

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **038146**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.07.13

(21) Номер заявки
201890712

(22) Дата подачи заявки
2016.09.15

(51) Int. Cl. **C07K 16/22** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА К ПРО-/ЛАТЕНТНОМУ МИОСТАТИНУ И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) **62/219,094**

(32) **2015.09.15**

(33) **US**

(43) **2018.09.28**

(86) **PCT/US2016/052014**

(87) **WO 2017/049011 2017.03.23**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
СКОЛАР РОК, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
**Карвен Грегори Дж., Страуб Мишель,
Донован Адриана, Тёрнер Кэтрин
Джейн (US)**

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

(56) **US-A1-2013209489
WO-A2-2006116269
WO-A2-03027248
WO-A2-2005066204**

**R.C. SMITH ET AL.: "Myostatin
Neutralization Results in Preservation of Muscle
Mass and Strength in Preclinical Models of
Tumor-Induced Muscle Wasting", MOLECULAR
CANCER THERAPEUTICS, vol. 14, no. 7,
1 July 2015 (2015-07-01), pages 1661-1670,
XP055328631, US, ISSN: 1535-7163, DOI:
10.1158/1535-7163.MCT-14-0681, page 1661, right-
hand column, paragraph 2**

WO-A2-2004037861

WO-A2-2014182676

WO-A1-2016098357

WO-A1-2016073853

**ROSAMUND C. SMITH ET AL.: "Myostatin
inhibitors as therapies for muscle wasting associated
with cancer and other disorders", CURRENT
OPINION IN SUPPORTIVE AND PALLIATIVE
CARE, vol. 7, no. 4, 1 November 2013 (2013-11-01),
pages 352-360, XP055254846, ISSN: 1751-4258,
DOI: 10.1097/SPC.0000000000000013, the whole
document**

(57) Изобретение относится к биотехнологии, в частности к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связываются с про-/латентным миостатином, и фармацевтическим композициям на их основе. Изобретение также относится к способу снижения активации рецептора миостатина в клетках, присутствующих в среде, содержащей про-/латентный миостатин, который предусматривает доставку в среду антитела или антигенсвязывающего фрагмента по изобретению, а также к способу лечения субъекта, имеющего или подверженного риску развития заболевания, ассоциированного с про-/латентным миостатином, выбранного из миопатии, и заболевания или состояния, связанного с метаболическим нарушением и/или конституцией организма.

038146 B1

038146 B1

Ссылка на родственную заявку

Согласно заявке на данное изобретение испрашивается преимущество в соответствии с 35 U.S.C. § 119(e) предварительной заявки на выдачу патента США № 62/219094, поданной 15 сентября 2015 г., под названием "Антитела к про-/латентному миостатину и их применения", содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки для всех целей.

Область техники, к которой относится настоящее изобретение

Варианты осуществления настоящего изобретения могут включать модуляторы активности фактора роста. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления такие модуляторы могут включать антитела и могут модулировать активность и/или биологию представителей семейства TGF- β .

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

Миостатин является секретлируемым фактором роста, который связан с отрицательной регуляцией массы мышц. Мутации с потерей функции в гене миостатина, приводящие к гипермышечному фенотипу, были описаны у крупного рогатого скота, овец, рыб, собак и людей. Экспрессия миостатина обычно ограничена скелетной мышцей, при этом сообщалось о низких уровнях экспрессии в жировой и сердечной тканях. Ингибирование передачи сигналов с участием миостатина приводит к увеличению размера мышц.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

Аспекты настоящего изобретения в соответствии с некоторыми вариантами осуществления относятся к антителам, которые специфически связываются с формами миостатина (например, промиостатином и/или латентным миостатином). Например, представленные в настоящем документе антитела специфически связываются с одной или несколькими проформами и/или латентными формами миостатина, такими как промиостатин и/или латентный миостатин. В соответствии с некоторыми аспектами в основе настоящего изобретения лежит неожиданное обнаружение представленных в настоящем документе антител, которые специфически связываются с чистым или практически чистым proGDF8 (также называемым промиостатином). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления представленные в настоящем документе антитела ингибируют передачу сигналов с участием миостатина. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ингибирование передачи сигналов с участием миостатина полезно для увеличения массы мышц или предупреждения атрофии мышц. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления представленные в настоящем документе антитела связывают и предупреждают расщепление миостатина пропротеиновой конвертазой и/или толлоидной протеазой. Предупреждение расщепления промиостатина или латентного миостатина в соответствии с некоторыми вариантами осуществления предупреждает активацию миостатина. Дополнительные аспекты настоящего изобретения относятся к антителам с аффинностью к антигену, которая чувствительна к pH. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления такие чувствительные к pH антитела эффективны для устранения антигенов из сыворотки крови. Кроме того, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления представленные в настоящем документе антитела являются "очищающими" (sweeping) антителами, которые могут эффективно удалять антигены (например, промиостатин и/или латентный миостатин) из сыворотки крови.

Аспекты настоящего изобретения относятся к антителу, которое содержит переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи, причем переменный домен тяжелой цепи содержит определяющий комплементарность участок 3 (CDRH3), содержащий последовательность, которая изложена под любым из SEQ ID NO: 10-11. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело специфически связывается с про-/латентным миостатином. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления переменный домен легкой цепи содержит определяющий комплементарность участок 3 (CDRL3), содержащий последовательность, которая изложена под любым из SEQ ID NO: 22-23. В соответствии с другим вариантом осуществления указанное антитело содержит шесть определяющих комплементарность участков (CDR): CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3, причем CDRH1 содержит последовательность, которая изложена под любым из SEQ ID NO: 1-3, CDRH2 содержит последовательность, которая изложена под любым из SEQ ID NO: 4-9, CDRH3 содержит последовательность, которая изложена под любым из SEQ ID NO: 10-11, CDRL1 содержит последовательность, которая изложена под любым из SEQ ID NO: 12-17, CDRL2 содержит последовательность, которая изложена под любым из SEQ ID NO: 18-21, и CDRL3 содержит последовательность, которая изложена под любым из SEQ ID NO: 22-23.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления указанный CDRH1 содержит последовательность, которая изложена под SEQ ID NO: 1 или 2, CDRH2 содержит последовательность, которая изложена под SEQ ID NO: 4 или 5, CDRH3 содержит последовательность, которая изложена под SEQ ID NO: 10, CDRL1 содержит последовательность, которая изложена под SEQ ID NO: 12 или 13, CDRL2 содержит последовательность, которая изложена под SEQ ID NO: 18 или 19, и CDRL3 содержит последовательность, которая изложена под SEQ ID NO: 22.

