【0033】 圖 1 係描繪在增加濃度之試驗抗-LEPR 抗體或對照分子的存在下，如 ELISA 所測(吸收度 450nm)，二聚體人類 LEPR 與人類瘦素之結合。

【0034】 圖 2A-2C 係說明在表現野生型 LEPR(圓形)、訊號傳遞缺乏的 LEPR 突變體(A409E, 正方形)，或訊號損傷的 LEPR 突變體(P316T, 三角形)之 HEK293 細胞中，LEPR 訊號傳遞的程度。LEPR 訊號傳遞係以 pSTAT3-Y705/STAT3 之比率來表示，其係由增加濃度之瘦素(圖 2A)、H4H16650 (圖 2B)或 H4H16679 (圖 2C)治療之細胞所製備的西方墨點之密度測量所測。

【0035】 圖 3 係顯示以 3 mg/kg 同型對照抗體，或 3 mg/kg 選自 H4H16650P2、H4H16679P2、H4H17319P2 或 H4H17321P2 之 LEPR 抗體給藥之瘦素-缺乏小鼠的平均每日食物攝取。

【0036】 圖 4 係顯示以 3 mg/kg 同型對照抗體，或 3 mg/kg 選自 H4H16650P2、H4H16679P2、H4H17319P2 或 H4H17321P2 之 LEPR 抗體給藥之小鼠體重的平均百分比變化。

【0037】 圖 5 係顯示以平均 $\pm$ SEM 表示，在抗體治療前(無陰影長條)和治療 6 天後(加陰影長條)由 μ CT 所定量的各抗體治療組動物之平均脂肪重。

【0038】 圖 6 係顯示餵食 30 mg/kg 選自 H4H18482P2、H4H18487P2、H4H18492P2 之抗體或同型對照物的小鼠體重變化百分比。

【0039】 圖 7A-7B. 圖 7A 係顯示在以抗-LEPR 抗體 H4H18482P2、H4H18487P2 或 H4H18492P2 給藥前的小鼠脂肪重。圖 7B 係顯示以 30

mg/kg 的 H4H18482P2、H4H18487P2 或 H4H18492P2 治療之小鼠脂肪重。

【實施方式】

【0040】 在描述本發明之前，應了解本發明不限於所述的特定方法和實驗條件，因為此等方法和條件可改變。亦應了解文中所用的術語僅作為描述特定實施例之目的，且不希望受限，因為本發明之範圍將僅受限於所附的申請專利範圍。

【0041】 除非另有說明，否則所有文中所用的技術和科學術語係具有如本發明所屬技術之一般技術者所正常理解之相同意義。如文中所用，術語「大約」當用於有關特定引述的數值時，係指該值可從該引述值做不大於 1% 的變化。例如，如文中所用，「約 100」一詞包括 99 和 101 及所有介於之間的值(例如 99.1、99.2、99.3、99.4 等)。

【0042】 雖然在施行或試驗本發明時可使用任何該等與文中所述的方法和物質類似或相當者，但較佳的方法和物質為目前所述。

定義

【0043】 詞語「瘦素受體」、「LEPR」及其類似詞語，如文中所用，係指包括 SEQ ID NO:113 中所述之胺基酸序列的人類瘦素受體(亦參見 UniProtKB/Swiss-Prot 登錄號 P48357)。用於科學文獻中之 LEPR 的替代名稱包括「OB 受體」、「OB-R」和「CD295」。LEPR 亦稱為「WSX」(參見，例如美國專利第 7,524,937 號)。詞語「LEPR」係包括單體和多聚體(例如二聚體)LEPR 分子二者。如文中所用，詞語「單體人類 LEPR」係指不含有或具有任何多聚化區域之 LEPR 蛋白或其部份且其在任何正常的情況下係以單一 LEPR 分子存在，與另外的 LEPR 分子並無直接的實體連接。一例示的單體 LEPR 分子為文中所指包括 EQ ID NO:114 胺基酸序列之「hLEPR.mmh」分子(參見，例如文中之實例 3)。如文中所用，詞語「二

聚體人類 LEPR」係指包括二個 LEPR 分子經由連接子、共價鍵、非共價鍵或經由多聚化區域，例如抗體 Fc 區彼此相連接之結構。一例示的二聚體 LEPR 分子在文中係指包括 SEQ ID NO:115 胺基酸序列(參見文中之實例 3)的「hLEPR.mFc」分子，或為在文中係指包括 SEQ ID NO:116 胺基酸序列之「hLEPR.hFc」的分子。如文中所用，詞語如「抗-LEPR 抗體」、「與 LEPR 專一結合之抗體」、「LEPR-專一結合蛋白」及其類似詞語，除非另有特別指出，否則係指與全長人類 LEPR、單體人類 LEPR、二聚體人類 LEPR 或其他包括或由 LEPR 胞外區所組成的結構相結合之分子。

【0044】 除非明確地指出係來自非人類物種，否則所有關於文中之蛋白、多肽和蛋白片段希望係指人類版本的各蛋白、多肽和蛋白片段。因此，除非明確地指出係來非人類物種，例如「小鼠 LEPR」、「猴子 LEPR」等，否則詞語「LEPR」係指人類 LEPR。

【0045】 如文中所用，詞語「細胞表面-表現的 LEPR」，係指一或多個 LEPR 蛋白，或其胞外區，其在活體外或活體內係表現在細胞表面，使得至少一部分的 LEPR 蛋白係暴露於細胞膜的胞外側且易接近抗體的抗原結合部分。「細胞表面表現的 LEPR」可包括或由表現於正常表現 LEPR 蛋白之細胞表面的 LEPR 蛋白所組成。另一種選擇，「細胞表面表現的 LEPR」可包括或由表現於正常不會表現人類 LEPR 蛋白在其表面上但經人工工程化表現 LEPR 在其表面上之細胞表面的 LEPR 蛋白所組成。

【0046】 如文中所用，詞語例如「抗-LEPR 抗體」或「抗體」或與人類瘦素受體結合之抗體係包括具有單一專一性之單價抗體，以及包含與 LEPR 結合之第一臂及與第二(目標)抗原結合之第二臂的雙專一性抗體，其中該抗-LEPR 臂係包括文中表 1 所列的任何 HCVR/LCVR 或 CDR 序列。

【0047】 術語「抗體」如文中所用，係指包括至少一個與特定抗原(例如 LEPR)專一結合或相互作用之互補決定區(CDR)的任何抗原結合分子或分子複合物。術語「抗體」係包括：包含藉由雙硫鍵相連接的四條多肽鏈，二條重(H)鏈和二條輕(L)鏈之免疫球蛋白分子，以及其多聚體(例如 IgM)。各重鏈係包括一重鏈可變區(文中縮寫為 HCVR 或 V_H)及一重鏈恆定區。此重鏈恆定區係包括三個區， C_{H1} 、 C_{H2} 和 C_{H3} 。各輕鏈係包括一輕鏈可變區(文中縮寫為 LCVR 或 V_L)及一輕鏈恆定區。輕鏈恆定區係包括一個區(C_{L1})。 V_H 和 V_L 區可進一步細分為高變區，稱為互補決定區(CDR)，其間散佈著較保守性區域，稱為架構區(FR)。各 V_H 和 V_L 係由三個 CDR 和四個 FR 所組成，以下列順序由胺基端排列至羧基端：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。在本發明不同的實施例中，抗-LEPR 抗體(或其抗原結合部分)之 FR 可與人類生殖系序列相同，或經自然或人工修飾。胺基酸共有序列可以二或多個 CDR 之並排(side-by-side)分析為基準來定義。

【0048】 術語「抗體」，如文中所用，亦包括全抗體分子之抗原結合片段。術語抗體之「抗原結合部分」、抗體之「抗原結合片段」及類似術語，如文中所用，係包括任何與抗原專一性結合形成一複合物之天然生成、酵素製得、合成或基因工程化的多肽或糖蛋白。抗體之抗原結合片段可使用任何適合的標準技術，例如蛋白質水解消化作用或涉及編碼抗體可變區和(視需要)恆定區之 DNA 操作和表現的重組基因工程技術，衍生自例如全抗體分子。此 DNA 為已知的及/或可容易地從例如市面來源、DNA 資料庫(包括，例如噬菌體-抗體資料庫)取得或可經合成。此 DNA 可用化學或藉由使用分子生物技術來定序和操作，例如將一或多個可變及/或恆定區排列成適合的組態，或導入密碼子，產生半胱胺酸殘基、修飾、增添

或刪除胺基酸等。

【0049】 抗原結合片段之非限定實例包括：(i) Fab 片段；(ii) F(ab')₂ 片段；(iii) Fd 片段；(iv) Fv 片段；(v) 單鏈 Fv (scFv) 分子；(vi) dAb 片段；和(vii)由模擬抗體高變區之胺基酸殘基所組成的最小識別單位(例如分離的互補決定區(CDR)，例如 CDR3 胜肽)或限制性 FR3-CDR3-FR4 胜肽。其他工程化分子，例如區域專一性抗體、單區抗體、區域刪除抗體、嵌合抗體、CDR-嫁接抗體、雙抗體、三抗體、四抗體、微抗體、奈米抗體(例如單價奈米抗體、雙價奈米抗體等)、小模組免疫醫藥(SMIP)及鯊可變 IgNAR 區，亦涵蓋在文中所用的「抗原結合片段」詞語內。

【0050】 抗體之抗原結合片段典型地將包括至少一可變區。可變區可為任何大小或胺基酸組成之區域且一般應包括至少一個與一或多個架構序列相鄰或在其架構內之 CDR。在具有 V_L 區與 V_H 區結合之抗原結合片段中，V_H 和 V_L 區可以任何適合的排列位於彼此相對處。例如可變區可為二聚化並含有 V_H-V_H、V_H-V_L 或 V_L-V_L 二聚體。另外，抗體之抗原結合片段可含有單體 V_H 或 V_L 區。

【0051】 在特定的實施例中，抗體之抗原結合片段可含有至少一個可變區與至少一個恆定區共價連接。在本發明之抗體的抗原結合片段內可發現的可變區和恆定區之非限定、例示性組態包括：(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。在任何可變區和恆定區之組態中，包括上列任何的例示性組態，可變區和恆定區可直接彼此相連接或可藉由完整或部分的絞鏈或連接子區相連。絞鏈區可由至少 2 (例如 5、10、15、20、40、60 或更多)個胺基酸所組成，使其在單一多肽分

子中於相鄰的可變及/或恆定區之間產生柔性和半柔性連結。再者，本發明之抗體的抗原結合片段可包括以非共價彼此相互連結及/或與一或多個單體 V_H 或 V_L 區相連結(例如藉由雙硫鍵)之任何上列的可變區和恆定區組態之同源二聚體或異源二聚體(或其他多聚體)。

【0052】 如同全抗體分子，抗原結合片段可為單專一性或多專一性(例如雙專一性)。抗體之多專一性抗原結合片段典型地係包括至少二個不同的可變區，其中各可變區能專一與個別的抗原結合或與相同抗原上的不同表位結合。任何多專一性抗體模式，包括文中所揭示的例示雙專一性抗體模式，可使用本項技術中可取得的習用技術來改造，使其適用於本發明抗體之抗原結合片段狀況。

【0053】 在本發明特定的實施例中，本發明之抗-LEPR 抗體為人類抗體。術語「人類抗體」，如文中所用，希望係包括具有衍生自人類生殖系免疫球蛋白序列之可變區和恆定區的抗體。本發明之人類抗體可包括並非由人類生殖系免疫球蛋白序列所編碼之胺基酸殘基(例如藉由隨機或活體外位點專一性突變所導入之突變或活體內體細胞突變)，例如在 CDR 中及特別是 CDR3。然而，術語「人類抗體」，如文中所用，不希望包括其中衍生自另外哺乳動物物種(例如小鼠)之生殖系的 CDR 序列已稼接在人類架構序列上之抗體。

【0054】 本發明之抗體，在某些實施例中可為重組的人類抗體。術語「重組的人類抗體」，如文中所用，係希望包括藉由重組方法，例如使用重組的表現載體轉染至宿主細胞(進一步詳述於下)所製備、表現、產生或分離之所有人類抗體，由重組的組合人類抗體庫(進一步詳述於下)分離出之抗體，由經轉殖人類免疫球蛋白基因之動物(例如小鼠)分離出的抗體(參見，例如 Taylor 等人(1992) Nucl. Acids Res. 20: 6287-6295)，或由任何

其他涉及將人類免疫球蛋白基因序列與 DNA 序列剪接之方法所製備、表現、產生或分離之抗體。此等重組的人類抗體具有衍生自人類生殖系免疫球蛋白序列之可變區和恆定區。然而，在特定的實施例中，此等重組的人類抗體係在活體外經誘發突變(或當使用以人類 Ig 序列基因轉殖之動物時，為活體內體細胞誘發突變)，且因此重組抗體之 V_H 和 V_L 區的胺基酸序列，當衍生自人類生殖系 V_H 和 V_L 序列或與其有關時，其可能並非天然存在於活體內人類抗體生殖系庫中之序列。

【0055】 本發明係涵蓋在絞鏈、 C_H2 或 C_H3 區具有一或多個突變之抗體，其例如在製造、增進所欲抗體型之產量上可能為所欲的。

【0056】 本發明之抗體可為分離的抗體。「分離的抗體」，如文中所用，係指經鑑定並從至少一種其天然環境之組成份分離及/或回收之抗體。例如，從至少一種生物體之組成份，或從組織或細胞分離或移出之抗體，其中就本發明之目的，該存在自然界或為自然產生的抗體為一「分離的抗體」。分離的抗體亦包括重組細胞內原位抗體。分離的抗體為歷經至少一純化或分離步驟之抗體。根據特定的實施例，分離的抗體可能實質上無其他細胞物質及/或化學物。

【0057】 本發明係包括文中所揭示的抗-LEPR 之變體，當相較於可從其衍生抗體之對應的生殖系序列時，該變體可在重鏈和輕鏈可變區之架構及/或 CDR 區中包括一或多個胺基酸取代、插入及/或刪除。此等突變可藉由將文中所揭示之胺基酸序列與得自例如公開的抗體序列資料庫之生殖系序列相比較，而容易地確定。本發明包括由任何文中所揭示的胺基酸序列所衍生之抗體及其抗原結合片段，其中在一或多個架構及/或 CDR 區中的一或多個胺基酸係突變成衍生抗體之生殖系序列的對應殘基，或另一種人類生殖系序列之對應殘基，或對應生殖系殘基之保守胺基酸取代(此

等序列之改變在文中共同稱為「生殖系突變」)。本項技術之一般技術者，由文中所揭示之重鏈和輕鏈可變區序列開始，可容易地製造許多包括一或多個個別的生殖系突變或其組合之抗體和抗原結合片段。在特定的實施例中， V_H 及/或 V_L 區內的所有架構及/或 CDR 殘基係突變回到衍生此抗體之原始生殖系序列中所發現的殘基。在其他實施例中，僅特定的殘基突變回到原始的生殖系序列，例如僅在 FR1 的前 8 個胺基酸中或 FR4 的後 8 個胺基酸中發現突變的殘基，或僅在 CDR1、CDR2 或 CDR3 內發現突變的殘基。在其他的實施例中，一或多個架構及/或 CDR 殘基係突變成不同生殖系序列之對應殘基(亦即與最初衍生抗體之生殖系序列不同的生殖系序列)。再者，本發明之抗體在架構及/或 CDR 區內可含有任何二或多個生殖系突變之組合，例如，其中特定的個別殘基係突變成特定生殖系序列之對應殘基，而與原始生殖系序列不同的其他殘基係維持原樣或突變成不同生殖系序列之對應殘基。一旦得到後，含有一或多個生殖系突變之抗體和抗原結合片段可容易地檢測其一或多種所欲的性質，例如改善結合專一性、增加結合親和力、改善或增進拮抗或促效性生物性質(視情況而定)、降低致免疫力等。以此通用方法所得到的抗體和抗原結合片段係涵蓋在本發明中。

【0058】 本發明係包括：包含一或多個與文中所揭示的任何例示抗-LEPR 抗體中所發現之可變區或 CDR 胺基酸序列實質上類似或實質上相同之胺基酸序列的抗-LEPR 抗體及其抗原結合片段。

【0059】 當應用於多肽時，術語「實質上類似」係指二個胜肽序列，當以 GAP 或 BESTFIT 程式使用內建缺位權重最佳化對齊時，享有至少 95% 序列相同度，甚佳地至少 98% 或 99% 序列相同度。較佳地，不同的殘基位置係相差在保守性胺基酸取代。「保守性胺基酸取代」為其中一胺基

酸殘基係經另一帶有類似化學性質(例如電荷或疏水性)側鏈(R 基)之胺基酸殘基所取代。一般而言，保守性胺基酸取代實質上不會改變蛋白質的功能特性。在其中彼此有二或多個保守性取代之不同胺基酸序列的案例中，可調高序列相同度之百分比或類似程度以修正此保守性取代作用之性質。調整之方法已為熟習本項技術者所熟知。參見，例如 Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24 : 307-331。具有類似化學性質之側鏈的胺基酸基團實例包括(1)脂系側鏈：甘胺酸、丙胺酸、纈胺酸、白胺酸及異白胺酸；(2)脂系-羥基側鏈：絲胺酸及蘇胺酸；(3)含醯胺側鏈：天門冬醯胺酸和麩醯胺酸；(4)芳香側鏈：苯丙胺酸、酪胺酸及色胺酸；(5)鹼性側鏈：離胺酸、精胺酸及組胺酸；(6)酸性側鏈：天門冬胺酸和麩胺酸，及(7)含硫側鏈有半胱胺酸和甲硫胺酸。較佳的保守性胺基酸取代基群有：纈胺酸-白胺酸-異白胺酸、苯丙胺酸-酪胺酸、離胺酸-精胺酸、丙胺酸-纈胺酸、麩胺酸-天門冬胺酸及天門冬醯胺酸-麩醯胺酸。另一種選擇，保守性置換為在 Gonnet 等人(1992) *Science* 256 : 1443-1445 所揭示的 PAM250 對數概似矩陣中具有正值之任何變化。「中度保守性」置換為在 PAM250 對數概似矩陣中具有非負值之任何變化。