В соответствии с другим вариантом осуществления указанный CDRH1 содержит последовательность, которая изложена под SEQ ID NO: 1 или 3, CDRH2 содержит последовательность, которая изложена под SEQ ID NO: 6 или 7, CDRH3 содержит последовательность, которая изложена под

SEQ ID NO: 11, CDRL1 содержит последовательность, которая изложена под SEQ ID NO: 14 или 15, CDRL2 содержит последовательность, которая изложена под SEQ ID NO: 20 или 21, и CDRL3 содержит последовательность, которая изложена под SEQ ID NO: 23.

В соответствии с другими вариантами осуществления CDRH1 содержит последовательность, которая изложена под SEQ ID NO: 1 или 3, CDRH2 содержит последовательность, которая изложена под SEQ ID NO: 8 или 9, CDRH3 содержит последовательность, которая изложена под SEQ ID NO: 11, CDRL1 содержит последовательность, которая изложена под SEQ ID NO: 16 или 17, CDRL2 содержит последовательность, которая изложена под SEQ ID NO: 20 или 21, и CDRL3 содержит последовательность, которая изложена под SEQ ID NO: 23.

В соответствии с другим вариантом осуществления указанное антитело содержит последовательность переменного домена тяжелой цепи, которая изложена под любым из SEQ ID NO: 25-29. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления указанное антитело содержит последовательность переменного домена легкой цепи, которая изложена под любым из SEQ ID NO: 30-35.

Другие аспекты настоящего изобретения относятся к антителу, которое специфически связывается с про-/латентным миостатином и которое содержит переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи, причем переменный домен легкой цепи содержит определяющий комплементарность участок 3 (CDRL3), содержащий последовательность, которая изложена под любым из SEQ ID NO: 22-23. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления указанное антитело содержит последовательность переменного домена легкой цепи SEQ ID NO: 30.

Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к полипептиду, имеющему последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28 и SEQ ID NO: 29. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления полипептид представляет собой переменный домен тяжелой цепи. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления полипептид по меньшей мере на 75% (например, 80, 85, 90, 95, 98 или 99%) идентичен любой из аминокислотных последовательностей, изложенных под SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28 или SEQ ID NO: 29.

Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к полипептиду, имеющему последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34 и SEQ ID NO: 35. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления полипептид представляет собой переменный домен легкой цепи. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления полипептид по меньшей мере на 75% (например, 80, 85, 90, 95, 98 или 99%) идентичен любой из аминокислотных последовательностей, изложенных под SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34 или SEQ ID NO: 35.

Другой аспект настоящего изобретения относится к антителу, которое конкурирует с описанным выше антителом за связывание с про-/латентным миостатином. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления указанное антитело связывается с про-/латентным миостатином на том же эпитопе, что и описанное выше антитело. В соответствии с другим вариантом осуществления антитело конкурирует за связывание с про-/латентным миостатином с равновесной константой диссоциации, K_d , между антителом и про-/латентным миостатином, составляющей менее 10^{-6} М. В соответствии с другими вариантами осуществления K_d указанного антитела находится в диапазоне от 10^{-11} до 10^{-6} М.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело представляет собой гуманизованное антитело, диатело, химерное антитело, Fab-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент или Fv-фрагмент. В соответствии с другим вариантом осуществления антитело представляет собой гуманизованное антитело. В соответствии с другим вариантом осуществления антитело представляет собой человеческое антитело. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело содержит каркасную детерминанту, имеющую последовательность зародышевого типа человека. В соответствии с другим вариантом осуществления антитело содержит константный домен тяжелой цепи, выбранный из группы, состоящей из константных доменов IgG, IgG₄, IgG₂, IgG₂A, IgG₂B, IgG₂C, IgG₃, IgG₄, IgA1, IgA2, IgD, IgM и IgE. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело содержит константный домен IgG₄. В соответствии с другими вариантами осуществления антитело содержит константный домен IgG₄, имеющий замену в остове Ser на Pro, которая дает IgG₄-подобный шарнир и обеспечивает образование межцепочечных дисульфидных связей. В соответствии с другим вариантом осуществления антитело конъюгировано со средством, выбранным из группы, состоящей из флуоресцентного средства, люминесцентного средства, ферментного средства и радиоактивного средства.

В соответствии с другим вариантом осуществления антитело специфически связывается с про-/латентным миостатином, но не со зрелым миостатином. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело специфически связывается с про-/латентным миостатином, но не с другим представителем семейства трансформирующего фактора роста бета. В соответствии с другим вариантом осуществления указанным представителем является GDF11 или активин.

Дополнительный аспект настоящего изобретения относится к антителу, которое специфически связывает про-/латентный миостатин и которое ингибирует протеолитическое образование зрелого миостатина с участием толлоидной протеазы. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления указан-