【0060】 多肽之序列類似性，其亦指序列相同度，典型地係使用序列分析軟體來測量。蛋白分析軟體使用分配至各種取代、刪除和其他修飾作用(包括保守性胺基酸取代)之類似度量值配出類似的序列。例如，GCG 軟體含有例如 Gap 和 Bestfit 程式，其可使用內定參數，測定密切相關的多肽間，例如來自不同生物物種之同源多肽，或野生型和其突變蛋白間之序列同源性或序列相同度。參見，例如 GCG Version 6.1。多肽序列亦可使用 FASTA，利用內定或建議參數，一種 GCG Version 6.1 內的程式，作比較。FASTA (例如 FASTA2 和 FASTA3)提供查詢序列和搜尋序列間最佳

重疊區之比對和序列相同度百分比(Pearson (2000)前文)。當本發明序列與含有大量來自不同生物體的序列資料庫作比較時，另一較佳的演算法為使用內定參數之電腦程式 BLAST，特別是 BLASTP 或 TBLASTN。參見，例如 Altschul 等人(1990) J. Mol. Biol. 215 : 403-410 及 Altschul 等人(1997) Nucleic Acids Res. 25 : 3389-402。

包括 Fc 變體之抗-LEPR 抗體

【0061】 根據本發明特定的實施例，提供之抗-LEPR 抗體係包括一包含一或多個突變之 Fc 區，該突變，例如相較於中性 pH，在酸性 pH 時，係增進或減少抗體與 FcRn 受體結合。例如，本發明係包括抗-LEPR 抗體，該抗體係在 Fc 區域的 C_H2 或 C_H3 區包括一突變，其中該(等)突變係在環境中增加 Fc 區域對 FcRn 的親和力(例如在其中 pH 範圍從約 5.5 至約 6.0 的核內體中)。此等突變，當投予動物時，可能造成抗體血清半衰期增加。此等 Fc 修飾之非限制實例包括，例如在位置 250 (例如 E 或 Q)；250 和 428 (例如 L 或 F)；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)之修飾；或在位置 428 及/或 433 (例如 H/L/R/S/P/Q 或 K)及/或 434 (例如 H/F 或 Y)之修飾；或在位置 250 及/或 428 之修飾；或在位置 307 或 308 (例如 308F, V308F)及 434 之修飾。在一實施例中，此修飾係包括一 428L (例如 M428L)和 434S (例如 N434S)修飾；一 428L、259I (例如 V259I)和 308F (例如 V308F)修飾；一 433K (例如 H433K)和一 434 (例如 434Y)修飾；一 252、254 和 256 (例如 252Y、254T 和 256E)修飾；一 250Q 和 428L 修飾(例如 T250Q 和 M428L)；及一 307 及/或 308 修飾(例如 308F 或 308P)。

【0062】 例如本發明係包括含有一 Fc 區之抗-LEPR 抗體，而該 Fc 區係包含一或多個由下列組成之群中選出的突變：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)。所有可能的前述 Fc 區突變之組合，及在文中所揭示的抗體可變區內的其他突變，係涵蓋在本發明的範圍內。

【0063】 本發明之抗-LEPR 抗體可包括一具有降低的效應子功能之修飾 Fc 區。如文中所用，「具有降低的效應子功能之修飾 Fc 區」係指免疫球蛋白之任何 Fc 部份，其相對於野生型、天然生成 Fc 區，係經修飾、突變、截斷，使得包括此修飾 Fc 的分子，相對於包括野生型、天然生成的 Fc 部份，在至少一種由下列組成之群中選出的效應中具有嚴重度或程度上之降低：殺死細胞(例如 ADCC 及/或 CDC)、補體活化、吞噬作用和調理作用。在特定的實施例中，「具有降低的效應子功能之修飾 Fc 區」為一帶有降低或削弱 Fc 受體(例如 FcγR)結合之 Fc 區。

【0064】 在本發明特定的實施例中，修飾的 Fc 區為在絞鏈區包括一取代的變體 IgG1 Fc 或變體 IgG4 Fc。例如，用於本發明內容中之修飾的 Fc 可包括一變體 IgG1 Fc，其中至少一個 IgG1 Fc 絞鏈區的胺基酸係經來自 IgG2 Fc 絞鏈區之對應的胺基酸所置換。另一種選擇，用於本發明內容中之修飾的 Fc 可包括一變體 IgG4 Fc，其中至少一個 IgG4 Fc 絞鏈區的胺基酸係經來自 IgG2 Fc 絞鏈區之對應的胺基酸所置換。可用於本發明內容中之非限定、例示的修飾 Fc 區係描述於美國專利申請公開案第 2014/0243504 號。

【0065】 可用於本發明內容中之其他修飾的 Fc 區和 Fc 修飾包括如 US 2014/0171623；US 8,697,396；US 2014/0134162；WO 2014/043361 中所述之任何修飾。建構包括一修飾 Fc 區之抗體或其他抗原結合融合蛋白的方法，如文中所描述，已為本項技術所知。

抗體之生物特性

【0066】 本發明係包括與人類 LEPR 結合及活化 LEPR 訊號傳遞之抗體及其抗原結合片段。此等抗體在文中可稱為「促效劑抗體」。在本發明內文中，「活化 LEPR 訊號傳遞」係指刺激在表現 LEPR 的細胞中正常由瘦素與 LEPR 之交互作用所產生的胞內效應。在特定的實施例中，「活化 LEPR 訊號傳遞」係指 STAT3 的轉錄活化，其可使用任何可直接或間接測量、鑑定 STAT3 活性之方法來偵測，例如使用表現在一受體細胞株之經標定的 STAT3。例如，本發明係包括在一細胞報導子分析中，例如使用如文中實例 7 中所定義的細胞分析模式或實質上類似的分析，活化 LEPR 訊號傳遞之抗體及其抗原結合片段。偵測 LEPR 活化之細胞報導子分析，例如文中實例 7 中所述之分析，可產生一可偵測訊號，其可用 EC_{50} 值(亦即，產生半數最大訊號傳遞所需之抗體濃度)及/或在瘦素存在下所觀察到的最大訊號傳遞百分比來表示。在本發明特定的例示實施例中，係提供抗-LEPR 抗體，其在一細胞報導子分析中，例如使用如文中實例 7 中所定義的細胞分析模式或實質上類似的分析，係以低於約 12.0 nM 之 EC_{50} 值活化 LEPR 訊號傳遞。在本發明特定的例示實施例中，係提供抗-LEPR 抗體，其在一細胞報導子分析中，例如使用如文中實例 7 中所定義的細胞分析模式或實質上類似的分析，係以相對大於約 65%之瘦素號號傳遞的活化最大百分比，活化 LEPR 訊號傳遞。

【0067】 本發明係包括以高親和力與單體人類 LEPR 結合之抗體及其抗原結合片段。例如，本發明係包括，如在 25°C 或 37°C 以表面電漿子共振，例如使用文中實例 3 所定義的分析模式或實質上類似的分析所測量，以低於約 150 nM 之 K_D 與單體人類 LEPR (例如 hLEPR.mmh, SEQ ID NO:114)結合的抗-LEPR 抗體。根據特定的實施例，係提供抗-LEPR 抗體，

其如表面電漿子共振，例如使用文中實例 3 所定義的分析模式或實質上類似的分析所測量，在 25° 係以低於約 150 nM，低於約 140 nM，低於約 130 nM，低於約 120 nM，低於約 110 nM，低於約 100 nM，低於約 90 nM，低於約 80 nM，低於約 70 nM，低於約 60 nM，低於約 50 nM，低於約 40 nM，低於約 30 nM，低於約 20 nM，低於約 10 nM，低於約 9 nM，低於約 8 nM，低於約 7 nM，低於約 6 nM，低於約 5 nM，低於約 4 nM，低於約 3 nM，低於約 2 nM，低於約 1 nM，低於約 900 pM，低於約 800 pM，低於約 700 pM，低於約 600 pM，低於約 500 pM，低於約 400 pM 或低於約 300 pM 之 K_D 與單體人類 LEPR 結合。

【0068】 本發明亦包括，如在 25°C 或 37°C 以表面電漿子共振，例如使用文中實例 3 所定義的分析模式或實質上類似的分析所測量，以大於約 50 分鐘之解離半衰期($t_{1/2}$)與單體人類 LEPR (例如 hLEPR.mmh, SEQ ID NO:114)結合之抗體及其抗原結合片段。根據特定的實施例，係提供抗-LEPR 抗體，其如表面電漿子共振，例如使用文中實例 3 所定義的分析模式或實質上類似的分析所測量，在 25° 係以大於約 50 分鐘，大於約 55 分鐘，大於約 60 分鐘，大於約 65 分鐘或更長之 $t_{1/2}$ 與單體人類 LEPR 結合。

【0069】 本發明亦包括以高親和力與二聚體人類 LEPR (例如 hLEPR.mFc, SEQ ID NO:115)結合之抗體及其抗原結合片段。例如本發明係包括，如在 25°C 或 37°C 以表面電漿子共振，例如使用文中實例 3 所定義的分析模式或實質上類似的分析所測量，以低於約 150 nM 之 K_D 與二聚體人類 LEPR 結合的抗-LEPR 抗體。根據特定的實施例，係提供抗-LEPR 抗體，其如表面電漿子共振，例如使用文中實例 3 所定義的分析模式或實質上類似的分析所測量，在 25° 係以低於約 150 nM，低於約 130 nM，低於約 110 nM，低於約 80 nM，低於約 70 nM，低於約 60 nM，低於約 50 nM，

低於約 40 nM，低於約 30 nM，低於約 20 nM 或低於約 10 nM 之 K_D 與二聚體人類 LEPR 結合。

【0070】 本發明亦包括如在 25°C 或 37°C 以表面電漿子共振，例如使用文中實例 3 所定義的分析模式或實質上類似的分析所測量，以大於約 10 分鐘之解離半衰期($t_{1/2}$)與二聚體人類 LEPR (例如 hLEPR.mFc, SEQ ID NO:115)結合之抗體及其抗原結合片段。根據特定的實施例，係提供抗-LEPR 抗體，其如表面電漿子共振，例如使用文中實例 3 所定義的分析模式或實質上類似的分析所測量，在 25° 係以大於約 10，大於約 15 分鐘，大於約 20 分鐘，大於約 25 分鐘，大於約 30 分鐘，大於約 40 分鐘，大於約 50 分鐘，大於約 60 分鐘，大於約 70 分鐘或更長之 $t_{1/2}$ 與二聚體人類 LEPR 結合。

【0071】 本發明亦包括與人類瘦素複合之 LEPR 結合的抗體及其抗原結合片段(「與人類瘦素複合的 LEPR」亦可以「瘦素:LEPR」一詞表示)。例如，本發明係包括能與包括 hLEPR 和人類瘦素之預形成複合物結合的抗體及其抗原結合片段。亦即，根據特定的實施例，抗-LEPR 抗體和 LEPR 間的相互作用並不會因瘦素與 LEPR 複合物存在而受到抑制；同樣地，瘦素和 LEPR 間的相互作用，根據本發明此方面，不會因抗-LEPR 抗體存在而受到抑制。用於測定抗體或其抗原結合片段是否會和複合的人類瘦素 LEPR 結合之例示分析模式係陳述於文中實例 4 中。

【0072】 同樣地，本發明亦包括與 LEPR 結合且不會阻斷 LEPR:瘦素相互作用之抗體及其抗原結合片段。例如，本發明係包括能與 LEPR 結合，藉此產生抗體:LEPR 複合物之抗體及其抗原結合片段，其中所產生的抗體:LEPR 複合物能與瘦素相互作用產生包括抗體、LEPR 和瘦素之三員複合物。用於測定抗體或其抗原結合片段是否能以不阻斷或干擾 LEPR 和

瘦素間的交互作用之方式與 LEPR 相結合的例示分析模式係陳述於文中實例 5 中。

【0073】 本發明亦包括在有及/或無人類瘦素的存在下與細胞表面表現的 LEPR 結合之抗體及其抗原結合片段。細胞表面表現的 LEPR 係指在天然或工程化細胞株中 LEPR 或其部份(例如 LEPR 之胞外部份)係表現在細胞表面，使得一抗體或其抗原結合片段能與 LEPR 分子結合。在特定的實施例中，細胞表面表現 LEPR 係包括重組的複合物，該複合物係包含一經由標籤(tag)或錨(anchor)(例如，如文中實例 6 中所示之 GPI 錨定蛋白)連接細胞的 LEPR 胞外區。根據本發明此方面，係提供能在無瘦素下與細胞表面表現的 LEPR 結合，及亦能在瘦素的存在下與細胞表面表現的 LEPR 結合之抗體(亦即在其中瘦素能與細胞表面表現瘦素結合之情況下)。亦即，根據特定的實施例，抗-LEPR 抗體和細胞表面表現的 LEPR 間之相互作用不會因瘦素與細胞表面表現 LEPR 複合物的存在而受到抑制。根據本發明此方面抗體能在細胞表面形成一包括抗體、細胞表面表現的 LEPR 和瘦素之三員複合物。測定一抗體或其抗原結合片段是否能在有或無人類瘦素之存在下與細胞表面表現的 LEPR 結合之例示分析模式係陳述於文中實例 6 中。

【0074】 本發明之抗體可具有一或多項前述生物特性或其任何組合。前述之本發明抗體的生物特性列表無意詳盡完備。從審視包括文中工作實例之本揭示文，本發明抗體的其他生物特性對於本項技術之一般技術者為顯而易見的。

表位定位及相關技術

【0075】 本發明亦包括包含文中所揭示的任何 HCVR、LCVR 及/或 CDR 胺基酸序列變體之抗-LEPR 抗體，而該變體係具有一或多個保守

性取代。例如，本發明係包括抗-LEPR 抗體，其相對於文中表 1 所列之任何 HCVR、LCVR 及/或 CDR 胺基酸序列，係具有含 10 個或更少，8 個或更少，6 個或更少，4 個或更少等保守性胺基酸取代之 HCVR、LCVR 及/或 CDR 胺基酸序列。在特定的實施例中，本發明係提供抗-LEPR 抗體，其相對於文中表 1 所列的序列，係包括變體 HCVR、LCVR 及/或 CDR 胺基酸序列(例如包括保守性胺基酸取代)，其中此等變體抗體仍具有一或多項文中所揭示的例示抗-LEPR 抗體之功能及/或性質。

【0076】 人類 LEPR 之胞外區係含有一 N-端細胞激素受體同源區(CRH-1)、類免疫球蛋白(Ig)區及第二 CRH 區(CRH-2)其係稱為瘦素結合區(LBD)。(Carpenter 等人(2012) Structure 20:487-97)。再者，LEPR 與粒細胞集落刺激因子(GCSF)和糖蛋白 130 (gp130)享有最大同源性及類似的胞外區大小和組織(Haniu 等人 (1998) J Biol Chem 273(44): 28691-699)。

【0077】 術語「表位」係指與抗體分子可變區中稱為補位(paratope)的特定抗原結合位置相互作用之抗原決定位。單一抗原可具有一個以上的表位。因此，不同的抗體可與抗原上的不同區域結合並可具有不同的生物效應。表位可為構型或線性。構型表位係由直鏈多肽鏈不同線段之空間上並列的胺基酸所產生。線性表位係由多肽鏈中相鄰的胺基酸殘基所產生。在特定的情況下，表位可在抗原上包括醣類基團、磷醯基基團或磺醯基基團。

【0078】 本發明係包括與人類 LEPR (SEQ ID NO: 113)之胺基酸 M1-D839 中所發現的一或多個表位相互作用之抗-LEPR 抗體。如實例 11 中所示，當與抗體 H4H16650P2 結合時，來自人類 LEPR 之 201 胜肽具有明顯降低的氘化吸收。當與 H4H16650P2 結合時，相當於胺基酸 162-169 (人類 LEPR, SEQ ID NO: 113 之胺基酸 LYVLPEVL)和 170-191(人類 LEPR,

SEQ ID NO: 113 之胺基酸 EDSPLVPQKGSF)之胜肽具有較緩慢的氘化率，其顯示此抗體係與至少二個具有 LYVLPEVL 或 EDSPLVPQKGSF 序列(分別為 SEQ ID NO: 113 之胺基酸 162-169 或 170-191)之人類 LEPR 表位結合。

【0079】 與本發明抗體結合的表位可由 3 或多個(例如 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 個或更多) LEPR 蛋白之胺基酸的單一連續序列所組成。另一種選擇，表位可由多數個 LEPR 之非連續胺基酸(或胺基酸序列)所組成。在某些實施例中，此表位係位於或靠近 LEPR 之瘦素結合區。在其他的實施例中，此表位係位於與 LEPR 之瘦素結合區不同的區域，例如位於 LEPR 表面，在此處當抗體與此一表位結合時不會干擾瘦素與 LEPR 結合。

【0080】 本項技術之一般技術者已知的各種技術皆可用於鑑定由特定抗體所辨識之表位內的胺基酸。例示的技術包括，例如丙胺酸掃描突變分析、胜肽墨點分析及胜肽裂解分析。此外，可使用例如表位切除、表位萃取及抗原之化學修飾等方法(Tomer, 2000, *Protein Science* 9:487-496)。可用於鑑定多肽內與抗體相互作用之胺基酸的另外方法係以質譜偵測氫/氘交換。一般而言，氫/氘交換方法係包括以氘標感興趣蛋白，接著讓抗體與氘標定的蛋白結合。接著，將蛋白/抗體複合物轉置於水中，讓除了受抗體保護的殘基(其仍為氘標定)以外的所有殘基發生氫-氘交換。解離抗體後，將目標蛋白以蛋白酶裂解並以質譜分析，藉此找出氘標定殘基，其係相當於與抗體交互作用之特定胺基酸。參見，例如 Ehrling (1999) *Analytical Biochemistry* 267(2):252-259; Engen and Smith (2001) *Anal. Chem.* 73:256A-265A。抗體與其抗原之複合物的 X-光晶體學分析亦可用於鑑定與抗體相互作用之多肽內的胺基酸。

【0081】 本發明進一步係包括與任何文中所述之特定例示性抗體相同之表位結合的抗-LEPR 抗體(例如，包括如文中表 1 所列之任何胺基酸序列的抗體)。同樣地，本發明亦包括與任何文中所述之特定例示性抗體(例如，包括如文中表 1 所列之任何胺基序的抗體)競爭和 LEPR 結合之抗-LEPR 抗體。

【0082】 藉由使用本項技術中已知的習用方法，可測定一抗體是否與一抗-LEPR 抗體相同的表位結合或是與其競爭結合。例如，就測定試驗抗體是否與如同本發明之參照抗-LEPR 抗體上的相同表位結合，係讓參照抗體與 LEPR 蛋白結合。接著，評估試驗抗體與 LEPR 分子結合之能力。若試驗抗體在與參照抗-LEPR 抗體飽和結合後，能與 LEPR 結合，則其可結論出，該試驗抗體係與不同於參照抗-LEPR 抗體的表位結合。另一方面，若試驗抗體在與參照抗-LEPR 抗體飽和結合後，不能與 LEPR 分子結合，則試驗抗體可能係與和本發明之參照抗-LEPR 抗體結合的表位相同之表位結合。然後可進行另外例行的實驗(例如胜肽突變和結合分析)，以確定所觀察到無試驗抗體結合事實上是否係由於與和參照抗體相同的表位結合所致，或是否係因立體阻斷(或另外的現象)造成無觀察到結合。此類實驗可使用 ELISA、RIA、Biacore、流式細胞儀或本項技術中可取得的任何其他量性或質性抗體-結合分析來進行。依照本發明特定的實施例，如於競爭性結合分析中所測，若例如 1-、5-、10-、20-或 100-倍過量的抗原結合蛋白抑制另一抗體之結合至少 50%，但較佳地 75%、90%或甚至 99%，則二種抗原結合蛋白係與相同(或重疊)的表位結合(參見，例如 Junghans 等人, *Cancer Res.* 1990 50 : 1495-1502)。另一種選擇，若基本上降低或消除一抗體結合的抗原中所有的胺基酸突變，係降低或消除另一種抗體之結合，則二種抗體被認為係與相同的表位結合。若僅一亞群的胺基酸突變降

低或消除一抗體之結合或消除另一種抗體之結合，則二種抗體被認為具有「重疊的表位」。

【0083】 為了測定一抗體否與參照的抗-LEPR 抗體競爭結合，係以二個方向進行上述結合方法：第一個方向：讓參照抗體在飽和的條件下與 LEPR 蛋白結合，接著評估試驗抗體與 LEPR 分子之結合。第二個方向：讓試驗抗體在飽和的條件下與 LEPR 分子結合，接著評估參照抗體與 LEPR 分子之結合。若在二個方向中，僅有第一(飽和)抗體能與 LEPR 分子結合，則結論出試驗抗體和參照抗體係競爭與 LEPR 結合。本項技術之一般技術者應了解，與參照抗體競爭結合之抗體可能不一定係與參照抗體相同之表位結合，但可能藉由與重疊或相鄰的表位結合，在立體上阻斷參照抗體之結合。

製備人類抗體

【0084】 本發明之抗-LEPR 抗體可為全人類抗體。產生單株抗體，包括全人類單株抗體之方法已為本項技術所知。任何此等已知的方法可用於本發明之內文中來製造與人類 LEPR 專一結合之人類抗體。

【0085】 例如，使用 VELOCIMMUNE™技術，或用於產生全人類抗體生產技術之任何其他類似已知方法，起初先分離對 LEPR 具高親和力之具有人類可變區和小鼠恆定區的嵌合抗體。如下文的實驗部份，將抗體定性並就所欲的性質來選擇，包括親和力、選擇性、表位等。若需要，以所欲的人類恆定區置換小鼠恆定區，例如野生型或修飾的 IgG1 或 IgG4，產生全人類抗-LEPR 抗體。當所選的恆定區根據特定用途可不同時，高親和力抗原結合和目標專一性特性仍留在可變區內。在特定的情況下，全人類抗-LEPR 抗體為分離的抗原-陽性 B 細胞。

生物等效性

【0086】 本發明之抗-LEPR 抗體係涵蓋具有與所述的抗體不同之胺基酸序列但其保留與人類 LEPR 結合能力之蛋白。此等變體抗體和抗體片段，當與親代序列相比較時，係包括一或多個胺基酸之添加、刪除或取代，但具有與所述的抗體實質上相當之生物活性。同樣地，本發明之抗-LEPR 抗體-編碼 DNA 序列，當與所揭示的序列相比較時，係涵蓋一或多個核苷酸之添加、刪除或取代，但該序列係編碼與本發明之抗-LEPR 抗體或抗體片段基本上生物等效之抗-LEPR 抗體或抗體片段。此等變體胺基酸和 DNA 序列之實例係如上所論述，

【0087】 二種抗原結合蛋白或抗體，若例如其為醫藥同等物或醫藥替代品，當於類似的實驗條件下以單一劑量或多劑量之相同的莫耳劑量投予時，其吸收速率和程度並無顯示顯著的差異，則係視為生物等效的。某些抗體若其吸收程度相當但是吸收速率不同應可視為等效物或醫藥替代品，且仍可視為生物等效，因為此等吸收速率上的差異為故意的並反映在標示上，對於達到例如長期使用之有效體藥濃度並非必要的，且就特定藥物產品的研究上被視為無醫療上的顯著性。

【0088】 在一實施例中，二種抗原結合蛋白若在其安全性、純度及效力上不具有臨床上有意義的差異，則為生物等效的。

【0089】 在一實施例中，若相較於無此變更之持續治療，病患可在參照產品和生物產品間作一或多次變更而無預期的有害效應之風險增加(包括臨床上致免疫性之明顯改變或效用減低)，則二種抗原結合蛋白為生物等效的。

【0090】 在一實施例中，若二種抗原結合蛋白係藉由共同的機制或作用機制作用於症狀或所用症狀，而達到此等機制已知的程度，則二者係為生物等效的。

【0091】 生物等效性可藉由活體內和活體外方法來驗證。生物等效性測量包括，例如(a)人類或其他哺乳動物之活體內試驗，其中係測量血液、血漿、血清或其他生物體液中隨時間變化之抗體或其代謝物濃度；(b)與人類活體內生物可利用性數據有相互關係及可合理預測此數據之活體外試驗；(c)人類或其他哺乳動物之活體內試驗，其中係測量隨時間變化之抗體(或其目標)的適當急性藥理學效用；及(d)建立抗體之安全性、效力或生物可利用性或生物等效性之良好對照的臨床試驗。

【0092】 本發明之抗-LEPR 抗體的生物等效變體可藉由，例如製造各種殘基或序列之取代，或刪除生物活性不需要的末端或內部殘基或序列來建構。例如，生物活性不需要的半胱胺酸殘基可刪除或以其他的胺基酸置換，以防止因變性而形成不必要或不正確的分子內雙硫橋。在其他內容中，生物等效的抗體可包括抗-LEPR 抗體的變體，該變體係包括修飾此抗體之糖基化特性的胺基酸改變，例如消除或移除糖基化之突變。

物種選擇性和物種交叉反應

【0093】 根據特定的實施例，本發明係提供與人類 LEPR 結合但不會與來自其他物種的 LEPR 結合之抗-LEPR 抗體。本發明亦包括與人類 LEPR 及來自一或多種非人類物種之 LEPR 結合的抗-LEPR 抗體。例如，本發明之抗-LEPR 抗體可能或不可能(視情況而定)與一或多種小鼠、大鼠、天竺鼠、倉鼠、沙鼠、豬、貓、狗、兔、山羊、綿羊、牛、馬、駱駝、獼猴、絨猴、恆河猴或黑猩猩 LEPR 結合。根據本發明特定的例示實施例，係提供專一與人類 LEPR 和獼猴(例如食蟹獼猴)LEPR 結合之抗-LEPR 抗體。本發明之其他抗-LEPR 抗體係與人類 LEPR 結合但不會與獼猴 LEPR 結合或僅微弱結合。

多專一性抗體

【0094】 本發明之抗體可為單專一性或多專一性(例如雙專一性)。多專一性抗體可對一目標多肽之不同的表位具專一性或可含有對一個以上的目標多肽具專一性之抗原結合區。參見，例如 Tutt 等人, 1991, *J. Immunol.* 147:60-69；Kufer 等人, 2004, *Trends Biotechnol.* 22:238-244。本發明之抗-LEPR 抗體可與另外的功能分子，例如另外的胜肽或蛋白相連結或共表現。例如，抗體或其片段可與一或多個其他的分子實體，例如另外的抗體或抗體片段功能性連接(例如藉由化學偶合、基因融合、非共價連結或其他)，產生帶有第二結合專一性之雙專一性或多專一性抗體。

【0095】 本發明係包括雙專一性抗體，其中免疫球蛋白之一臂係與人類 LEPR 結合，而免疫球蛋白之另一臂係對第二抗原具專一性。LEPR-結合臂可包括如文中表 1 所列之任何 HCVR/LCVR 或 CDR 胺基酸序列。

【0096】 可用於本發明內文中之例示的雙專一性抗體模式係包括使用第一免疫球蛋白(Ig) C_H3 區和第二 Ig C_H3 區，其中第一和第二 Ig C_H3 區彼此至少有一個胺基酸不相同，且其中相較於無此胺基酸差異的雙專一性抗體，至少一個胺基酸差異係降低了此雙專一性抗體與蛋白 A 之結合。在一實施例中，第一 Ig C_H3 區係與蛋白 A 結合而第二 Ig C_H3 區含有降低或消除蛋白 A 結合之突變，例如 H95R 修飾(IMG T 外顯子編號；EU 編號為 H435R)。第二 C_H3 可進一步包括 Y96F 修飾(IMG T 編號；EU 為 Y436F)。在第二 C_H3 中可發現的另外修飾作用，就 IgG1 抗體之情況而言係包括：D16E、L18M、N44S、K52N、V57M 和 V82I (IMG T 編號；EU 編號為 D356E、L358M、N384S、K392N、V397M 和 V422I)；及就 IgG2 抗體之情況為 N44S、K52N 和 V82I(IMG T 編號；EU 編號為 N384S、K392N 和 V422I)；及就 IgG4 抗體之情況為 Q15R、N44S、K52N、V57M、R69K、E79Q 和 V82I (IMG T 編號；EU 編號為 Q355R、N384S、K392N、V397M、R409K、

E419Q 和 V422I)。上述雙專一性抗體模式上的變異係涵蓋在本發明之範圍內。

【0097】 可用於本發明內文中之其他例示雙專一性模式包括(不限於)，例如 scFv-為基礎或雙抗體雙專一性模式、IgG-scFv 融合物、雙可變區(DVD)-Ig、雜交瘤(Quadroma)、knobs-into-holes、共同輕鏈(例如帶有 knobs-into-holes 之共同輕鏈等)、CrossMab、CrossFab、(SEED)body、白胺酸拉鏈、Duobody、IgG1/IgG2、雙作用 Fab(DAF)-IgG 和 Mab² 雙專一模式(參見，例如 Klein 等人 2012, mAbs 4:6, 1-11 及文中所引述的參考文獻，作為前述模式之檢視)。雙專一性抗體亦可使用胜肽/核酸接合物來建構，例如，其中係使用帶有正交化學反應性之非天然胺基酸來產生位點專一的抗體-寡核苷酸接合物，然後將其自組裝成帶有定義組成、價數和幾何結構之多聚合複合物(參見，例如 Kazane 等人, *J. Am. Chem. Soc.* [Epub: Dec. 4, 2012])。

治療調配物和給藥

【0098】 本發明係提供包括本發明之抗-LEPR 抗體或其抗原結合片段的醫藥組成物。本發明之醫藥組成物係以適合的載劑、賦形劑和其他提供增進運送、傳遞、耐受等之試劑加以調配。許多適當的調配物可參見所有的醫藥化學家已知之處方：Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA。這些調配物包括，例如，散劑、糊膏、軟膏、膠凍、蠟、油、含有囊泡之脂質(陽離子或陰離子)(例如 LIPOFECTIN™, Life Technologies, Carlsbad, CA)T、DNA 接合物、無水吸收糊膏、水包油和油包水乳液、乳劑卡波蠟(各種分子量之聚乙二醇)、半固體凝膠和含有卡波蠟之半固體混合物。亦參見 Powell 等人 "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) *J Pharm*

Sci Technol 52:238-311。

【0099】 投予病患之抗體的劑量可依照病患的年齡和體型大小、標的疾病、症狀、給藥路徑及其類似因素而不同。較佳的劑量典型地係根據體重或體表面積來計算。在一成人病患中，有利的可以靜脈內投予約 0.01 至約 20 mg/kg 體重，更佳地約 0.02 至約 7，約 0.03 至約 5，或約 0.05 至約 3 mg/kg 體重之單一劑量的本發明抗體。依照症狀之嚴重度，治療之頻率和治療持續時間可調整。投予抗-LEPR 抗體之有效劑量和時程可依經驗來決定；例如可以定期評估來監看病患進步，並據此調整劑量。再者，物種間劑量之衡量可使用本項技術熟知的方法來進行(例如 Mordenti 等人, 1991, *Pharmaceut. Res.* 8:1351)。

【0100】 各種的遞送系統已為所知並可用於投予本發明之醫藥組成物，例如包膠之微脂體、微粒、微膠囊、能表現突變病毒之重組細胞、受體媒介的內吞作用(參見，例如 Wu 等人, 1987, *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432)。導入方法包括(但不限於)皮內、肌肉內、腹膜內、靜脈內、皮下、鼻內、硬膜外和口服路徑。組成物可以任何方便的路徑，例如以輸注或團注、以經由上皮或黏膜層(例如口腔黏膜、直腸和腸黏膜等)吸收來給藥，並可與其他生物活性劑共同給藥。給藥可為全身性或局部的。

【0101】 本發明之醫藥組成物可以標準針和注射器由皮下或靜脈內來遞送。此外，就皮下遞送而言，筆型遞送裝置可容易地應用於遞送本發明之醫藥組成物。此筆型遞送裝置可為重複使用型或拋棄型。可重複使用的筆型遞送裝置一般係利用含有醫藥組成物之可更換補充匣。一旦匣內的所有醫藥組成物投予後而補充匣變空，此空匣可容易丟棄並更換含醫藥組成物之新的補充匣。然後此筆型遞送裝置便可再使用。在拋棄型筆型遞送裝置中無可置換的補充匣。取而代之的，拋棄型筆型遞送裝置係預先填

充醫藥組成物收藏在裝置內的儲槽中。一但醫藥組成物的儲槽變空，整個裝置便可丟棄。

【0102】 許多可重複使用的筆型和自動注射器遞送裝置已應用於皮下遞送本發明之醫藥組成物。實例包括(但不限於)AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK)、DISETRONIC™筆(Disetronic Medical Systems, Bergdorf, Switzerland)、HUMALOG MIX 75/25™ 筆、HUMALOG™筆、HUMALIN 70/30™筆(Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN)、NOVOPEN™ I, II 和 III (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark)、NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark)、BD™ 筆(Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)、OPTIPEN™、OPTIPEN PRO™、OPTIPEN STARLET™和 OPTICLIK™ (Sanofi-Aventis, Frankfurt, Germany)，僅提出一些。用於皮下遞送本發明醫藥組成物之拋棄型筆型遞送裝置之實例包括(但不限於)SOLOSTAR™筆(Sanofi-Aventis)、FLEXPEN™ (Novo Nordisk) 和 KWIKPEN™ (Eli Lilly)、SURECLICK™ Autoinjector (Amgen, Thousand Oaks, CA)、PENLET™ (Haselmeier, Stuttgart, Germany)、EPIPEN (Dey, L.P.) 及 HUMIRA™ 筆(Abbott Labs, Abbott Park IL)，僅提出一些。

【0103】 在特定的情況下，醫藥組成物可以控制釋放系統來遞送。在一實施例中，可使用幫浦(參見 Langer, 前文; Sefton, 1987, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:201)。在另外的實施例中，可使用聚合物質；參見 *Medical Applications of Controlled Release*, Langer and Wise (eds.), 1974, *CRC Pres.*, Boca Raton, Florida。又在另外的實施例中，控制釋放系統可放置在靠近組成物的目標處，因此僅需要全身劑量之一部分(參見，例如 Goodson, 1984, in *Medical Applications of Controlled Release*, 前文, vol. 2, pp. 115-138)。其他的控制釋放系統係論述於 Langer, 1990, *Science* 249:1527-1533 之評論

中。

【0104】 可注射的製備物可包括用於靜脈內、皮下、皮內及肌肉內注射、點滴輸注等之劑型。這些可注射製備物可由公開已知的方法來製備。例如，可注射製備物可，例如藉由將上述抗體或其鹽溶解、懸浮或乳化於注射上習用的無菌水性媒劑或油性媒劑中來製備。注射用之水性媒劑有，例如生理食鹽水、含葡萄糖之等張溶液和其他佐劑等，其可與適合的增溶劑例如醇(例如乙醇)、多醇(例如丙二醇、聚乙二醇)、非離子界面活性劑[例如聚山梨醇酯 80、HCO-50 (氫化蓖麻油之聚環氧乙烷(50 莫耳)加合物)]等組合使用。油性媒劑，可使用芝麻油、大豆油等，其可與增溶劑例如苯甲酸苯甲基酯、苯甲醇等組合使用。由此所製備的注射液較佳地係填充於適當的安瓶中。

【0105】 有利地，上述之口服或非經腸用途之醫藥組成物係製備成適合活性成份劑量之單位劑型。此等單位劑量之劑型包括，例如錠劑、片劑、膠囊、注射劑(安瓶)、栓劑等。所含的前述抗體之量一般每單位劑量之劑型為約 5 至約 500 mg；特別是注射形式，較佳的前述抗體係含有約 5 至約 100 mg，而其他劑型為約 10 至約 250 mg。

抗體之治療用途

【0106】 本發明係包括包含投予有此需要的患者一包含抗-LEPR 抗體(例如包含文中表 1 所列之任何 HCVR/LCVR 或 CDR 序列的抗-LEPR 抗體)的治療組成物之方法。治療組成物可包括文中所揭示之任何抗-LEPR 抗體或其抗原結合片段，以及醫藥上可接受載劑或稀釋劑。

【0107】 本發明之抗體可用於，其中包括，治療、防止及/或改善與瘦素缺乏、瘦素阻抗、低瘦素血症，或其他藉由刺激或活化 LEPR 訊號傳遞可治療或在活體外或活體內模擬天然瘦素活性有關或由其所媒介之疾

病或病症。例如，本發明之抗體及其抗原結合片段可用於治療脂質失養症狀。藉由本發明之抗體和抗原結合片段可治療之例示的脂質失養症狀包括，例如先天性全身脂質失養症、後天性全身脂質失養症、家族性部份脂質失養症、後天性部分脂質失養症、離心性腹部脂質失養症、環狀脂質萎縮、局部脂質失養症及 HIV-有關的脂質失養症。