ное антитело ингибирует протеолитическое образование зрелого миостатина с участием толлоидной протеазы с IC_{50} менее 1 мкМ. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело является перекрестно-реактивным с человеческим и мышинным про-/латентным миостатином. В соответствии с другими вариантами осуществления антитело специфически связывается с про-/латентным миостатином, но не с GDF11 или активинном. В соответствии с другим вариантом осуществления антитело специфически связывается с про-/латентным миостатином, но не со зрелым миостатином.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу снижения активации рецептора миостатина в клетках, присутствующих в среде, содержащей про-/латентный миостатин, причем способ предусматривает доставку в среду описанного выше антитела в количестве, эффективном для ингибирования протеолитической активации про-/латентного миостатина. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления среда дополнительно содержит пропротеиновую конвертазу. В соответствии с другими вариантами осуществления среда дополнительно содержит толлоидную протеазу. В соответствии с другим вариантом осуществления антитело доставляют в среду в количестве, эффективном для ингибирования протеолитической активации про-/латентного миостатина с участием толлоидной протеазы. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления осуществления клетки находятся *in vitro*. В соответствии с другими вариантами осуществления клетки находятся *in vivo*.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу лечения субъекта с миопатией, причем способ предусматривает введение субъекту эффективного количества описанного выше антитела. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления миопатия является первичной миопатией. В соответствии с другим вариантом осуществления первичная миопатия включает дисфункциональную атрофию. В соответствии с другими вариантами осуществления дисфункциональная атрофия ассоциирована с переломом шейки бедра, элективной заменой сустава, критическим состоянием при миопатии, повреждением спинного мозга или инсультом. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления миопатия является вторичной миопатией, при которой дистрофия мышечной ткани является вторичной на фоне не связанной с заболеванием патологии. В соответствии с другими вариантами осуществления вторичная миопатия включает денервацию, генетическую мышечную слабость или кахексию. В соответствии с другим вариантом осуществления вторичная миопатия является денервацией, ассоциированной с амиотрофическим боковым склерозом или спинальной мышечной атрофией. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления вторичная миопатия представляет собой генетическую мышечную слабость, ассоциированную с мышечной дистрофией. В соответствии с другими вариантами осуществления вторичная миопатия представляет собой кахексию, ассоциированную с почечной недостаточностью, СПИДом, состоянием при сердечной недостаточности, злокачественной опухолью или старением.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу лечения субъекта с заболеванием или состоянием, связанным со старением. К иллюстративным заболеваниям и состояниям, связанным со старением, относятся, без ограничения, саркопения (возрастная потеря массы мышц), дряхлость и андрогенная недостаточность.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу лечения субъекта с заболеванием или состоянием, связанным с дисфункциональной атрофией/травмой. К иллюстративным заболеваниям и состояниям, связанным с дисфункциональной атрофией/травмой, относятся, без ограничения, мышечная слабость, связанная со временем, проведенным в отделении интенсивной терапии (ICU), замена бедра/сустава, перелом шейки бедра, инсульт, постельный режим, SCI, повреждение мышцы-вращателя плеча, протезирование коленного сустава, перелом кости и ожоги.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу лечения субъекта с нейродегенеративным заболеванием или состоянием. К иллюстративным нейродегенеративным заболеваниям или состояниям относятся, без ограничения, спинальная мышечная атрофия и амиотрофический боковой склероз (ALS).

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу лечения субъекта с заболеванием или состоянием, связанным с кахексией. К иллюстративным заболеваниям и состояниям, связанным с кахексией, относятся, без ограничения, злокачественная опухоль, хроническая сердечная недостаточность, синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД), хроническое обструктивное заболевание легких (COPD) и хроническое заболевание почек (CKD).

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу лечения субъекта с заболеванием или состоянием, связанным с редкими заболеваниями. К иллюстративным редким заболеваниям и состояниям относятся, без ограничения, несовершенный остеогенез, спорадический миозит с включенными тельцами и острый лимфобластный лейкоз.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу лечения субъекта с заболеванием или состоянием, связанным с метаболическим нарушением и/или конституцией организма. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления заболевание или состояние представляет собой ожирение (например, тяжелое ожирение), синдром Прадера-Вилли, сахарный диабет II типа или анорексию. Тем не менее под объем настоящего изобретения попадают и дополнительные заболевания или состояния, которые связаны с метаболическими нарушениями и/или конституцией организма.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу лечения субъекта с заболеванием или

состоянием, связанным с врожденными миопатиями. К иллюстративным врожденным миопатиям относятся, без ограничения, сцепленная с X-хромосомой миотубулярная миопатия, аутосомно-доминантная центроядерная миопатия, аутосомно-рецессивная центроядерная миопатия, непрогрессирующая врожденная нитеобразная миопатия и врожденная миопатия с диспропорцией волокон.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу лечения субъекта с заболеванием или состоянием, связанным с мышечными дистрофиями. К иллюстративным мышечным дистрофиям относятся, без ограничения, дистрофия Дюшенна, болезнь Беккера, фациоскапулохумеральная (FSH) и тазово-плечевая мышечные дистрофии.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу лечения субъекта с урогинекологическим заболеванием или состоянием, ларингологическим нарушением (стеноз), экстраокулярной миопатией, синдромом запястного канала, синдромом Гийена-Барре или остеосаркомой.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления лечение приводит в результате к улучшенной мышечной силе у субъекта. В соответствии с другими вариантами осуществления лечение приводит в результате к улучшенному метаболическому статусу у субъекта.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело вводят дозой в диапазоне от 0,1 до 100 мг/кг. В соответствии с другим вариантом осуществления антитело вводят дозой в диапазоне от 0,3 до 30 мг/кг.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело вводят субъекту внутривенно. В соответствии с другими вариантами осуществления антитело вводят субъекту подкожно. В соответствии с другим вариантом осуществления антитело вводят субъекту несколько раз. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления указанные множественные введения осуществляют по меньшей мере раз в месяц. В соответствии с другим вариантом осуществления указанные множественные введения осуществляют по меньшей мере раз в неделю.

Дополнительный аспект настоящего изобретения относится к композиции, содержащей любое описанное выше антитело и носитель. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления указанный носитель представляет собой фармацевтически приемлемый носитель. В соответствии с другими вариантами осуществления антитело и носитель находятся в лиофилизированной форме. В соответствии с другим вариантом осуществления антитело и носитель находятся в растворе. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело и носитель являются замороженными. В соответствии с другими вариантами осуществления антитело и носитель являются замороженными при температуре менее или равной -65°C .

Другие аспекты настоящего изобретения относятся к выделенной нуклеиновой кислоте, кодирующей белок, содержащий три определяющих комплементарность участка (CDR): CDRH1, CDRH2 и CDRH3, при этом CDRH3 содержит последовательность, которая изложена под SEQ ID NO: 10 или 11. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления указанный CDRH1 содержит последовательность, которая изложена под SEQ ID NO: 1, 2 или 3. В соответствии с другими вариантами осуществления CDRH2 содержит последовательность, которая изложена под любым из SEQ ID NO: 4-9.