【0108】 本發明亦包括可用於恢復將瘦素訊號傳遞至表現一或多個與肥胖症有關之 LEPR 突變細胞、組織和器官的抗-LEPR 抗體及其抗原結合片段。例如，特定的 LEPR 突變物經鑑定，其在瘦素的存在下不具有訊號傳遞或降低了訊號傳遞且係與肥胖症和相關的病症有關。如文中所用，LEPR 突變物在瘦素的存在下不具訊號傳遞係稱為「訊號-缺乏的 LEPR 突變物」。一例示的訊號-缺乏 LEPR 突變為 LEPR-A409E (Farooqi 等人, 2007, *N Engl J Med* 356(3): 237-247)。如文中所用，LEPR 突變物在瘦素的存在下具有降低的訊號傳遞(相較於野生型 LEPR)係稱為「訊號-損傷的 LEPR 突變物」。一例示的訊號-損傷 LEPR 突變為 LEPR-P316T (Mazen 等人, 2011, *Mol Genet Metab* 102:461-464)。因此，本發明係包括可用於治療、防止及/或改善由一或多個訊號-缺乏(例如 A409E)及/或訊號-損傷(例如 P316T) LEPR 突變物所造成或與其相關的疾病和病症之抗-LEPR 抗體及其抗原結合片段。

【0109】 本發明之抗-LEPR 抗體及其抗原結合片段亦可用於治療或防止一或多種由下列組成之群中選出的疾病或病症：肥胖症、代謝症候群、飲食引發的食物渴望、功能性下視丘閉經、第 I 型糖尿病、第 II 型糖尿病、胰島素阻抗、嚴重胰島素阻抗，包括因胰島素受體突變所造成的嚴重胰島素阻抗、非胰島素受體突變所造成的嚴重胰島素阻抗、因下游訊號傳遞路徑突變所造成或由其他因素引發的嚴重胰島素阻抗、非酒精性和酒

精性脂肪肝疾病、阿茲海默症、瘦素缺乏、瘦素阻抗、脂質失養症、矮妖精貌症候群、Rabson-Mendenhall 症候群。

【0110】 在文中所述的治療方法內容中，此抗-LEPR 抗體可作為單一治療(亦即作為唯一的治療劑)或與一或多種另外的治療劑組合(其實例係描述於文中他處)來給藥。

組合治療和調配物

【0111】 本發明係包括包含任何文中所述之抗-LEPR 抗體與一或多種另外的治療活性組份組合之組成物和治療調配物，以及包括將此等組合投予有此需要之對象的治療方法。

【0112】 本發明之抗-LEPR 抗體可與一或多種另外的治療活性組份共調配及/或組合給藥，例如用於治療肥胖症、高膽固醇血症、第 2 型糖尿病、第 1 型糖尿病、食慾控制、不孕症等之處方醫藥產品。此等另外的治療活性組份之實例包括，例如重組的人類瘦素(例如美曲普汀(metreleptin)[MYALEPT])、PCSK9 抑制劑(例如抗-PCSK9 抗體[alirocumab、evolocumab、bococizumab、落賽珠單抗(lodelcizumab)、ralpancizumab 等])、他汀類(阿伐他汀(atorvastatin)、瑞舒伐他汀(rosuvastatin)、西立伐他汀(cerivastatin)、匹伐他汀(pitavastatin)、氟伐他汀(fluvastatin)、辛伐他汀(simvastatin)、洛伐他汀(lovastatin)、普伐他汀(pravastatin)等)、依澤替米貝(ezetimibe)、胰島素、胰島素變體、胰島素分泌促進劑、二甲雙胍(metformin)、磺醯脲、葡萄糖共轉運體 2 (SGLT2)抑制劑(例如 dapagliflozin、canagliflozin、empagliflozin 等)、GLP-1 促效劑/類似物(例如艾塞那肽-4(extendin-4)、艾塞那肽(exenatide)、liraglutide、利西拉來(lixisenatide)、阿必魯泰(albiglutide)、度拉糖肽(dulaglutide 等)、昇糖素(GCG)抑制劑(例如抗-GCG 抗體)；昇糖素受體(GCGR)抑制劑(例如抗-GCGR 抗體、小分子 GCGR 拮抗劑、GCGR-

專一性反義寡核苷、抗-GCGR 適體[例如，Spiegelmers]等)、類血管生成素蛋白(ANGPTL)抑制劑(例如抗-ANGPTL3 抗體、抗-ANGPTL4 抗體、抗-ANGPTL8 抗體等)、芬特明(Phentermine)、奧利司他(Orlistat)、妥品美(Topiramate)、丁氨苯丙酮(Bupropion)、妥品美/芬特明、丁氨苯丙酮/納曲酮(Naltrexone)、丁氨苯丙酮/唑尼沙胺(Zonisamide)、普蘭林肽(Pramlintide)/美曲普汀(Metrelepin)、氯卡色林(Lorcaserin)、西替利司他(Cetilistat)、特索芬辛(Tesofensine)、韋利貝特(Velneperit)等。

【0113】 另外的治療活性組份，例如任何上文所列的試劑或其衍生物，可在投予本發明抗-LEPR 抗體之前、同時或之後不久給藥(就本揭示文之目的，此等給藥療法係被視為抗-LEPR 抗體與另外的治療活性組份「組合」給藥)。本發明係包括其中本發明之抗-LEPR 抗體係與一或多種如文中他處所述之另外的治療活性組份共調配之醫藥組成物。

給藥療法

【0114】 根據本發明特定的實施例，可於一定義的時程將多劑量的抗-LEPR 抗體(或包括抗-LEPR 抗體和任何文中所提及之另外的治療活性劑組合之醫藥組成物)投予一患者。根據本發明此方面之方法係包括先後將多劑量之本發明抗-LEPR 抗體投予一患者。如文中所用，「先後給藥」係指各劑量之抗-LEPR 抗體係於不同的時間點投予該患者，例如以預計的間隔隔開之不同日(例如小時、日、週或月)。本發明係包括包含將一單一起始劑量之抗-LEPR 抗體先後投予病患，接著一或多個第二劑量之抗-LEPR 抗及視需要接著一或多個第三劑量之抗-LEPR 抗體的方法。

【0115】 術語「起始劑量」、「第二劑量」和「第三劑量」係指投予本發明抗-LEPR 抗體之暫時順序。因此，「起始劑量」為治療療法開始時所投予之劑量(亦稱為「基線」劑量、「承載劑量」、「開始劑量」等)；

「第二劑量」為在起始劑量之後所投予之劑量；而「第三劑量」為在第二劑量之後所投予之劑量。起始、第二和第三劑量皆可含有相同量的抗-LEPR 抗體，但就給藥的頻率而言，一般可彼此不同。然而，在特定的實施例中，包含在起始、第二及/或第三劑量中之抗-LEPR 抗體之量，在治療期間可互不相同(例如，若適當，經上調或下調)。在特定的實施例中，係在治療法開始時投予二或多個(例如 2、3、4 或 5 個)劑量作為「承載劑量」，接著以較低頻率為基礎，投予後續劑量(例如「維持劑量」)。

抗體之診斷和分析用途

【0116】 本發明之抗-LEPR 抗體亦可用於偵測及/或測量樣本中之 LEPR 或 LEPR-表現細胞，例如供作診斷目的。例如，抗-LEPR 抗體或其片段可用於診斷特徵為 LEPR 異常表現(例如過度表現，表現不足，無表現等)之症狀或疾病。LEPR 之例示性診斷分析可包括，例如將得自病患的樣本與本發明之抗-LEPR 抗體接觸，其中該抗-LEPR 抗體係以可偵測的標記或報導子分子標定。另一種選擇，未標定的抗-LEPR 抗體可與本身經可偵測標記標定之第二抗體組合用於診斷用途。可偵測標記或報導子分子可為放射性同位素，例如 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 或 ^{125}I ；螢光或化學螢光基團，例如螢光素異硫氰酸酯或羅丹明(rhodamine)；或酵素例如鹼性磷酸酶、 β 半乳糖苷酶、辣根過氧化酶或螢光素酶(luciferase)。可用於偵測或測量樣本中之 LEPR 的特定的例示分析包括酵素連結免疫吸附法(ELISA)、放射性免疫分析(RIA)、螢光活化細胞分類(FACS)及正子發射斷層造影(PET)掃描。

【0117】 根據本發明可用於 LEPR 診斷分析之樣本係包括含有可偵測量之 LEPR 蛋白或其片段，其在正常或病理條件下係由病患所得來之任何組織或液體樣本。一般而言，起初係測量得自健康病患(例如未患有與

異常 LEPR 量或活性有關的疾病或症狀之病患)之特定樣本中 LEPR 的量，建立一基線或標準的 LEPR 量。然後可將此 LEPR 之基線量分別與得自疑似患有 LEPR 相關疾病或症狀之個體的樣本中所測量之 LEPR 量作比較。

實例

【0118】 提出下列實例以提供本項技術之一般技術者如何製造及使用本發明方法和組合物之完整揭示和說明，但不希望限制發明者所認為之發明範圍。雖已盡力確保所用的相關數字(例如量、溫度等)之正確性，但仍應考量某些實驗誤差和偏差。除非另有指出，否則份數係為重量之份數，分子量為平均分子量，溫度係以攝氏度數表示，而壓力係為或接近大氣壓。

實例 1.產生與瘦素受體(LEPR)專一結合之抗原結合蛋白

【0119】 抗-LEPR 抗體可藉由以包括 LEPR 胞外區之致免疫原使 VELOCIMMUNE®小鼠(亦即包括編碼人類免疫球蛋白重鏈和 κ 輕鏈可變區之 DNA 的工程化小鼠)免疫來獲得。抗體的免疫反應可藉由 LEPR-專一性免疫分析來監測。使用前述技術，分離和純化全人類抗-LEPR 抗體。

【0120】 根據此實例之方法所產生的例示抗-LEPR 抗體之特定生物性質係詳細描述於下述的實例中。

實例 2.重鏈和輕鏈可變區胺基酸及核酸序列

【0121】 表 1 係列出所選的本發明抗-LEPR 抗體之重鏈和輕鏈可變區及 CDR 的胺基酸序列辨識碼。對應的核酸序列辨識碼係列於表 2 中。

表 1:胺基酸序列辨識碼

	SEQ ID NO:							
抗體命名	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H4H16650P2	2	4	6	8	10	12	14	16
H4H16679P2	18	20	22	24	10	12	14	16
H4H17319P2	26	28	30	32	10	12	14	16

	SEQ ID NO:							
H4H17321P2	34	36	38	40	10	12	14	16
H4H18417P2	42	44	46	48	10	12	14	16
H4H18438P2	50	52	54	56	10	12	14	16
H4H18445P2	58	60	62	64	10	12	14	16
H4H18446P2	66	68	70	72	10	12	14	16
H4H18449P2	74	76	78	80	10	12	14	16
H4H18482P2	82	84	86	88	90	92	94	96
H4H18487P2	98	100	102	104	90	92	94	96
H4H18492P2	106	108	110	112	90	92	94	96

表 2:核酸序列辨識碼

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

【0122】 抗體典型地在文中係根據下列命名法來命名：Fc 字首(例如「H4H」、「H1M」、「H2M」等)，接著數字辨識碼(例如，「16650」、「16679」等)，接著「P」或「N」字尾。因此，根據此命名法，一抗體在文中可稱為，例如「H4H16650P2」、「H4H16679P2」等。在用於文中之抗體命名上 Fc 字首(H4H、H1M 和 H2M)係指抗體特定的 Fc 區同型。例如，「H4H」抗體係具有人類 IgG4 Fc，而「H1M」抗體係具有小鼠 IgG1 Fc(當在抗體中以首字「H」表示時，則全部的可變區為全人類)。本項技術之一般技術者應了解，具有特定 Fc 同型之抗體可轉變為具有不同 Fc 同型之抗體(例如帶有小鼠 IgG1 Fc 之抗體可轉變為帶有人類 IgG4 之抗體等)，

但無論如何，可變區(包括 CDR)-其係以如表 1 和 2 所示的數字辨識碼表示-則仍不變，且結合性質預期為相同的或實質上類似的，與 Fc 之性質無關。

【0123】 「比較 mAb」如用於文中實例，係指 Fazeli 等人(2006) *J Immunol Methods* 312:190-200 及 Carpenter 等人 (2012) *Structure* 20(3):487-97 中所述的 Fab9F8。

實例 3：人類單株抗-LEPR 抗體之表面電漿子共振衍生的結合親和力及動力學常數

【0124】 與純化的抗-LEPR 單株抗體結合之平衡解離常數(K_D)係使用即時表面電漿共振生物感測器分析使用一 Biacore 4000 儀器所測定。所有的結合研究係在 10mM HEPES, 150mM NaCl, 3mM EDTA 和 0.05% v/v 界面活性劑 Tween-20, pH 7.4 (HBS-ET)的電泳緩衝劑中於 25°C 和 37°C 來進行。首先 Biacore 感測器表面係藉由胺與單株小鼠抗-人類 Fc 抗體(GE, # BR-1008-39)偶合衍生化，用以捕捉抗-LEPR 單株抗體。結合研究係在下列 LEPR 試劑上進行：以 C-端 myc-myc-六組胺酸標籤表現之人類 LEPR 胞外區(hLEPR.mmh; SEQ ID NO: 114)、以 C-端 myc-myc-六組胺酸標籤表現之食蟹獼猴 LEPR 胞外區(mfLEPR.mmh; SEQ ID NO: 117)、以 C-端小鼠 IgG2a Fc 標籤表現之人類 LEPR 胞外區(hLEPR.mFc; SEQ ID NO: 115)、以 C-端 myc-myc-六組胺酸標籤表現之小鼠 LEPR 胞外區(mLEPR.mmh; SEQ ID NO: 118)和以 C-端 myc-myc-六組胺酸標籤表現之大鼠 LEPR 胞外區(rLEPR.mmh; SEQ ID NO: 119)。首先以 HBS-ET 電泳緩衝液製備不同的 LEPR 試劑濃度(100nM – 3.7nM; 3-倍連續稀釋)並以 30 μ L/分鐘速率注射在抗人類 Fc 捕捉的抗-LEPR 單株抗體表面上歷時 4 分鐘，同時於 HBS-ET 電泳緩衝液中監測單株抗體結合 LEPR 試劑之解離歷

時 10 分鐘。藉由使用 Scrubber 2.0c 曲線-擬合軟體將即時結合感測圖以質量運輸限制與 1:1 結合模型擬合，測定動力學結合(k_a)和解離(k_d)速率常數。結合解離平衡常數(K_D)和解離半衰期($t_{1/2}$)係由動力學速率常數來計算為：

$$K_D \text{ (M)} = \frac{k_d}{k_a}, \quad \text{及} \quad t_{1/2} \text{ (min)} = \frac{\ln(2)}{60 \cdot k_d}$$

【0125】 在 25°C 和 37°C 就 hLEPR.mmh、mfLEPR.MMH 或 hLEPR.mFc，與不同的本發明抗-LEPR 單株抗體結合之結合動力學參數係如表 3 至 8 所示。

表 3: 25°C 時 hLEPR-MMH 與 LEPR 單株抗體結合之結合動力學參數

捕捉的 mAb	mAb 捕捉量 (RU)	100nM hLEPR-MMH 結合 (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (min)
H4H16650P2	167± 0.3	51	2.81E+04	2.23E-04	7.93E-09	52
H4H16679P2	192± 0.7	39	2.34E+04	2.46E-04	1.05E-08	47
H4H18417P2	163± 0.4	28	6.14E+04	7.90E-03	1.29E-07	1.5
H4H18438P2	166± 0.4	22	3.00E+04	2.26E-03	7.54E-08	5.1
H4H18445P2	194± 1.1	45	4.42E+04	4.78E-03	1.08E-07	2.4
H4H18446P2	163± 2.4	16	1.81E+04	9.51E-04	5.25E-08	12
H4H18449P2	176± 1.3	54	2.91E+04	2.35E-04	8.08E-09	49
H4H18482P2	163± 0.4	47	6.31E+04	6.77E-03	1.07E-07	1.7
H4H18487P2	190± 1.2	42	4.73E+04	7.03E-03	1.48E-07	1.6
H4H18492P2	167± 3.1	87	8.10E+04	8.98E-04	1.11E-08	13
H4H17319P2	200± 0.4	36	2.61E+04	5.29E-04	2.03E-08	22
H4H17321P2	221± 0.5	32	2.36E+04	1.96E-04	8.31E-09	59
同型對照 mAb	171± 0.4	4	NB*	NB*	NB*	NB*

*NB 係表示在目前的實驗條件下無觀察到結合。

表 4: 37°C 時 hLEPR-MMH 與 LEPR 單株抗體結合之結合動力學參數

捕捉的 mAb	mAb 捕捉量 (RU)	100nM hLEPR-MMH 結合 (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (min)
H4H16650P2	210± 2.5	77	4.85E+04	9.58E-04	1.98E-08	12
H4H16679P2	239 ± 2	61	3.84E+04	8.42E-04	2.19E-08	14
H4H18417P2	206± 3.2	22	7.70E+04	1.80E-02	2.33E-07	0.6
H4H18438P2	206± 2.4	32	3.38E+04	5.76E-03	1.70E-07	2.0
H4H18445P2	234 ± 2	38	5.13E+04	1.68E-02	3.26E-07	0.7
H4H18446P2	188± 3.4	21	2.12E+04	2.56E-03	1.21E-07	4.5
H4H18449P2	206± 2.1	73	3.94E+04	8.15E-04	2.07E-08	14
H4H18482P2	188± 0.8	38	9.53E+04	1.93E-02	2.03E-07	0.6
H4H18487P2	219± 1.7	30	6.51E+04	1.86E-02	2.86E-07	0.6
H4H18492P2	192± 2.2	93	1.17E+05	4.18E-03	3.59E-08	2.8
H4H17319P2	264± 0.3	44	3.54E+04	3.41E-03	9.63E-08	3.4
H4H17321P2	290± 0.4	61	2.95E+04	4.38E-04	1.48E-08	26
同型對照 mAb	193± 1.5	6	NB*	NB*	NB*	NB*

*NB 係表示在目前的實驗條件下無觀察到結合。

表 5: 25°C 時 mfLEPR-MMH 與 LEPR 單株抗體結合之結合動力學

捕捉的 mAb	mAb 捕捉量 (RU)	100nM mfLEPR-MMH 結合 (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (min)
H4H16650P2	166± 0.6	93	6.02E+04	1.37E-04	2.27E-09	84
H4H16679P2	191± 0.7	66	4.37E+04	1.41E-04	3.22E-09	82
H4H18417P2	162± 0.3	33	8.83E+04	1.23E-02	1.39E-07	0.9
H4H18438P2	166± 0.6	5	IC*	IC*	IC*	IC*
H4H18445P2	193± 0.6	58	5.90E+04	4.86E-03	8.24E-08	2.4
H4H18446P2	163± 2.8	23	1.93E+04	1.12E-03	5.83E-08	10
H4H18449P2	175± 0.5	6	IC*	IC*	IC*	IC*
H4H18482P2	163± 0.8	63	1.01E+05	6.74E-03	6.66E-08	1.7

捕捉的 mAb	mAb 捕 捉量 (RU)	100nM mfLEP .MMH 結 合 (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (min)
H4H18487P2	189± 0.5	59	7.37E+04	6.79E-03	9.21E-08	1.7
H4H18492P2	165± 2.4	52	1.10E+05	1.20E-02	1.10E-07	1.0
H4H17319P2	213± 0.5	83	4.00E+04	4.63E-04	1.16E-08	25
H4H17321P2	236± 0.4	75	3.26E+04	1.33E-04	4.07E-09	87
同 型 對 照 mAb	171± 0.4	0	NB*	NB*	NB*	NB*

*NB 係表示在目前的實驗條件下無觀察到結合。

*IC 係表示在目前的實驗條件下所觀察到的結合係包含在內且無法擬合即時結合數據。

表 6: 37°C 時 mfLEPR.MMH 與 LEPR 單株抗體結合之結合動力學

捕捉的 mAb	mAb 捕 捉量 (RU)	100nM mfLEP R.MM H 結合 (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (min)
H4H16650P2	204± 1.7	134	1.22E+05	7.00E-04	5.76E-09	16
H4H16679P2	232± 1.1	104	6.49E+04	6.77E-04	1.04E-08	17
H4H18417P2	202± 1.3	28	1.22E+05	2.63E-02	2.17E-07	0.4
H4H18438P2	203± 1.3	7	IC*	IC*	IC*	IC*
H4H18445P2	232± 0.9	48	7.17E+04	1.90E-02	2.64E-07	0.6
H4H18446P2	188± 2.9	30	2.53E+04	3.54E-03	1.40E-07	3.3
H4H18449P2	202± 1	6	IC*	IC*	IC*	IC*
H4H18482P2	187± 1.2	52	1.52E+05	2.04E-02	1.34E-07	0.6
H4H18487P2	216± 0.7	44	1.10E+05	1.95E-02	1.78E-07	0.6
H4H18492P2	191± 1.4	34	2.34E+05	3.94E-02	1.69E-07	0.3
H4H17319P2	274± 0.5	113	5.39E+04	3.24E-03	6.01E-08	3.6
H4H17321P2	304± 0.7	143	4.97E+04	2.57E-04	5.18E-09	45
同 型 對 照 mAb	190± 1	1	NB*	NB*	NB*	NB*

*NB 係表示在目前的實驗條件下無觀察到結合。

*IC 係表示在目前的實驗條件下所觀察到的結合係包含在內且無法擬合即時結合數據。

表 7: 25°C 時 hLEPR.mFc 與 LEPR 單株抗體結合之結合動力學

捕捉的 mAb	mAb 捕捉量 (RU)	100nM hLEPR-mFc 結合 (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (min)
H4H16650P2	165± 0.2	102	1.06E+05	8.32E-05	7.85E-10	139
H4H16679P2	190± 1.2	78	5.84E+04	9.68E-05	1.66E-09	119
H4H18417P2	162± 0.6	90	1.40E+05	5.63E-04	4.04E-09	21
H4H18438P2	165± 1.2	51	5.19E+04	2.44E-04	4.70E-09	47
H4H18445P2	192± 0.4	76	1.22E+05	4.92E-04	4.03E-09	23
H4H18446P2	162± 2.8	20	3.20E+04	2.08E-04	6.48E-09	56
H4H18449P2	174± 0.6	116	7.05E+04	6.82E-05	9.64E-10	169
H4H18482P2	162± 0.5	88	1.44E+05	4.91E-04	3.42E-09	24
H4H18487P2	188± 0.6	85	1.06E+05	6.03E-04	5.70E-09	19
H4H18492P2	166± 3.2	129	2.27E+05	1.39E-04	6.13E-10	83
H4H17319P2	200± 0.5	69	4.77E+04	1.64E-04	3.45E-09	70
H4H17321P2	221± 0.4	65	4.10E+04	8.93E-05	2.18E-09	129
同型對照 mAb	170± 0.7	-2	NB*	NB*	NB*	NB*

*NB 係表示在目前的實驗條件下無觀察到結合。

表 8: 37°C 時 hLEPR.mFc 與 LEPR 單株抗體結合之結合動力學

捕捉的 mAb	mAb 捕捉量 (RU)	100nM hLEPR-mFc 結合 (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (min)
H4H16650P2	199± 1.9	145	1.57E+05	2.80E-04	1.79E-09	41
H4H16679P2	229± 2.3	116	1.21E+05	3.10E-04	2.56E-09	37
H4H18417P2	199± 1.1	111	1.85E+05	1.05E-03	5.64E-09	11
H4H18438P2	199± 0.6	82	7.02E+04	5.98E-04	8.53E-09	19

捕捉的 mAb	mAb 捕 捉量 (RU)	100nM hLEPR -mFc 結 合 (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (min)
H4H18445P2	229± 2	104	1.56E+05	6.08E-04	3.89E-09	19
H4H18446P2	186± 2.5	34	4.27E+04	5.48E-04	1.28E-08	21
H4H18449P2	198± 1.6	148	1.33E+05	1.68E-04	1.26E-09	69
H4H18482P2	185± 1.3	109	1.89E+05	7.26E-04	3.84E-09	16
H4H18487P2	215± 1.5	99	1.23E+05	6.06E-04	4.93E-09	19
H4H18492P2	189± 1.8	160	4.33E+05	5.00E-04	1.16E-09	23
H4H17319P2	262± 0.5	100	8.51E+04	6.52E-04	7.66E-09	18
H4H17321P2	289± 0.4	110	5.53E+04	1.74E-04	3.15E-09	66
同 型 對 照 mAb	188± 0.8	1	NB*	NB*	NB*	NB*

*NB 係表示在目前的實驗條件下無觀察到結合。

【0126】 如表 5 所示，25°C 時，抗-LEPR 單株抗體係以 7.93nM 至 148nM 之 K_D 值範圍與 hLEPR-MMH 結合。如表 4 所示，37°C 時，抗-LEPR 單株抗體係以 14.8nM 至 326nM 之 K_D 值範圍與 hLEPR-MMH 結合。

【0127】 在本發明 12 種抗 -LEPR 單株抗體中有 10 種與 mfLEPR.MMH 結合。如表 7 所示，25°C 時，抗-LEPR 單株抗體係以 2.27nM 至 139nM 之 K_D 值範圍與 mfLEPR.MMH 結合。如表 8 所示，37°C 時，抗 -LEPR 單株抗體係以 5.18nM 至 264nM 之 K_D 值範圍與 mfLEPR.MMH 結合。

【0128】 如表 7 所示，25°C 時，抗-LEPR 單株抗體係以 613pM 至 5.7nM 之 K_D 值範圍與 hLEPR-mFc 結合。如表 8 所示，37°C 時，抗-LEPR 單株抗體係以 1.16nM 至 12.8nM 之 K_D 值範圍與 hLEPR-mFc 結合。

【0129】 在 25°C 或 37°C 時，並無任何的本發明抗-LEPR 單株抗體與 mLEPR.MMH 或 rLEPR.MMH 結合(數據未顯示)。

實例 4.在瘦素:LEPR 結合的存在下，本發明抗-LEPR 抗體與 LEPR 結合

【0130】 使用即時表面電漿子共振生物感測器於 Biacore T200 儀器上評估藉由人類瘦素阻斷抗-LEPR 抗體與 LEPR 結合。整個研究係在 10mM HEPES pH 7.4，150mM NaCl，3mM EDTA 和 0.05% v/v 界面活性劑 Tween-20 (HBS-ET 電泳緩衝液)中於 25°C 進行。首先使用標準 EDC/NHS 表面化學，藉由胺偶合人類瘦素(R&D Systems, # 398-LP)將 Biacore CM5 感測器表面衍生化。藉由以 10μL/分鐘的流速注射 20 nM 以 C-端 myc-myc-六組胺酸標籤表現之人類 LEPR 胞外區(hLEPR.mmh, SEQ ID NO:114)歷時 4 分鐘於人類瘦素固定化 Biacore 感測器表面，形成人類 LEPR 和人類瘦素的複合物，達到約 200RU 的結合反應。

【0131】 為了評估抗體與 hLEPR-MMH 結合是否會被人類瘦素阻斷，係將 200nM 的抗-LEPR 單株抗體以 50μL/分鐘的流速注射在預形成的 hLEPR-MMH:人類瘦素複合物上 4 分鐘。以 RU 表示之觀察到的抗-LEPR 抗體與瘦素:LEPR 複合物結合，係如表 9 所示。

表 9:抗-LEPR 單株抗體與 hLEPR-MMH 和人類瘦素預形成複合物之結合

抗體	結合 hLEPR-MMH (RU)	結合的 200nM mAb (RU)
H4H16650P2	196	81
H4H16679P2	195	90

【0132】 如表 9 中所示，本實驗中檢測的二種本發明抗-LEPR 抗體與 hLEPR-MMH 和人類瘦素複合物以幾乎類似的訊號強度結合。此結果顯示人類瘦素不會阻斷 hLEPR-MMH 與這些例示的抗-LEPR 抗體結合。

實例 5.人類瘦素受體阻斷 ELISA

【0133】 就 ELISA，係將人類瘦素(hLeptin；R&D Systems, # 398-LP-01M)以 5 μg/mL 溶於 PBS 中之濃度塗覆在 96-孔滴定盤上於 4°C

放至隔夜。隨後使用 0.5%(w/v)的 BSA 之 PBS 溶液阻斷非專一性結合位置。將恆量 10 nM 之以 C-端人類 Fc 標籤表現的 LEPR 蛋白胞外區(hLEPR.hFc；SEQ ID NO: 116)以範圍從 8.5 pM 至 500 nM 連續稀釋之抗-LEPR 抗體、hLeptin 蛋白或同型對照抗體滴定。然後將這些抗體-蛋白或蛋白-蛋白複合物於室溫(RT)培養 1.5 小時。隨後將複合物轉置於塗覆 hLeptin 之微量滴定盤，並於 RT 培養 2 小時，清洗孔槽及以接合辣根過氧化酶之抗人類 IgG 多株抗體(Jackson ImmunoResearch Inc, #109-035-098)偵測盤結合的 hLEPR.hFc。以 TMB 溶液(BD Biosciences, #555214；依製造商說明書將基質 A 和 B 以 1:1 比率混合)使樣本顯色，產生色度反應及然後以 1M 硫酸中和，之後以 450 nm 吸收度於 Victor X5 盤式判讀儀上測量。

【0134】 數據分析係使用 Prism™ 軟體內之反曲劑量反應模型(GraphPad)來進行。計算在試驗抗體最大濃度時的阻斷百分比為抗體阻斷 10 nM 的 hLEPR.hFc 與人類瘦素在盤上結合之能力指標。在該計算中，在無抗體存在下，10 nM 的 hLEPR.hFc 之結合訊號稱為 100%結合或 0%阻斷；而無 hLEPR.hFc 存在下緩衝液單獨的基線訊號稱為 0%結合或 100%阻斷。500 nM 抗體濃度下的阻斷數據係彙整於表 10 中。

【0135】 如表 10 所示，並無任何本發明抗-LEPR 抗體展現>28%阻斷 hLEPR.hFc 與塗覆 hLeptin 表面之結合。然而，作為正對照之比較抗體和 hLeptin，能阻斷 99%的 hLEPR.hFc 與塗覆 hLeptin 表面之結合。同型對照抗體在至高 500 nM 濃度時，並未展現可測量的阻斷。

表 10: 抗-LEPR 抗體之 ELISA 阻斷 hLEPR.hFc 與 hLeptin 結合

抗體	500nM Ab 阻斷 10nM hLEPR.hFc 與 hLeptin 之結合 (阻斷%)
H4H18487P2	5
H4H18417P2	16
H4H18482P2	25

H4H18492P2	-3
H4H18445P2	28
H4H18446P2	-5
H4H18449P2	8
H4H18438P2	15
H4H16650P2	-7
H4H16679P2	7
H4H173319P2	9
H4H173321P2	6
對照組	
同型對照抗體	-3
人類瘦素	99
比較抗體	99
小鼠 IgG2a 同型對照	32

實例 6.HEK293/Myx2-hLepR(ecto)-GPI 錨定細胞之 FACS 分析的細胞結合

【0136】 瘦素受體，LEPR 為一種第 I 類細胞激素受體家族的單次跨膜受體(Tartaglia 等人(1997) *J Biol Chem* 7:272(10):6093-6)。LEPR 可與瘦素結合，瘦素為一種主要由脂肪組織表現的蛋白，其係涉及食物攝取和代謝之調節(Friedman 等人(2014) *J Endocrinol* 223(1):T1-8)。

【0137】 為了評估與抗-LEPR 抗體結合的細胞，係產生 HEK293 穩定細胞。一細胞株，此後稱為 HEK293/hLEPR-GPI，以 N-端 myc-myc 標籤和來自人類羧基胜肽酶 M(其係引導 GPI 糖基化磷脂酰肌醇加入)之 C-端胜肽序列穩定表現的人類 LEPR 胞外區(登錄號 P48357(SEQ ID NO:113)之胺基酸 22-839, 同功型 B)(Deddish 等人. (1990) *J. Biological Chemistry* 265:25:15083-89)，使得此蛋白能經 GPI 錨定在膜上。產生另一 HEK293 細胞株用以穩定表現全長人類 LEPR(登錄號 P48357(SEQ ID NO:113)之胺基酸 1-1165, 同功型 B)以及螢光酶報導子(Stat3-luciferase, Stat3-luc, SA Bioscience, #CLS-6028L)，且此後係稱為 HEK293/Stat3-luc/hLEPR-FL。亦產生一僅帶有 Stat3-螢光酶報導子之 HEK293 細胞作為對照細胞株。

【0138】 就 FACS 分析，係將 HEK293 親代細胞和 HEK293/hLEPR-GPI 細胞解離並以 5×10^5 個細胞/孔溶於含 2% FBS 之 PBS(FACS 緩衝液)植入 96-孔 v-底盤。為了檢測抗-hLEPR 抗體與細胞結合的能力是否會受到瘦素存在的影響，係將有或無 $1\mu\text{M}$ 人類瘦素(R&D Systems, # 398-LP)之 FACS 緩衝液與細胞於 4°C 培養 30 分鐘，接著加入 10 nM 溶於 FACS 緩衝液之抗-LEPR 抗體或對照抗體。隨後將細胞於 4°C 培養 30 分鐘，接著清洗及然後以 $16\text{ }\mu\text{g/mL}$ 接合二級抗體的 Alexa Fluor®-647 (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., # 109-547-003)於 4°C 培養 30 分鐘。隨後使用 BD CytoFix™ (Becton Dickinson, # 554655)固定細胞，過濾並於 HyperCyt 流式細胞儀(Beckman Coulter)上分析。亦對所有的細胞株進行未染色及單獨二極抗體對照組之檢測。使用 ForeCyt (IntelliCyt)和 FlowJo version 10 軟體分析結果，測定活細胞之螢光的幾何平均。然後將各樣本的螢光幾何平均正常化至未染色細胞之幾何平均，得到各條件下的相對結合，稱為「結合比」，並就各試驗抗體記錄這些結合比。

【0139】 如表 11 中所示，9 種檢測的本發明抗-LEPR 抗體，在無瘦素下展現以 824 至 3374 倍的結合比與 HEK293/hLEPR-GPI 細胞結合。抗-LEPR 抗體亦在 $1\text{ }\mu\text{M}$ 瘦素的存在下以 398 和 4184 倍的結合比結合。如表 11 中所示，檢測的 10 nM 對照抗體，在無瘦素下展現以 2349 倍的結合比與 HEK293/hLEPR-GPI 細胞結合，但在 $1\text{ }\mu\text{M}$ 瘦素的存在下以 112 倍的結合比顯現明顯與細胞較低的結合。在有或無 $1\text{ }\mu\text{M}$ 瘦素下，抗-LEPR 抗體與 HEK293 親代細胞以 1 至 9 倍結合比範圍並未展現任何明顯的結合。在有或無瘦素下，同型對照抗體和二級抗體單獨樣本以 1 至 6 倍結合比範圍並未展現與細胞任何明顯的結合。

【0140】 如表 12 中所示，檢測的本發明四種抗體在 70 nM 無瘦素時，以 707 至 1131 倍範圍的結合比與 HEK293/hLEPR-GPI 細胞結合，及以 42 至 51 倍範圍的結合比與 HEK293/Stat3-luc/hLEPR-FL 細胞結合。抗-LEPR 抗體與 HEK293/Stat3-luc 細胞以 1 至 8 倍結合範圍比並未展現任何明顯的結合。同型對照抗體和二級抗體同樣與任何檢測的細胞株以 1 至 2 倍結合比範圍並未展現明顯的結合。

表 11: +/- 1μM 人類瘦素下，10nM 抗-LEPR 抗體與 HEK293/hLEPR-GPI 和 HEK293 親代細胞之結合

	結合比: 正常化至各細胞位染色樣本				
	無添加瘦素		1 μM 瘦素		抗體類型
抗體	HEK293 親代	HEK293/ hLEPR- GPI	HEK2 93 親 代	HEK293/ hLEPR-G PI	
H4H16650P2	5	2420	4	3124	促效劑
H4H16679P2	5	2058	8	2223	促效劑
H4H18417P2	1	1835	2	2604	增強劑
H4H18438P2	2	1486	3	2414	增強劑
H4H18445P2	2	2016	3	2488	增強劑
H4H18449P2	5	3374	9	3113	增強劑
H4H18482P2	1	1966	3	2704	增強劑
H4H18487P2	1	2422	3	2670	增強劑
H4H18492P2	3	2603	7	4184	增強劑
比較抗體	6	2349	3	112	N/A
同型對照抗體	1	6	2	4	N/A
單獨二級抗體	1	3	2	3	N/A
未染色	1	1	1	1	N/A