Другой аспект настоящего изобретения относится к выделенной нуклеиновой кислоте, кодирующей белок, содержащий три определяющих комплементарность участка (CDR): CDRL1, CDRL2 и CDRL3, при этом CDRL3 содержит последовательность, которая изложена под SEQ ID NO: 22. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления указанный CDRL1 содержит последовательность, которая изложена под любым из SEQ ID NO: 12-17. В соответствии с другими вариантами осуществления CDRL2 содержит последовательность, которая изложена под любым из SEQ ID NO: 18-21.

Дополнительно аспекты настоящего изобретения относятся к выделенной нуклеиновой кислоте, содержащей последовательность, которая изложена под любым из SEQ ID NO: 38-49.

Другой аспект настоящего изобретения относится к выделенной клетке, содержащей описанную выше выделенную нуклеиновую кислоту.

Настоящее изобретение в соответствии с некоторыми аспектами относится к способам оценки биологического образца, полученного от субъекта с миопатией. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления способ предусматривает получение иммунологической реакционной смеси, которая содержит белок из биологического образца, полученного от субъекта, и антитело, которое специфически связывает про-/латентный миостатин; поддержание иммунологической реакционной смеси в условиях, которые делают возможным образование комплексов связывания между антителом и про-/латентным миостатином; и определение величины образования комплексов связывания. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления способ предусматривает получение иммунологической реакционной смеси, которая содержит белок из биологического образца, полученного от субъекта, и антитело, которое специфически связывает промиостатин; поддержание иммунологической реакционной смеси в условиях, которые делают возможным образование комплексов связывания между антителом и промиостатином; и определение величины образования комплексов связывания. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления способ предусматривает получение иммунологической реакционной смеси, которая содержит белок из биологического образца, полученного от субъекта, и антитело, которое специфически связывает латентный миостатин; поддержание иммунологической реакционной смеси в условиях, кото-

рые делают возможным образование комплексов связывания между антителом и латентным миостатином; и определение величины образования комплексов связывания. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления способ предусматривает получение иммунологической реакционной смеси, которая содержит белок из биологического образца, полученного от субъекта, и антитело, которое специфически связывает зрелый миостатин; поддержание иммунологической реакционной смеси в условиях, которые делают возможным образование комплексов связывания между антителом и зрелым миостатином; и определение величины образования комплексов связывания.

В соответствии с одним аспектом в настоящем документе раскрыто выделенное антитело, содержащее вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31. В соответствии с одним вариантом осуществления антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50. В соответствии с другим вариантом осуществления антитело содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51.

В соответствии с другим аспектом в настоящем документе раскрыто выделенное антитело, содержащее вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность CDRH1, содержащую SEQ ID NO: 1, последовательность CDRH2, содержащую SEQ ID NO: 6, и последовательность CDRH3, содержащую SEQ ID NO: 11; и вариабельный участок легкой цепи, содержащий последовательность CDRL1, содержащую SEQ ID NO: 14, последовательность CDRL2, содержащую SEQ ID NO: 20, и последовательность CDRL3, содержащую SEQ ID NO: 23.

В соответствии с одним вариантом осуществления вариабельный участок тяжелой цепи содержит последовательность SEQ ID NO: 26. В соответствии с другим вариантом осуществления вариабельный участок легкой цепи содержит последовательность SEQ ID NO: 32.

В соответствии с одним вариантом осуществления вариабельный участок тяжелой цепи содержит последовательность SEQ ID NO: 27. В соответствии с другим вариантом осуществления вариабельный участок легкой цепи содержит последовательность SEQ ID NO: 33.

В соответствии с другим аспектом в настоящем документе раскрыто выделенное антитело, содержащее вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность CDRH1, содержащую SEQ ID NO: 1, последовательность CDRH2, содержащую SEQ ID NO: 8, и последовательность CDRH3, содержащую SEQ ID NO: 11; и вариабельный участок легкой цепи, содержащий последовательность CDRL1, содержащую SEQ ID NO: 16, последовательность CDRL2, содержащую SEQ ID NO: 20, и последовательность CDRL3, содержащую SEQ ID NO: 23.

В соответствии с одним вариантом осуществления вариабельный участок тяжелой цепи содержит последовательность SEQ ID NO: 28. В соответствии с другим вариантом осуществления вариабельный участок легкой цепи содержит последовательность SEQ ID NO: 34.

В соответствии с одним вариантом осуществления вариабельный участок тяжелой цепи содержит последовательность SEQ ID NO: 29. В соответствии с одним вариантом осуществления вариабельный участок легкой цепи содержит последовательность SEQ ID NO: 35.

В соответствии с одним вариантом осуществления антитело представляет собой человеческое антитело. В соответствии с одним вариантом осуществления антитело содержит константный домен IgG₄. В соответствии с одним вариантом осуществления антитело содержит константный домен IgG₄, имеющий замену в остоле Ser на Pro, которая дает IgG₄-подобный шарнир и обеспечивает образование межцепочечных дисульфидных связей.

В соответствии с одним вариантом осуществления антитело специфически связывается с про-/латентным миостатином. В соответствии с одним вариантом осуществления антитело специфически связывается с промиостатином. В соответствии с другим вариантом осуществления антитело специфически связывается с латентным миостатином. В соответствии с одним вариантом осуществления антитело не связывается со зрелым миостатином.

В соответствии с одним вариантом осуществления антитело ингибирует протеолитическое образование зрелого миостатина с участием толлоидной протеазы. В соответствии с одним вариантом осуществления антитело ингибирует протеолитическое образование зрелого миостатина с участием толлоидной протеазы с IC₅₀ менее 1 мкМ.

В соответствии с одним вариантом осуществления антитело является перекрестно-реактивным с человеческим и мышинным про-/латентным миостатином. В соответствии с другим вариантом осуществления антитело связывается с про-/латентным миостатином, но не связывается с GDF11 или активином.