*抗體分類為「促效劑」或「增強劑」係以在文中實例 7 和 8 所觀察到的結果部份為基礎。

表 12: 70 nM 抗 -LEPR 抗體與 HEK293/hLEPR-GPI 、 HEK293/Stat3-hLEPR-FL 和 HEK293/Stat3-luc 親代細胞之結合

	結合比： 正常化至各細胞位染色樣本			抗體類型
抗體	HEK293/ Stat3-luc	HEK293/ hLEPR-GPI	HEK293/Stat3- luc hLEPR-FL	
H4H16650P2	6	707	42	促效劑
H4H16679P2	8	1078	51	促效劑
H4H17319P2	7	1131	47	促效劑
H4H17321P2	7	1126	46	促效劑
同型對照抗體	2	2	2	
單獨二級抗體	1	1	1	
未染色	1	1	1	

實例 7.在有或無瘦素的存在下，本發明抗-LEPR 抗體活化 LEPR 訊號傳遞

【0141】 開發一生物分析，使用一報導子細胞株偵測經由 LEPR 活化之 STAT3 轉錄活化，其中該報導子細胞株係在一 IMR-32 細胞株(人類神經瘤細胞株)中穩定表現全長人類 LEPR(hLEPR；登錄號 NP_002294.2 之胺基酸 1 至 1165)與一螢光酶報導子(STAT3-Luc；Qiagen, # CLS-6028L)。將所產生稱為 IMR-32/STAT3-Luc/hLEPR 的穩定細胞分離並維養在補充 10% FBS、NEAA、1ug/mL 嘌呤黴素(Puromycin)、100ug/mL 的潮黴素 B(Hygromycin B)和青黴素/鏈黴素/L-麩醯胺酸之 MEM-Earl 培養基中(完全培養基)。

【0142】 所生成的生物分析係用於測量在有或無瘦素的存在下本發明抗-LEPR 抗體對 LEPR 訊號傳遞的效應。就此生物分析，係將 IMR-32/STAT3-Luc/hLEPR 細胞以 96 孔模式 20,000 個細胞/100ul/孔接種於完全培養基中，並在隔天以適量補充 1% BSA 和 0.1% FBS(分析緩衝液)的 Opti-MEM 培養基置換歷時 30 分鐘。就測量本發明抗體在無瘦素下之效應，係將抗-LEPR 抗體或同型對照抗體及人類瘦素(hLeptin；R&D Systems, #398-LP)以分析緩衝液進行半對數連續稀釋至 100 nM 至 300 fM 的最終濃度範圍，將其加到細胞中及隨後於 37°C 在 5% CO2 中培養至隔

夜。

【0143】 就測量本發明抗體在瘦素存在下之效應，係將 200pM 溶於分析緩衝液之固定濃度的人類瘦素加到細胞中，接著立即加入經半對數連續稀釋至 100 nM 至 300 fM 最終濃度範圍的抗-LEPR 抗體或同型對照抗體。然後將樣本於 37°C 在 5% CO₂ 中培養至隔夜。然後將 OneGlo 試劑 (Promega, # E6051) 加入樣本中並於 Envision 多標記盤式判讀儀上 (Perkin Elmer) 以冷光模式測量螢光酶活性。得到相對光單位 (RLU) 值並使用非線性迴歸以 GraphPad Prism 軟體 (GraphPad) 分析結果。由 hLeptin 劑量反應所得到的最大 RLU 值係定義為 IMR-32/STAT3-Luc/hLEPR 分析中 100% 活化。

【0144】 如表 13 中所示，於研究 1 中，在無 hLeptin 下，所有檢測的抗-LEPR 抗體分別以範圍 134 pM 至 11.9 nM 之 EC₅₀ 值及範圍 5% 至 13% 的最大活化 (其係由 hLeptin 劑量反應得來的最大活化)，展現微弱的 IMR-32/STAT3-Luc/hLEPR 細胞刺激。於研究 2 中，在無 hLeptin 的下，4 種檢測的抗-LEPR 抗體，有關由 hLeptin 劑量反應得來的最大活化，係以範圍 61.9 pM 至 206.9 pM 之 EC₅₀ 值及範圍 65% 至 68% 的最大活化，展現 IMR-32/STAT3-Luc/hLEPR 細胞刺激。於研究 1 中，在 200 pM 的 hLeptin 存在下，所有檢測的抗-LEPR 抗體分別以範圍 20.2 pM 至 523 pM 之 EC₅₀ 值及範圍 66% 至 107% 的最大活化 (其係由 hLeptin 劑量反應得來的最大活化)，展現 IMR-32/STAT3-Luc/hLEPR 細胞刺激。因為這些抗體增進了瘦素引發的 LEPR 訊號傳遞，所以如文中所定義，將這些抗體歸類為「增強劑」。於研究 2 中，在 200 pM 的 hLeptin 存在下，4 種檢測的抗-LEPR 抗體以範圍 51.9 pM 至 257.3 pM 之 EC₅₀ 值及範圍 76% 至 88% 的最大活化 (其係由 hLeptin 劑量反應得來的最大活化)，展現

IMR-32/STAT3-Luc/hLEPR 細胞刺激。LEPR 訊號傳遞在瘦素存在下並未絲毫受到這些抗體增強。同型對照抗體在任意的分析中並未展現任何可測量的 IMR-32/STAT3-Luc/hLEPR 細胞刺激。

表 13:以抗-LEPR 抗體活化 hLEPR

抗體	IMR-32/LEPR 無人類瘦素		IMR-32/LEPR 含 200pM 人類瘦素	
	EC ₅₀ (M)	活化%	EC ₅₀ (M)	活化%
研究 1				
H4H18445P2	1.19E-08	5	4.10E-10	97
H4H18446P2	3.73E-10	6	3.42E-11	68
H4H18449P2	2.12E-10	13	5.23E-11	66
H4H18438P2	1.49E-09	5	2.02E-11	76
H4H18482P2	2.69E-10	7	1.69E-10	94
H4H18487P2	8.01E-10	6	4.10E-10	107
H4H18492P2	1.34E-10	5	2.74E-11	94
H4H18417P2	1.53E-10	5	5.23E-10	87
研究 2				
H4H16650P2	6.19E-11	68	5.19E-11	88
H4H16679P2	8.62E-11	65	7.37E-11	88
H4H17319P2	1.867E-10	68	1.914E-10	76
H4H17321P2	2.069E-10	66	2.573E-10	76

實例 8.本發明抗-LEPR 抗體在表現訊號傳遞-缺乏或訊號傳遞-損傷之 LEPR 突變型的細胞中活化訊號傳遞

【0145】 LEPR 突變型經鑑定其係展現缺乏或損傷的瘦素-媒介訊號傳遞且係與早發的肥胖症有關。例如 LEPR-A409E 為一種訊號傳遞缺乏的突變 LEPR 蛋白，其不會轉換瘦素訊號至 STAT3；A409E 突變型原先經鑑定為早發性肥胖症之單成因(Farooqi 等人, 2007, *N Engl J Med* 356(3): 237-247)。LEPR-P316T 為訊號傳遞損傷的突變 LEPR 蛋白，其已顯示係與早發性肥胖症有關(Mazen 等人, 2011, *Mol Genet Metab* 102:461-464)。

【0146】 在此實例中，係評估本發明抗-LEPR 抗體在表現訊號傳遞-缺乏或訊號傳遞-損傷 LEPR 突變型之細胞中刺激 LEPR 訊號傳遞之能力。

特言之，係建構表現野生型 LEPR、LEPR-A409E(訊號傳遞-缺乏)或 LEPR-P316T(或訊號傳遞-損傷)之報導子細胞株(HEK293)。僅以媒劑、重組的人類瘦素、對照 IgG 或本發明之促效劑抗-LEPR 抗體(H4H16650 或 H4H16679)處理細胞，並測定 LEPR 訊號傳遞之程度(如以之西方墨點偵測 pSTAT3-Y705 表現相對於 STAT3 表現所測量)。

【0147】 本發明之促效劑抗-LEPR 抗體(H4H16650 和 H4H16679)在這些實驗中顯示於表現 LEPR-A409E 突變型或 LEPR-P316T 突變型之細胞中以劑量依賴的方式刺激 LEPR 訊號傳遞(如測量 STAT3¹ 表現)(圖 2 之 B 和 C 圖)。相反的，瘦素處理在表現 LEPR-P316T 突變型之細胞中僅引發中度的訊號傳遞，而在表現 LEPR-A409E 突變型之細胞中則無訊號傳遞(圖 2 之 A 圖)。再者，在任何經媒劑或 IgG 對照抗體處理的細胞株中並無偵測到 LEPR 訊號傳遞(數據未顯示)。將其他訊號傳遞-缺乏或訊號傳遞-損傷的 LEPR 突變型以此分析進行檢測，但並未被抗-LEPR 突變型所活化(數據未顯示)，其表示此救援效應可能為突變型-依賴的。

【0148】 此實例的結果指出，本發明之促效劑抗-LEPR 抗體可用於治療由特定訊號傳遞-缺乏或訊號傳遞-損傷的 LEPR 突變型(例如 LEPR-P316T 或 LEPR-A409E)所造成或與其相關的疾病和病症(例如早發性肥胖症)。

實例 9:不同抗-LEPR 單株抗體間之 Octet 交叉競爭

【0149】 使用即時、無標定生物膜干涉術分析於 Octet HTX 生物感測器平台(Pall ForteBio Corp.)上偵測一組不同的抗-LEPR 單株抗體間之結合競爭。整個實驗係在 25°C 於含有 10 mM HEPES，150mM NaCl，3mM EDTA 和 0.05% v/v 界面活性劑 Tween-20，1mg/mL BSA，pH7.4 (HBS-EBT)之緩衝液中，在以 1000 rpm 之速度震盪測定盤下所進行。為了評估二種

抗體是否能彼此競爭與帶有 C-端 myc-myc-六組胺酸標籤表現的重組人類 LEPR(hLEPR.mmh；SEQ ID NO: 114)上各別的表位結合，係藉由將生物感測器尖端浸入含有 20µg/mL 的 hLEPR-MMH 之孔槽中 5 分鐘，將約 0.25 nm 或 0.34 nm 的 hLEPR-MMH 先捕捉至塗覆抗-五-His 抗體的 Octet 感測器尖端(Fortebio Inc, # 18-5122)。然後將捕捉抗原的生物感測器尖端以第一抗 LEPR-單株抗體(後續稱為 mAb-1)藉由浸入含 50 µg/mL 的 mAb-1 溶液之孔槽中 210 秒，使其飽和。然後隨後將生物感測器尖端浸入含 50 µg/mL 第二抗-LEPR 單株抗體(後續稱為 mAb-2)溶液之孔槽中 150 秒。將生物感測器尖端在實驗的每個步驟之間以 HBS-EBT 緩衝液清洗。於實驗過程期間監測即時結合反應，及在每個步驟結束時記錄結合反應。比較 mAb-2 與 hLEPR-MMH 和 mAb-1 預複合物結合的反應並測定不同株的抗-LEPR 抗體之競爭/非競爭行為，其係如表 14 和表 15 所示。

表 14:抗-LEPR 單株抗體間的交叉競爭

第一抗體(mAb-1)與捕捉的 hLEPR-MMH 結合	顯示與 mAb-1 競爭的第二抗體 (mAb-2)
H4H18492P2	H4H18417P2
	H4H18438P2
H4H18417P2	H4H18492P2
	H4H18438P2
H4H18438P2	H4H18492P2
	H4H18417P2
H4H16650P2	H4H16679P2
H4H16679P2	H4H16650P2
H4H18445P2	H4H18482P2
	H4H18487P2
	H4H18446P2
H4H18446P2	H4H18482P2
	H4H18487P2

第一抗體(mAb-1)與捕捉的 hLEPR-MMH 結合	顯示與 mAb-1 競爭的第二抗體 (mAb-2)
	H4H18445P2
H4H18482P2	H4H18445P2
	H4H18487P2
H4H18487P2	H4H18445P2
	H4H18482P2
H4H18449P2	無
比較抗體	無

表 15:抗-LEPR 單株抗體間的交叉競爭

mAb-1	與 mAb-1 競爭的 mAb-2
H4H17319P2	H4H17321P2
	H4H16650P2
	H4H16679P2
H4H17321P2	H4H17319P2
	H4H16650P2
	H4H16679P2
H4H16650P2	H4H17319P2
	H4H17321P2
	H4H16679P2
H4H16679P2	H4H17319P2
	H4H17321P2
	H4H16650P2

實例 10:在可誘發的瘦素缺乏之小鼠模型中 LEPR 促效劑抗體 H4H16650P2、H4H16679P2、H4H17319P2 和 H4H17321P2 之活體內效力

【0150】 以一可誘發的瘦素缺乏模型於基因工程 *LEPR^{Hu/Hu}* 小鼠中，測定四種本發明之專一性促效劑抗-LEPR 抗體 H4H16650P2、H4H16679P2、H4H17319P2 和 H4H17321P2 對食物攝取、體重和肥胖的效應，其中該小鼠係表現一瘦素受體，其係由人類 LEPR 外膜區域序列取代鼠科 LEPR 外

膜區域序列所組成。瘦素缺乏之模型係由編碼一 hFc-標記小鼠 LEPR 外膜區域之水動力 DNA 遞送(HDD)的質體(文中稱為 mLEPR.hFc 或「瘦素陷阱(trap)」；SEQ ID NO: 120)所誘發。當表現時，此瘦素陷阱分泌並與循環的瘦素結合。在 50 μ g 編碼此瘦素陷阱的 DNA 結構經 HDD 後，小鼠展現食物消耗增加及肥胖和體重增加。

【0151】 基線每日的食物攝取係在投予瘦素陷阱前 7 至 4 天之間測量(第-7 和-4 天)。在第 0 天，將 35 隻 13-至 17-週大的雄性 *LEPR^{Hu/Hu}* 小鼠成功地進行瘦素陷阱之 HDD。在 HDD 後 6 和 13 天，收集眼眶血液並以 μ CT 定量身體組成包括脂肪。在 HDD 後 7 天，以與 0 天相比的體重變化百分比為基準，將小鼠隨機分配成 5 組每組 7 隻小鼠。各組係經由皮下注射接受單一劑量 3 mg/kg 的同型對照抗體、3 mg/kg 的 H4H16650P2、3 mg/kg 的 H4H16679P2、3 mg/kg 的 H4H17319P2，或 3 mg/kg 的 H4H17321。同型對照抗體不會與任何已知的小鼠蛋白結合。在研究期間對每一隻動物測量食物攝取和體重。圖 3 係彙整各治療組之平均每日食物攝取。在圖 3 中，虛線係代表在 HDD 注射之前的平均基線食物攝取。在個時間點計算每隻動物與第 0 天相比的體重變化百分比。圖 4 係彙整各抗體治療組中動物之平均體重變化百分比。圖 5 係彙整以 μ CT 所定量在抗體治療前 1 天和抗體治療後 6 天，各抗體治療組中動物之平均脂肪重量。所有的結果係以平均 $\pm$ SEM 表示。

【0152】 如圖 3 和 4 中所示，在以瘦素陷阱 HDD 後，在抗體治療前於各組小鼠中觀察到類似的食物攝取和體重變化百分比增加。如圖 3 中所示，經 3 mg/kg 抗體 H4H16650P2 或 H4H16679P2 治療的小鼠，在抗體治療後 1 天(HDD 後 8 天)及在後續的測量時間點，相較於注射同型對照抗體的小鼠，展現食物攝取顯著的下降。經 3 mg/kg 抗體 H4H17319P2 或

H4H17321P2 治療的小鼠，在抗體治療後 2 天(HDD 後 9 天)及在其他後續的測量時間點，相較於注射同型對照抗體的小鼠，展現食物攝取顯著的下
降。如圖 4 中所示，經 3 mg/kg 抗體 H4H16650P2 治療的小鼠，在抗體治
療後 1 天(HDD 後 8 天)及在後續的測量時間點，相較於注射同型對照抗體
的小鼠，展現體重變化百分比顯著的下降。在抗體治療後 1 天，第 8 天，
經同型對照治療的小鼠與第 0 天相比顯現 $21.16 \pm 1.27\%$ 的體重增加，而經
H4H16650P2 治療的小鼠與第 0 天相比具有 $15.57 \pm 0.9\%$ 的體重增加。經 3
mg/kg 抗體 H4H16679P2、H4H17319P2 或 H4H17321P2 治療的小鼠，在
抗體治療後 2 天(HDD 後 9 天)及在其他後續的測量時間點，相較於注射同
型對照抗體的小鼠，展現體重變化百分比顯著的下降。在第 9 天，就經同
型對照、H4H16650P2、H4H16679P2、H4H17319P2 或 H4H17321P2 治療
的小鼠，與第 0 天相比體重變化百分比分別為 23.18 ± 1.22 、 13.17 ± 1.05 、
 12.95 ± 1.26 、 15.98 ± 1.78 和 15.83 ± 2.01 。如圖 5 中所示，經 3 mg/kg 同型
對照抗體治療的小鼠，在抗體治療後 6 天(HDD 後 13 天)，相較於抗體治
療前 1 天(HDD 後 6 天)，展現脂肪重量顯著增加。經 3 mg/kg 抗體
H4H16650P2、H4H16679P2、H4H17319P2 或 H4H17321P2 治療的小鼠在
抗體治療後，相較於抗體治療前，脂肪重量並未增加。治療後 6 天(HDD
後 13 天)，經 3 mg/kg 抗體 H4H16650P2、H4H16679P2 或 H4H17319P2
治療的小鼠在抗體治療後，相較於經 3 mg/kg 同型對照抗體治療的小鼠，
展現脂肪重量顯著下降。

實例 11:藉由氫氙交換之結合人類瘦素受體(hLEPR.mmh)的 H4H16650P2 之表位定序

【0153】 進行實驗用以測定與 H4H16650P2 交互作用之 hLEPR.mmh
的胺基酸殘基(SEQ ID NO: 114之胺基酸M1-D839)。就此目的，係以質譜進

行H/D交換表位定序。A general description of the H/D交換法之一般說明係列於，例如Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267(2):252-259；以及Engen and Smith (2001) *Anal. Chem.* 73:256A-265A中。

【0154】 實驗程序。HDX-MS 實驗係於整合的 Waters HDX/MS 平台上進行，其係由用於氘標定之 Leaptac HDX PAL 系統、用於樣本分解和承載之 Waters Acquity M-Class (附屬的溶劑管理器)，用於分析管柱梯度之 Waters Acquity M-Class (μ Binary 溶劑管理器)以及用於胃酶胜肽質量測量之 Synapt G2-Si 質譜所組成。

【0155】 標定溶液係於 10 mM PBS 緩衝液中以 D₂O 於 pD 7.0(相當於 pH 6.6)所製備。就氘標定，係將抗體以 2:1 莫耳比預混合之 3.8 μ L 的 hLEPR.mmh (8 pmol/ μ L)或 hLEPR.mmh 就不同的時間點以 56.2 μ L D₂O 標定溶液培養(例如未氘化對照組= 0 秒，標定 1 min 和 20 min)。藉由將 50 μ L 樣本轉置於 50 μ L 預冷過之淬熄緩衝液(0.2 M TCEP，6 M 氯化胍溶於 100 mM 磷酸緩衝液，pH 2.5)讓氘化停止反應並將混合的樣本於 1.0°C 培養 2 分鐘。然後將停止反應的樣本注射至 Waters HDX Manager 中進行線上胃蛋白酶/蛋白酶 XIII 分解。將分解的胜肽於 0°C 捕陷至 ACQUITY UPLC BEH C18 1.7- μ m, 2.1 $\times$ 5 mm VanGuard 預管柱上並溶離至分析管柱 ACQUITY UPLC BEH C18 1.7- μ m, 1.0 $\times$ 50 mm 進行 9-分鐘 5%-40% B (移動相 A: 0.1%甲酸水溶液，移動相 B: 0.1%甲酸之乙腈溶液)的梯度分離。質譜係設定在 37 V 之進樣錐電壓，0.5 秒的掃描時間及 50-1700 Th 質量/電荷範圍。

【0156】 就鑑定人類 LEPR 之胜肽，係處理來自未氘化樣本的 LC-MSE 數據並經由 Waters ProteinLynx Global Server (PLGS)軟體搜尋包括人類 LEPR、胃蛋白酶，及其隨機化序列之資料庫。將鑑定出的胜肽輸

入 DynamX 軟體並以下列二項標準過濾：1)以胺基酸計之最小產物：0.2，及 2)複製檔案閥值：3。然後 DynamX 軟體，以滯留時間和高質量精準性 (<10ppm)為基準，在各時間點以 3 重複跨過多個時間點自動測定各胜肽之氬吸收。

【0157】 結果：使用線上胃蛋白酶/蛋白酶 XIII 管柱結合 MS^E 數據擷取，在有或無抗體的存在下總計可重複鑑定出 201 種來自人類 LEPR 的胜肽，代表 70%序列覆蓋率。如表 16 中所示，當與 H4H16650P2 結合時，五種胜肽顯著地降低氬化吸收(質心 δ 值> 0.4 道爾頓，p-值< 0.05)。所記錄的胜肽質量係相當來自三重複之質心 MH⁺的平均值。這些相當於胺基酸 162-169 (人類 LEPR 之胺基酸 LYVLPEVL；SEQ ID NO: 113)和胺基酸 170-181(人類 LEPR 之胺基酸 EDSPLVPQKGSF；SEQ ID NO: 113)之胜肽，當與 H4H16650P2 結合時，具有較慢的氬化速率。如 Uniprot entry P48357 所定義，這些鑑定出的殘基亦相當於人類 LEPR 之胺基酸 162-169 和 170-181 (SEQ ID NO. 113；人類瘦素受體)。

表 16:在與抗體 H4H16650P2 結合後，具有顯著保護之人類瘦素受體胜肽

殘基	1 min 氬化			20 min 氬化		
	hLEPR.m mh	hLEPR.mm h+H4H1665 0P2	Δ	hLEPR.m mh+H4H1 6650P2	Δ	
162- 169	949.03±0.03	947.99±0.02	-1.04	949.23±0.02	948.16±0.02	-1.03
163- 169	835.82±0.03	834.79±0.02	-1.03	836.03±0.02	834.94±0.02	-1.08
170- 181	1310.02±0.05	1309.12±0.03	-0.89	1309.77±0.02	1309.38±0.02	-0.39

實例 12:人源化 LEPR 小鼠中 LEPR 增強劑抗體之活體內效用試驗

【0158】 於孤養的基因工程 *LEPR^{Hu/Hu}* 小鼠中測定三種本發明之專一性增強劑抗-LEPR 抗體 H4H18482P2、H4H18487P2 和 H4H18492P2 對

體重和肥胖之效應，其中該小鼠係表現一瘦素受體，其係由人類 LEPR 外膜區域序列取代鼠科 LEPR 外膜區域序列所組成(mLEPR.hFc, SEQ ID NO: 120)。

【0159】 在第-19 天，以 CT 定量身體組成包括脂肪。在第 0 天，以體重為基準，將 48 隻 14 至 16-週大的雌性 *LEPR^{Hu/Hu}* 小鼠隨機分配成 4 組每組 12 隻小鼠。在第 0 和 11 天，各組小鼠係經由皮下注射接受單一劑量 30 mg/kg 的同型對照抗體(REGN1945)，30 mg/kg 的 H4H18482P2，30 mg/kg 的 H4H18487P2 或 30 mg/kg 的 H4H18492P2。同型對照抗體不會與任何已知的小鼠蛋白結合。在研究期間對每一隻動物測量體重。在各時間就各個動物計算與 0 天相比之體重變化百分比。圖 6 係彙整各治療組動物之平均體重變化百分比。圖 6 係彙整以 CT 所定量在抗體治療前 19 天和抗體治療後 11 天，各抗體治療組動物之平均脂肪重量。所有的結果係以平均± SEM 表示。

【0160】 如圖 6 中所示，在以 LEPR 增強劑抗體給劑後，觀察到體重變化百分比下降，但同型對照抗體則無。如圖 6 中所示，經 30 mg/kg 的 H4H18482P2 治療的小鼠，在治療後 2 天(第 2 天)開始及在其他時間點，相較於注射同型對照抗體的小鼠，展現體重變化百分比顯著下降。經 30 mg/kg 的 H4H18487P2 治療之小鼠，在第 2 天開始及在其他時間點，相較於注射同型對照抗體之小鼠，展現體重變化百分比顯著下降。經 30 mg/kg 的 H4H18492P2 治療之小鼠，在第 4、5 和 17，相較於注射同型對照抗體之小鼠，展現體重變化百分比顯著下降，但其他時間點則無。經 30 mg/kg 的 H4H18482P2 治療之小鼠，從第 6 天開始及在後續天數，相較於注射 H4H18492P2 的小鼠，展現體重變化百分比顯著下降，但在第 7、14 和 17 天則無。經 30 mg/kg 的 H4H18487P2 治療的小鼠，從第 3 天開始及在其

他時間點，相較於注射 H4H18492P2 的小鼠，展現體重變化百分比顯著下降，但在第 4 和 5 天則無。

【0161】 如圖 7A 中所示，在治療前，組間的脂肪重量並無不同(第 -19 天)。如圖 7B 中所示，經 30 mg/kg 的抗體 H4H18482 和 H4H18487 治療之小鼠，在治療後 17 天(第 12 天)，相較於同型對照抗體，展現統計上顯著的脂肪重量下降，但抗體 H4H18492 則無。

【0162】 本發明範圍並未限制在文中所述的特定實施例。實際上，除了文中所述之外，從前述說明及伴隨圖式，本發明之各種修改對於熟習本項技術者將變得顯而易見。此等修改希望係落在所附的申請專利範圍之內。

【符號說明】

無

【生物材料寄存】

國內寄存資訊【請依寄存機構、日期、號碼順序註記】

無

國外寄存資訊【請依寄存國家、機構、日期、號碼順序註記】

無

【序列表】(請換頁單獨記載)

申請專利範圍

1. 一種醫藥組成物，其包含結合至人類瘦素受體（LEPR）且活化 LEPR 訊號傳遞的抗體或其抗原結合片段，以及醫藥上可接受之載劑或稀釋劑，用於用來治療與瘦素缺乏或瘦素阻抗相關聯或由其所引起之疾病或病症的方法中，其中該方法包含將該醫藥組成物投與有需要的個體，且其中該抗體或其抗原結合片段包含：

含有包括 SEQ ID NO：10 所示胺基酸序列的輕鏈可變區之互補決定區（CDR）的輕鏈可變區；以及

含有包括 SEQ ID NO：2、SEQ ID NO：26 或 SEQ ID NO：34 所示胺基酸序列的重鏈可變區之 CDR 的重鏈可變區。

2. 如請求項 1 之醫藥組成物，其中該抗體或抗原結合片段包含：

含有下列之重鏈可變區：

包括 SEQ ID NO：4 所示胺基酸序列的 HCDR1，

包括 SEQ ID NO：6 所示胺基酸序列的 HCDR2，及

包括 SEQ ID NO：8 所示胺基酸序列的 HCDR3，

以及

含有下列之輕鏈可變區：

包括 SEQ ID NO：12 所示胺基酸序列的 LCDR1，

包括 SEQ ID NO：14 所示胺基酸序列的 LCDR2，及

包括 SEQ ID NO：16 所示胺基酸序列的 LCDR3。

3. 如請求項 1 之醫藥組成物，其中該抗體或抗原結合片段包含：

含有下列之重鏈可變區：

包括 SEQ ID NO：36 所示胺基酸序列的 HCDR1，
 包括 SEQ ID NO：38 所示胺基酸序列的 HCDR2，及
 包括 SEQ ID NO：40 所示胺基酸序列的 HCDR3，
 以及

含有下列之輕鏈可變區：

包括 SEQ ID NO：12 所示胺基酸序列的 LCDR1，
 包括 SEQ ID NO：14 所示胺基酸序列的 LCDR2，及
 包括 SEQ ID NO：16 所示胺基酸序列的 LCDR3。

4. 如請求項 1 之醫藥組成物，其中該抗體或抗原結合片段包含：

含有下列之重鏈可變區：

包括 SEQ ID NO：28 所示胺基酸序列的 HCDR1，
 包括 SEQ ID NO：30 所示胺基酸序列的 HCDR2，及
 包括 SEQ ID NO：32 所示胺基酸序列的 HCDR3，
 以及

含有下列之輕鏈可變區：

包括 SEQ ID NO：12 所示胺基酸序列的 LCDR1，
 包括 SEQ ID NO：14 所示胺基酸序列的 LCDR2，及
 包括 SEQ ID NO：16 所示胺基酸序列的 LCDR3。

5. 如請求項 2 之醫藥組成物，其中該抗體或抗原結合片段包含包括 SEQ ID NO：10 所示胺基酸序列的輕鏈可變區；

以及包括 SEQ ID NO：2 所示胺基酸序列的重鏈可變區。

6. 如請求項 5 之醫藥組成物，其中該抗體或抗原結合片段係為抗體。
7. 如請求項 6 之醫藥組成物，其中該抗體或抗原結合片段包含：
與人類 IgG1 重鏈恆定區連接的重鏈可變區；以及
與人類 κ 輕鏈恆定區連接的輕鏈可變區。
8. 如請求項 6 之醫藥組成物，其中該抗體或抗原結合片段包含：
與人類 IgG4 重鏈恆定區連接的重鏈可變區；以及
與人類 κ 輕鏈恆定區連接的輕鏈可變區。
9. 如請求項 3 之醫藥組成物，其中該抗體或抗原結合片段包含
包括 SEQ ID NO：10 所示胺基酸序列的輕鏈可變區；
以及
包括 SEQ ID NO：34 所示胺基酸序列的重鏈可變區。
10. 如請求項 9 之醫藥組成物，其中該抗體或抗原結合片段係為抗體。
11. 如請求項 10 之醫藥組成物，其中該抗體或抗原結合片段包含：
與人類 IgG1 重鏈恆定區連接的重鏈可變區；以及
與人類 κ 輕鏈恆定區連接的輕鏈可變區。
12. 如請求項 10 之醫藥組成物，其中該抗體或抗原結合片段包含：
與人類 IgG4 重鏈恆定區連接的重鏈可變區；以及

與人類 κ 輕鏈恆定區連接的輕鏈可變區。

13. 如請求項 4 之醫藥組成物，其中該抗體或抗原結合片段包含
包括 SEQ ID NO：10 所示胺基酸序列的輕鏈可變區；
以及
包括 SEQ ID NO：26 所示胺基酸序列的重鏈可變區。
14. 如請求項 13 之醫藥組成物，其中該抗體或抗原結合片段係為抗體。
15. 如請求項 14 之醫藥組成物，其中該抗體或抗原結合片段包含：
與人類 IgG1 重鏈恆定區連接的重鏈可變區；以及
與人類 κ 輕鏈恆定區連接的輕鏈可變區。
16. 如請求項 14 之醫藥組成物，其中該抗體或抗原結合片段包含：
與人類 IgG4 重鏈恆定區連接的重鏈可變區；以及
與人類 κ 輕鏈恆定區連接的輕鏈可變區。
17. 如請求項 14 之醫藥組成物，其中該與瘦素缺乏或瘦素阻抗相關聯或由
其所引起之疾病或病症是脂質失養症。
18. 如請求項 14 之醫藥組成物，其中該與瘦素缺乏或瘦素阻抗相關聯或由
其所引起之疾病或病症是全身脂質失養症。

19. 如請求項 14 之醫藥組成物，其中該與瘦素缺乏或瘦素阻抗相關聯或由其所引起之疾病或病症是先天性全身脂質失養症。
20. 如請求項 14 之醫藥組成物，其中該與瘦素缺乏或瘦素阻抗相關聯或由其所引起之疾病或病症是後天性全身脂質失養症。
21. 如請求項 17 之醫藥組成物，其係經調配為皮下遞送。
22. 如請求項 18 之醫藥組成物，其係經調配為皮下遞送。
23. 如請求項 19 之醫藥組成物，其係經調配為皮下遞送。
24. 如請求項 20 之醫藥組成物，其係經調配為皮下遞送。
25. 如請求項 14 之醫藥組成物，其中該與瘦素缺乏或瘦素阻抗相關聯或由其所引起之疾病或病症是選自於以下所組成之群組：飲食引發的食物渴望、功能性下視丘閉經、矮妖精貌症候群（Leprechaunism/Donohue syndrome），以及 Rabson-Mendenhall 症候群。
26. 如請求項 14 之醫藥組成物，其中該與瘦素缺乏或瘦素阻抗相關聯或由其所引起之疾病或病症是第 I 型糖尿病。
27. 如請求項 14 之醫藥組成物，其中該與瘦素缺乏或瘦素阻抗相關聯或由其所引起之疾病或病症是第 II 型糖尿病。

28. 如請求項 14 之醫藥組成物，其中該與瘦素缺乏或瘦素阻抗相關聯或由其所引起之疾病或病症是胰島素阻抗。
29. 如請求項 14 之醫藥組成物，其中該與瘦素缺乏或瘦素阻抗相關聯或由其所引起之疾病或病症是因胰島素受體突變所造成的嚴重胰島素阻抗。
30. 如請求項 14 之醫藥組成物，其中該與瘦素缺乏或瘦素阻抗相關聯或由其所引起之疾病或病症是肥胖。
31. 如請求項 14 之醫藥組成物，其中該與瘦素缺乏或瘦素阻抗相關聯或由其所引起之疾病或病症是代謝症候群。
32. 如請求項 14 之醫藥組成物，係與第二治療劑組合使用。
33. 如請求項 14 之醫藥組成物，係與第二治療劑組合使用，其中該第二治療劑係選自以下組成之群組：重組的人類瘦素、PCSK9 抑制劑、他汀類、依澤替米貝(ezetimibe)、胰島素、胰島素變體、胰島素分泌促進劑、二甲雙胍(metformin)、磺醯脲、葡萄糖共轉運體 2 (SGLT2)抑制劑、GLP-1 促效劑/類似物、昇糖素(GCG)抑制劑、昇糖素受體(GCGR)抑制劑、類血管生成素蛋白(ANGPTL)抑制劑、芬特明(Phentermine)、奧利司他(Orlistat)、妥品美(Topiramate)、丁氨苯丙酮(Bupropion)、妥品美及芬特明、丁氨苯丙酮及納曲酮(Naltrexone)、丁氨苯丙酮及唑尼

沙胺(Zonisamide)、普蘭林肽(Pramlintide)及美曲普汀(Metrelepin)、氯卡色林(Lorcaserin)、西替利司他(Cetilistat)、特索芬辛(Tesofensine)，以及韋利貝特(Velneperit)。