В соответствии с одним аспектом, в настоящем документе раскрыт способ снижения активации рецептора миостатина в клетках, присутствующих в среде, содержащей про-/латентный миостатин, причем способ предусматривает доставку в среду описанного в настоящем документе антитела в количестве, эффективном для ингибирования протеолитической активации про-/латентного миостатина. В соответствии с одним вариантом осуществления среда содержит пропротеиновую конвертазу. В соответствии с другим вариантом осуществления среда содержит толлоидную протеазу. В соответствии с одним вариантом осуществления клетка находится *in vitro*. В соответствии с другим вариантом осуществления клетка

находится *in vivo*.

В соответствии с другим аспектом в настоящем документе раскрыт способ лечения субъекта с миопатией, причем способ предусматривает введение субъекту эффективного количества раскрываемого в настоящем документе антитела.

В соответствии с одним вариантом осуществления миопатия является первичной миопатией. В соответствии с другим вариантом осуществления первичная миопатия является дисфункциональной атрофией. В соответствии с одним вариантом осуществления дисфункциональная атрофия ассоциирована с переломом шейки бедра, элективной заменой сустава, критическим состоянием при миопатии, повреждением спинного мозга и/или инсультом.

В соответствии с другим вариантом осуществления миопатия является вторичной миопатией, при которой дистрофия мышечной ткани является вторичной на фоне связанной с заболеванием патологии. В соответствии с одним вариантом осуществления вторичная миопатия включает денервацию, генетическую мышечную слабость или кахексию. В соответствии с другим вариантом осуществления вторичная миопатия является денервацией, ассоциированной с амиотрофическим боковым склерозом или спинальной мышечной атрофией. В соответствии с еще одним вариантом осуществления вторичная миопатия представляет собой генетическую мышечную слабость, ассоциированную с мышечной дистрофией. В соответствии с одним вариантом осуществления вторичная миопатия представляет собой кахексию, ассоциированную с почечной недостаточностью, СПИДом, состоянием при сердечной недостаточности, злокачественной опухолью или старением.

В соответствии с одним вариантом осуществления введение приводит в результате к улучшенной мышечной силе у субъекта. В соответствии с одним вариантом осуществления введение приводит в результате к улучшенному метаболическому статусу у субъекта.

В соответствии с одним вариантом осуществления антитело вводят дозой в диапазоне от 0,1 до 100 мг/кг. В соответствии с другим вариантом осуществления антитело вводят дозой в диапазоне от 0,3 до 30 мг/кг.

В соответствии с одним вариантом осуществления антитело вводят субъекту внутривенно. В соответствии с другим вариантом осуществления антитело вводят субъекту подкожно.

В соответствии с одним вариантом осуществления антитело вводят субъекту несколько раз. В соответствии с одним вариантом осуществления множественные введения осуществляют по меньшей мере раз в месяц. В соответствии с другим вариантом осуществления множественные введения осуществляют по меньшей мере раз в неделю.

В соответствии с другим аспектом в настоящем документе раскрыта фармацевтическая композиция, содержащая раскрываемое в настоящем документе антитело и фармацевтически приемлемый носитель. В соответствии с одним вариантом осуществления композиция является лиофилизированной композицией. В соответствии с другим вариантом осуществления композиция является жидкой композицией. В соответствии с одним вариантом осуществления композиция является замороженной. В соответствии с одним вариантом осуществления композиция является замороженной при температуре менее или равной -65°C .

В соответствии с другим аспектом в настоящем документе раскрыт шприц, содержащий описываемую в настоящем документе фармацевтическую композицию.

В соответствии с другим аспектом в настоящем документе раскрыта выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело, содержащее переменный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 39, и переменный участок легкой цепи, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 45.

В соответствии с другим аспектом в настоящем документе раскрыта выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело, содержащее переменный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность CDRH1, содержащую SEQ ID NO: 1, последовательность CDRH2, содержащую SEQ ID NO: 6, и последовательность CDRH3, содержащую SEQ ID NO: 11; и переменный участок легкой цепи, содержащий последовательность CDRL1, содержащую SEQ ID NO: 14, последовательность CDRL2, содержащую SEQ ID NO: 20, и последовательность CDRL3, содержащую SEQ ID NO: 23.

В соответствии с одним вариантом осуществления переменный участок тяжелой цепи содержит последовательность SEQ ID NO: 40. В соответствии с одним вариантом осуществления переменный участок легкой цепи содержит последовательность SEQ ID NO: 46.

В соответствии с одним вариантом осуществления переменный участок тяжелой цепи содержит последовательность SEQ ID NO: 41. В соответствии с другим вариантом осуществления переменный участок легкой цепи содержит последовательность SEQ ID NO: 47.

В соответствии с другим аспектом в настоящем документе раскрыта выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело, содержащее переменный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность CDRH1, содержащую SEQ ID NO: 1, последовательность CDRH2, содержащую SEQ ID NO: 8, и последовательность CDRH3, содержащую SEQ ID NO: 11; и переменный участок легкой цепи, содержащий последовательность CDRL1, содержащую SEQ ID NO: 16, последовательность CDRL2, содержащую SEQ ID NO: 20, и последовательность CDRL3, содержащую SEQ ID NO: 23.

В соответствии с одним вариантом осуществления вариабельный участок тяжелой цепи содержит последовательность SEQ ID NO: 42. В соответствии с другим вариантом осуществления вариабельный участок легкой цепи содержит последовательность SEQ ID NO: 48.

В соответствии с одним вариантом осуществления вариабельный участок тяжелой цепи содержит последовательность SEQ ID NO: 43. В соответствии с другим вариантом осуществления вариабельный участок легкой цепи содержит последовательность SEQ ID NO: 49.

В соответствии с другим аспектом, в настоящем документе раскрыта выделенная клетка, содержащая описанную в настоящем документе выделенную нуклеиновую кислоту.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1А, 1В показана доменная структура миостатина и комплекс промиостатина. На фиг. 1А показан миостатин, секретируемый в виде пропротеина, с ингибирующим продоменом, за которым следует С-концевой домен фактора роста, который существует в виде связанного дисульфидной связью димера. На фиг. 1В показан собранный белок-предшественник в неактивной конформации, в которой продомен (темно-серый) охватывает фактор роста (светло-серый) посредством комплекса по типу "смирительной рубашки". Данная фигура является адаптацией из структуры латентного TGFβ1 (Shi et al., Nature, 2011).

На фиг. 2 показано, что активация миостатина включает два различных события с участием протеаз, в результате чего образуются три основных вида миостатина. Биосинтетический белок-предшественник, промиостатин, процессируется двумя отдельными протеазами. Расщепление промиостатина (и proGDF11) осуществляется пропротеиновой конвертазой, такой как фурин/PACE3 (фермент, расщепляющий белок в месте спаренных основных аминокислот, 3) или PCSK5 (пропротеиновая конвертаза субтилизин-кексинового типа 5), которая разрезает в консервативном сайте RXXR между продоменом и зрелым фактором роста. Это расщепление создает латентный комплекс, в котором зрелый фактор роста защищен продоменом от связывания с его рецепторами. Активация и высвобождение активного фактора роста достигается после расщепления дополнительной протеазой из семейства BMP/толлоидных белков, такой как TLL-2 (толлоидоподобный белок 2) или BMP1 (костный морфогенетический белок 1). Эти события расщепления дают зрелую форму миостатина, которую можно назвать активным миостатином или зрелым миостатином.

На фиг. 3А-3С показано, что Ab1 блокирует расщепление промиостатина представителями семейства толлоидных протеаз. Образцы латентного миостатина, предварительно инкубированные с увеличивающимися количествами Ab1, анализировали в анализе активации миостатина. После анализа высвобождения миостатина с помощью анализа по гену-репортеру (фиг. 3А) образцы затем гнали в восстановительных условиях и зондировали в вестерн-блоттинге с антителом к продомеу миостатина (фиг. 3В). 18-кДа бэнд (бокс), соответствующий части АРМ продомеу, полученной после расщепления толлоидными ферментами, пропорционально уменьшался с увеличением доз Ab1. У латентных и промиостатиновых стандартов (загрузка по 45 нг) наблюдали миграцию промиостатина до ~50 кДа, а продомеу до ~37 кДа. На фиг. 3С показано, что активация миостатина включает два различных события с участием протеаз, в результате чего образуются три основных вида миостатина. Биосинтетический белок-предшественник, промиостатин, процессируется двумя отдельными протеазами. Расщепление промиостатина (и proGDF11) осуществляется пропротеиновой конвертазой, такой как фурин/PACE3 (фермент, расщепляющий белок в месте спаренных основных аминокислот, 3) или PCSK5 (пропротеиновая конвертаза субтилизин-кексинового типа 5), которая разрезает в консервативном сайте RXXR между продоменом и зрелым фактором роста. Это расщепление создает латентный комплекс, в котором зрелый фактор роста защищен продоменом от связывания с его рецепторами. См. фиг. 3В, на которой проиллюстрировано потенциальное ингибирование толлоидной протеазы, что блокирует дальнейшее расщепление промиостатина. Активация и высвобождение активного фактора роста достигаются после расщепления дополнительной протеазой из семейства BMP/толлоидных белков, такой как TLL-2 (толлоидоподобный белок 2) или BMP1 (костный морфогенетический белок 1).

На фиг. 4 показана эффективность исходного антитела Ab1 и других кандидатов в клеточном анализе по гену-репортеру. После реакции протеолиза в течение ночи с ферментами из семейств пропротеиновых конвертаз и толлоидных протеаз высвобождение зрелого фактора роста измеряли с помощью анализа по гену-репортеру CAGA в клетках 293Т. Результаты сравнивали с контрольными реакциями для расчета доли промиостатина или proGDF11, который высвобождался в ходе анализа. Показано стандартное отклонение в среднем для трех повторностей, но оно не видно на графике для большинства точек данных из-за их низкой величины.

На фиг. 5 графически показано, что антитела Ab1, Ab2, Ab4 и Ab6 не ингибируют активацию proGDF11.

На фиг. 6 показаны результаты анализа, оценивающего средний процент изменения массы тела. Животных ежедневно взвешивали и рассчитывали процент изменения массы, начиная с 0-го дня. Данные представляют собой средние групповые значения ± SEM. Данные по среднему проценту изменения для каждой группы на 42-й день исследования анализировали с помощью однофакторного дисперсионного

анализа с последующей апостериорной оценкой критерия Холма-Сидака относительно контрольной группы PBS, $^{**}p<0,01$.

На фиг. 7A-7D показаны результаты анализа, оценивающего значения массы тканей, на фиг. 7A показана средняя масса икроножной мышцы, на фиг. 7B показана средняя масса грудной мышцы, на фиг. 7C показана средняя масса камбаловидной мышцы, на фиг. 7D показана средняя масса трицепса.

Статистическую оценку проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа с последующей апостериорной оценкой критерия Холма-Сидака относительно контрольной группы с наполнителем (группы 1). Данные представляют собой средние групповые значения \pm SEM. $^{**}p<0,01$. Столбцы слева направо обозначают группы 1-5.

На фиг. 8A-8C показаны результаты анализа, оценивающего значения массы тканей. На фиг. 8A показана средняя масса передней большеберцовой мышцы. На фиг. 8B показана средняя масса диафрагмы. На фиг. 8C показана средняя масса квадрицепса.

Статистическую оценку проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа с последующей апостериорной оценкой критерия Холма-Сидака относительно контрольной группы с наполнителем (группы 1). Данные представляют собой средние групповые значения \pm SEM. $^{*}p<0,05$. Столбцы слева направо обозначают группы 1-5.

На фиг. 9A, 9B показаны результаты анализа, оценивающего средний процент изменения массы тела и массы нежировых тканей.