34. 如請求項 30 之醫藥組成物，其係經調配為皮下遞送。

圖式

阻斷 10 nM hLepR ecto-hFc 與人類瘦素(hLeptin)結合

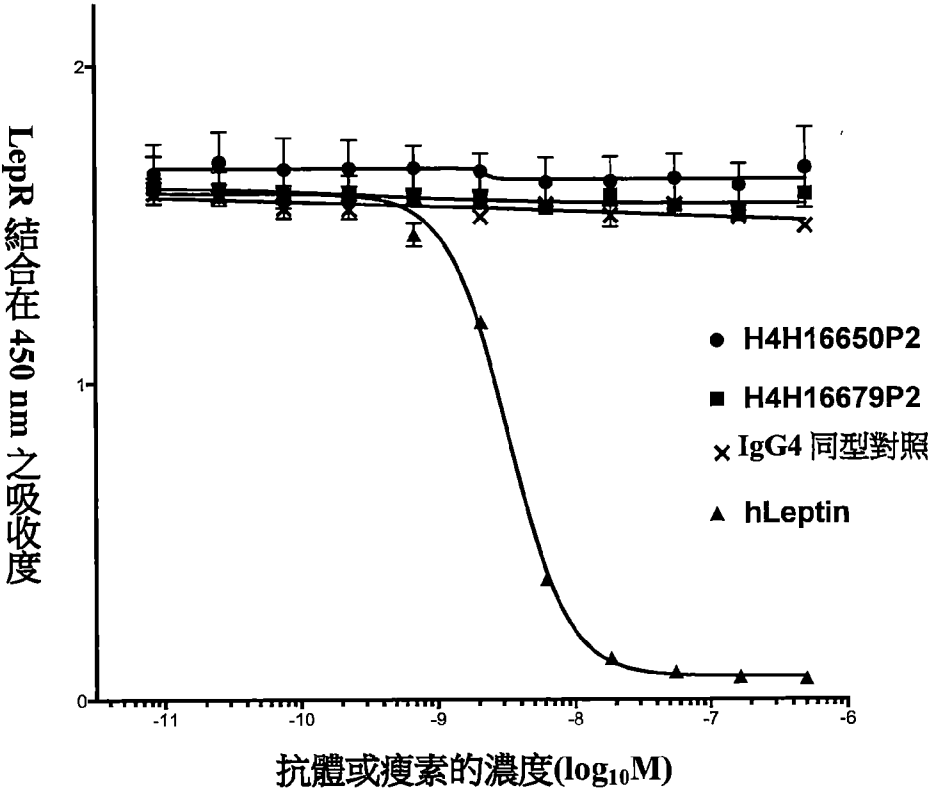
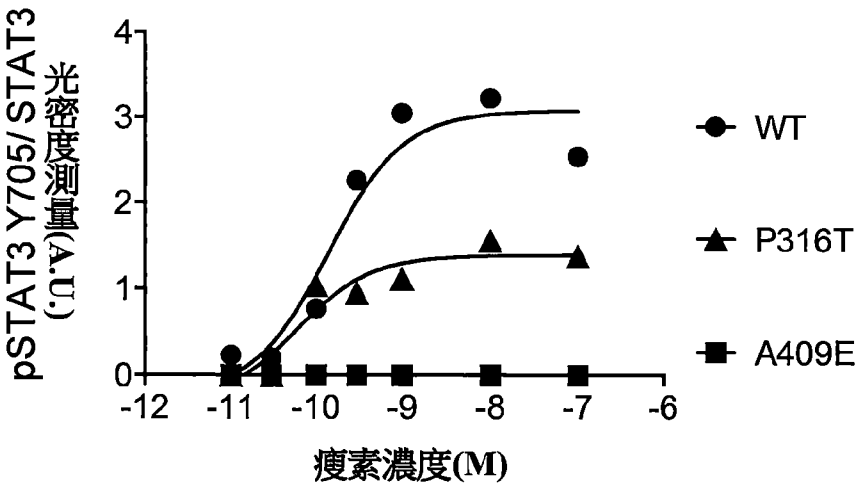
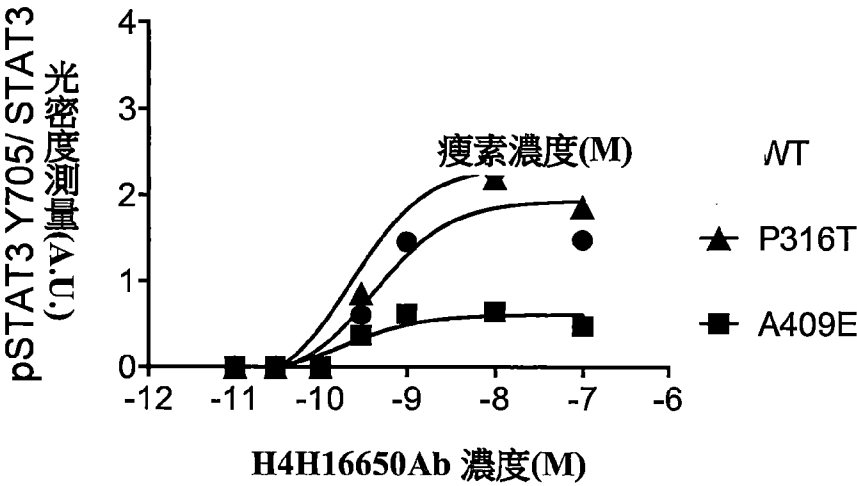


圖 1

A



B



C

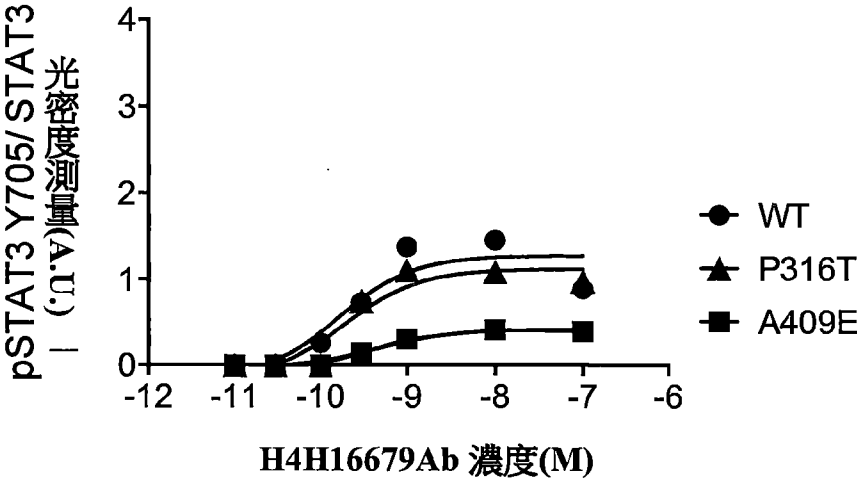


圖 2

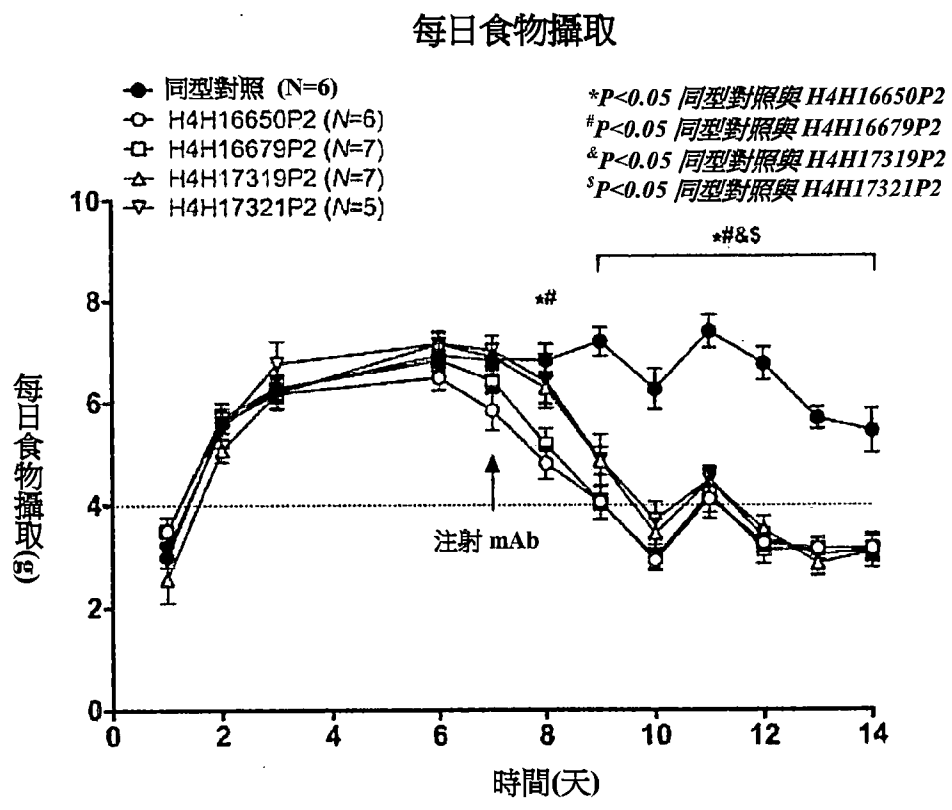


圖 3

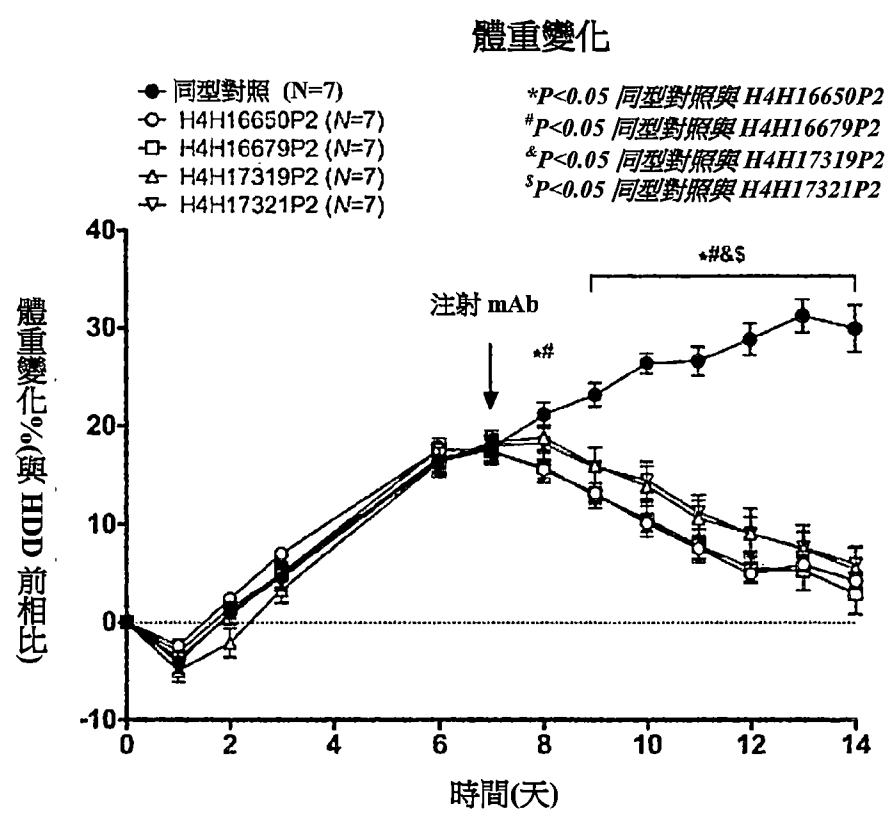


圖 4

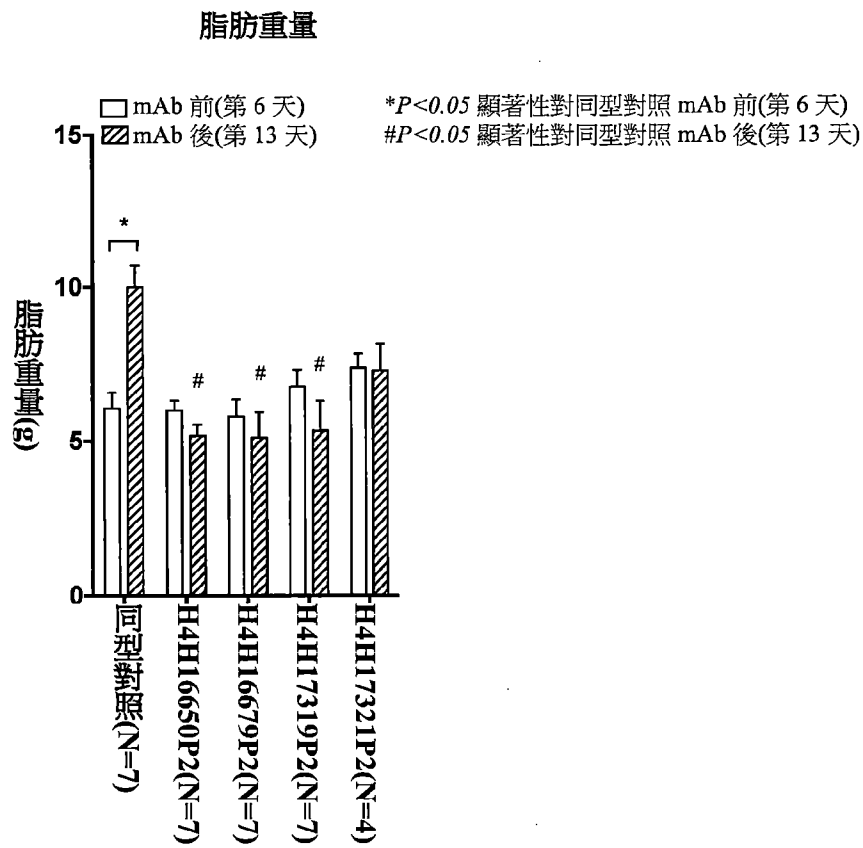
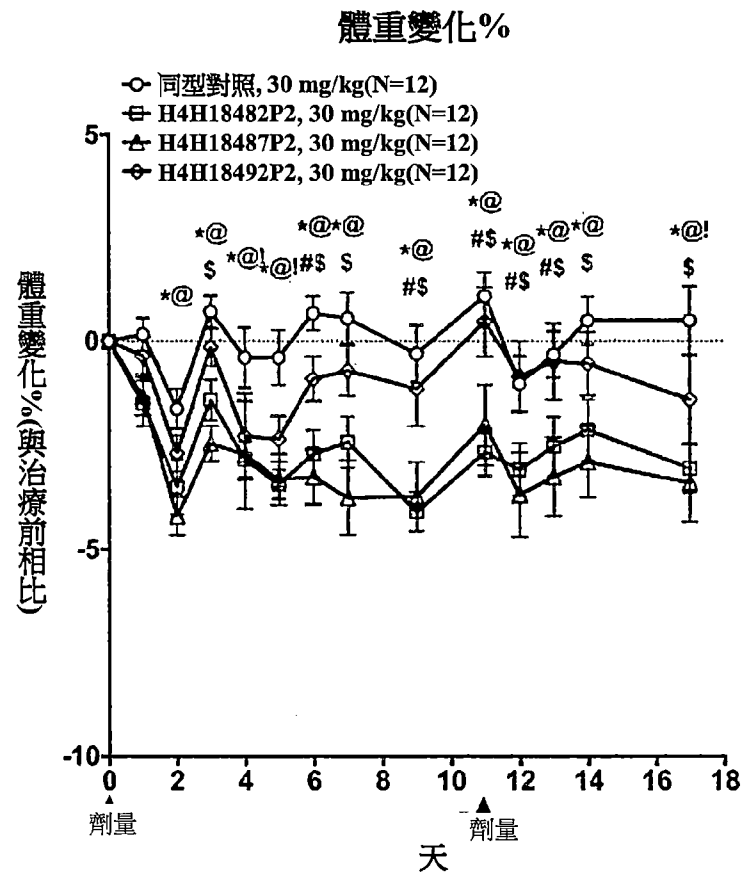


圖 5



* $P < 0.05$ 同型對照與 H4H18482P2
@ $P < 0.05$ 同型對照與 H4H18487P2
! $P < 0.05$ 同型對照與 H4H18492P2
$P < 0.05$ H4H18492P2 與 H4H18482P2
\$ $P < 0.05$ H4H18492P2 與 H4H18487P2

圖 6

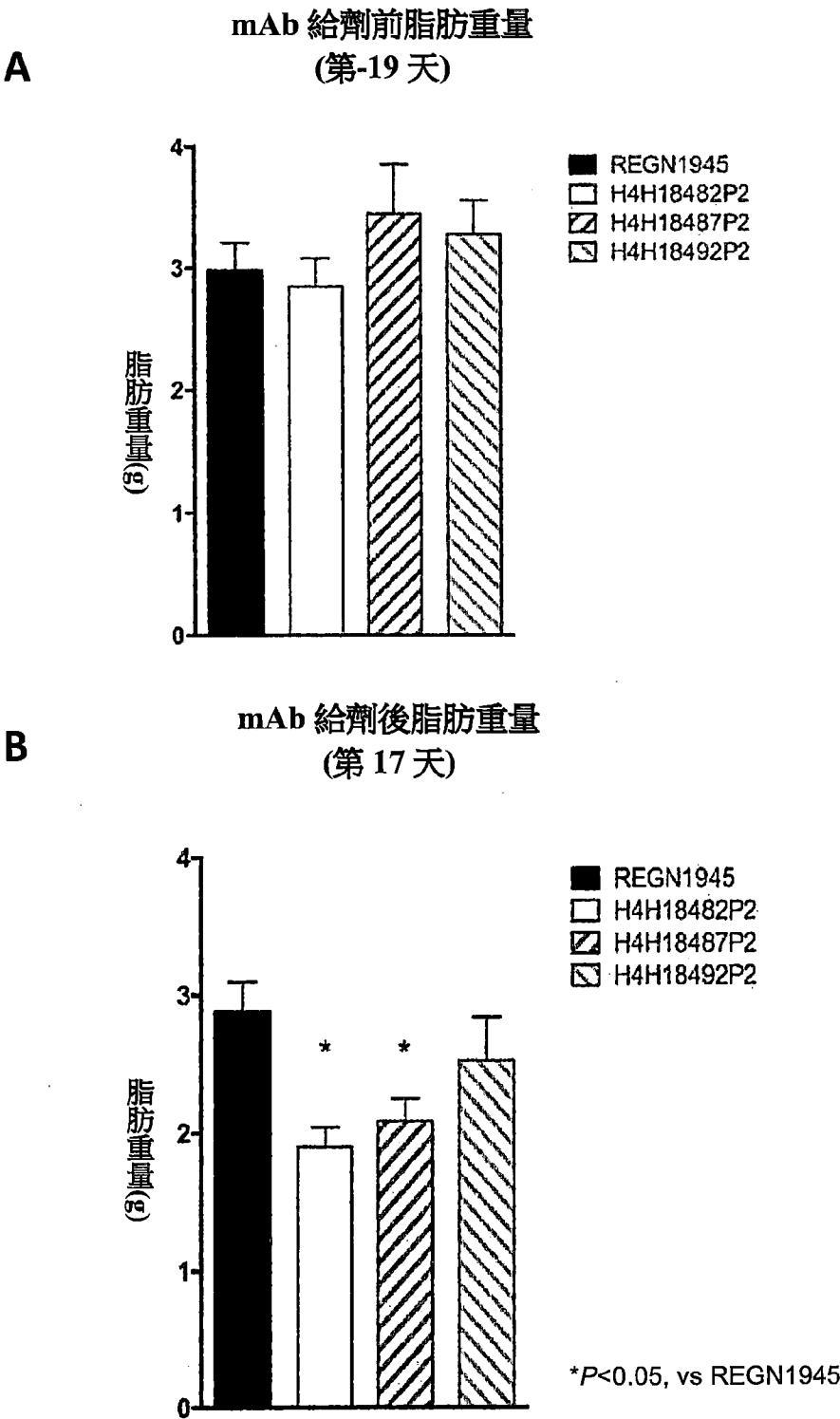


圖 7