На фиг. 9A представлен график, на котором изображен расчетный процент изменения массы с 0-го дня у животных, которых взвешивали дважды в неделю на протяжении всего периода исследования. На фиг. 9B животных подвергали анализу на EchoMRI (QNMRI) для измерения состава организма на -4-, 7-, 14-, 21- и 28-й дни и рассчитывали процент изменения массы нежировых тканей с 0-го дня. Данные представляют собой средние групповые значения \pm SEM. Как в случае с массой тела, так и в случае с массой нежировых тканей данные по среднему проценту изменения для каждой группы на 28-й день исследования анализировали с помощью однофакторного дисперсионного анализа с последующей апостериорной оценкой критерия Холма-Сидака относительно контрольной группы IgG (группы 2). $^{***}p<0,0005$, $^{**}p<0,005$, $^{*}p<0,05$, ns (не значимо).

На фиг. 10A-10D приведены графики, на которых показаны результаты анализа, оценивающего значения массы мышц, на фиг. 10A показана средняя масса квадрицепса, на фиг. 10B показана средняя масса икроножной мышцы, на фиг. 10C показана средняя масса передней большеберцовой мышцы, на фиг. 10D показана средняя масса диафрагмы.

Над каждым столбцом указан процент разницы в средних значениях массы мышц у обработанных Ab1 групп относительно контрольной группы с IgG.

Статистическую оценку проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа с последующей апостериорной оценкой критерия Холма-Сидака относительно контрольной группы с IgG (группы 2). Данные представляют собой средние групповые значения \pm SEM. $^{****}p<0,0001$, $^{***}p<0,0005$, $^{**}p<0,005$, $^{*}p<0,05$, ns (не значимо).

На фиг. 11A, 11B показаны результаты анализа, оценивающего средний процент изменения массы тела и массы нежировых тканей.

На фиг. 11A показан процент изменения массы с 0-го дня, рассчитанный у животных, которых взвешивали дважды в неделю на протяжении всего периода исследования (фиг. 11B). Животных подвергали анализу на EchoMRI (QNMRI) для измерения состава организма на -1-, 6- и 13-й дни и рассчитывали процент изменения массы нежировых тканей с -1-го дня. PBS = фосфатно-буферный солевой раствор, Dex = дексаметазон, IgG (20) = контрольное антитело IgG, вводимое дозой 20 мг/кг/нед., Ab1 (20) = антитело Ab1, вводимое дозой 20 мг/кг/нед., и Ab1 (2) = антитело Ab1, вводимое дозой 2 мг/кг/нед. Данные представляют собой средние групповые значения \pm SEM. Данные по среднему проценту изменения для каждой группы на 14-й день (для массы тела) и 13-й день (для массы нежировых тканей) анализировали с помощью однофакторного дисперсионного анализа с последующим критерием множественных сравнений Даннета относительно группы 1 ($^{****}p<0,0001$, $^{***}p<0,0005$, $^{**}p<0,005$, $^{*}p<0,05$) и относительно группы 5 ($^{++++}p<0,0001$, $^{+++}p<0,0005$, $^{++}p<0,005$, $^{+}p<0,05$), ns (не значимо).

На фиг. 12A-12D приведены графики, на которых показаны результаты анализа, оценивающего значения массы различных мышц. На фиг. 12A показана средняя масса (в граммах) икроножной мышцы, на фиг. 12B показана средняя масса (в граммах) квадрицепса, на фиг. 12C показан средний процент изменения массы икроножной мышцы относительно контрольных животных, обработанных PBS (IP) и нормальной питьевой водой (группы 1), и на фиг. 12D показан средний процент изменения массы квадрицепса относительно контрольных животных, обработанных PBS (IP) и нормальной питьевой водой (группы 1). PBS = фосфатно-буферный солевой раствор, Dex = дексаметазон, IgG(20) = контрольное антитело IgG, вводимое дозой 20 мг/кг/нед., Ab1(20) = антитело Ab1, вводимое дозой 20 мг/кг/нед., и Ab1(2) = антитело Ab1, вводимое дозой 2 мг/кг/нед. На фиг. 12A, 12B планки погрешностей представляют стандартное отклонение (SD). На фиг. 12C, 12D планки погрешностей представляют стандартную ошибку среднего (SEM).

Статистическую оценку проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа с последующим критерием множественных сравнений относительно группы 1 (**** $p < 0,0001$, *** $p < 0,0005$, ** $p < 0,005$, * $p < 0,05$) и относительно группы Даннета 5 (++++ $p < 0,0001$, +++ $p < 0,0005$, ++ $p < 0,005$, + $p < 0,05$), ns (не значимо). Столбцы слева направо обозначают PBS, воду; PBS, dex; контрольное IgG; Ab1(20) и Ab1(2).

На фиг. 13A, 13B показаны результаты анализа, оценивающего средний процент изменения массы тела и массы нежировых тканей. На фиг. 13A показан процент изменения массы с 0-го дня, рассчитанный для животных, которых взвешивали дважды в неделю на протяжении всего периода исследования. На фиг. 13B показан процент изменения массы нежировых тканей с -1-го дня, рассчитанный у животных, которых подвергали EchoMRI (QNMRI) для измерения состава организма в -1-й, 7-й и 14-й дни. PBS = фосфатно-буферный солевой раствор, IgG(20) = контрольное антитело IgG, вводимое дозой 20 мг/кг/нед., Ab1(20) = антитело Ab1, вводимое дозой 20 мг/кг/нед., и Ab1(2) = антитело Ab1, вводимое дозой 2 мг/кг/нед. Данные представляют собой средние групповые значения \pm SEM.

На фиг. 14A-14D показаны результаты анализа, оценивающего значения массы мышц. На фиг. 14A показана средняя масса икроножной мышцы у иммобилизованной ноги (в граммах), на фиг. 14B показана средняя масса (в граммах) квадрицепса у иммобилизованной ноги, на фиг. 14C показан средний процент изменения массы икроножной мышцы относительно контрольных животных, обработанных PBS (IP) и без иммобилизации (группы 1), и на фиг. 14D показан средний процент изменения массы квадрицепса относительно контрольных животных, обработанных PBS (IP) и без иммобилизации (группы 1). PBS = фосфатно-буферный солевой раствор, IgG(20) = контрольное антитело IgG, вводимое дозой 20 мг/кг/нед., Ab1(20) = антитело Ab1, вводимое дозой 20 мг/кг/нед., и Ab1(2) = антитело Ab1, вводимое дозой 2 мг/кг/нед. На фиг. 14A, 14B планки погрешностей представляют стандартное отклонение (SD). На фиг. 14C, 14D планки погрешностей представляют стандартную ошибку среднего (SEM). Статистическую оценку проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа с последующим критерием множественных сравнений Даннета относительно группы 1 (**** $p < 0,0001$, *** $p < 0,0005$, ** $p < 0,005$, * $p < 0,05$) и относительно группы 5 (++++ $p < 0,0001$, +++ $p < 0,0005$, ++ $p < 0,005$, + $p < 0,05$), ns (не значимо). Столбцы слева направо обозначают PBS, без иммобилизации; PBS, иммобилизованная; контрольное IgG(2), иммобилизованная; Ab1(20), иммобилизованная; и Ab1(2), иммобилизованная.

На фиг. 15 показаны результаты анализа, оценивающего изменение массы нежировых тканей на 21-й день (вверху справа) и 28-й день (вверху слева). На ней также изображен процент изменения массы нежировых тканей для трех различных доз: 20 мг/кг/нед. (внизу слева), 2 мг/кг/нед. (внизу по центру) и 0,5 мг/кг/нед. (внизу справа) протестированных антител, контрольного PBS и контрольного IgG. Статистическую оценку проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа с последующим критерием множественных сравнений Даннета относительно группы 1 (**** $p < 0,0001$, *** $p < 0,005$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$) и относительно контрольного IgG. На верхних двух изображениях столбцы слева направо представляют собой PBS; контр. IgG 20 мг/кг/нед.; Ab1 20 мг/кг/нед.; Ab1 2 мг/кг/нед.; Ab1 0,5 мг/кг/нед.; Ab2 20 мг/кг/нед.; Ab2 2 мг/кг/нед.; Ab2 0,5 мг/кг/нед.; Ab4 20 мг/кг/нед.; Ab4 2 мг/кг/нед.; Ab4 0,5 мг/кг/нед.; Ab6 20 мг/кг/нед.; Ab6 2 мг/кг/нед.; и Ab6 0,5 мг/кг/нед. На нижнем левом изображении (20 мг/кг/нед.) точки данных, соответствующие 28-му дню после введения дозы, сверху вниз соответствуют Ab1, Ab4, Ab2, Ab6, контрольному IgG и PBS. На нижнем центральном изображении (2 мг/кг/нед.) точки данных, соответствующие 28-му дню после введения дозы, сверху вниз соответствуют Ab2, Ab1, Ab6, Ab4, контрольному IgG и PBS. На нижнем справа изображении (0,5 мг/кг/нед.) точки данных, соответствующие 28-му дню после введения дозы, сверху вниз соответствуют контрольному IgG, Ab1, Ab2, PBS, Ab4 и Ab6.

На фиг. 16A, 16B показана доменная структура и анализ форм предшественников миостатина. На фиг. 16A показана доменная структура промиостатина и латентного миостатина с указанными сайтами расщепления протеазами. На фиг. 16B показан частично расщепленный пропротеиновой конвертазой промиостатин после разгона на электрофореze в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия. В восстановительных условиях бэнды белка состояли из мономера промиостатина (~50 кДа), продомена (~37 кДа) и фактора роста (12,5 кДа).

На фиг. 17A, 17B показано, что Ab1 специфично к миостатину. На фиг. 17A показано, что Ab1 специфически связывается с промиостатином и латентным миостатином без наблюдаемого связывания с другими представителями суперсемейства TGF β , прежде всего с соответствующими формами GDF11. Ab1 вводили высокой концентрацией (50 мкг/мл) в наконечники Forte-Bio BLI, покрытые указанным антигеном, и измеряли показатели скорости ассоциации и диссоциации для получения примерного значения K_d . Величина ответа биосенсора, указывающая на событие связывания, графически представлена черными столбцами, а расчетная K_d обозначена оранжевым. На фиг. 17B показано, что Ab1 блокирует активацию промиостатина, но не proGDF11. После реакции протеолиза в течение ночи с ферментами из семейств пропротеиновых конвертаз и толлоидных протеаз высвобождение зрелого фактора роста измеряли с помощью анализа по гену-репортеру CAGA в клетках 293T. Результаты сравнивали с контрольными реакциями для расчета доли промиостатина или proGDF11, который высвобождался в ходе анализа.

На фиг. 18A-18C показан дозозависимый эффект SCID на кандидатные антитела. На фиг. 18A показана мышечная масса икроножной мышцы, а на фиг. 18B показана мышечная масса квадрицепса. На фиг. 18C показаны проценты изменения средней массы мышц по сравнению с контрольным PBS. Столбцами на фиг. 18A, 18B слева направо представлены: PBS; контр. IgG 20 мг/кг/нед.; Ab1 20 мг/кг/нед.; Ab1 2 мг/кг/нед.; Ab1 0,5 мг/кг/нед.; Ab2 20 мг/кг/нед.; Ab2 2 мг/кг/нед.; Ab2 0,5 мг/кг/нед.; Ab4 20 мг/кг/нед.; Ab4 2 мг/кг/нед.; Ab4 0,5 мг/кг/нед.; Ab6 20 мг/кг/нед.; Ab6 2 мг/кг/нед.; и Ab6 0,5 мг/кг/нед.

На фиг. 19 показаны результаты исследования продолжительности действия, сравнивающего Ab1 с существующим антителом к миостатину (AbMyo). PBS применяли в качестве отрицательного контроля; IgG применяли в качестве положительного контроля. Изменение массы нежировых тканей исследовали по различным протоколам введения доз через 21 день.

На фиг. 20 представлена схема, на которой проиллюстрированы результаты анализа, в котором восстанавливают активацию миостатина *in vitro*.

На фиг. 21A, 21B показана тяжелая цепь (фиг. 21A; SEQ ID NO: 50) и легкая цепь (фиг. 21B; SEQ ID NO: 51) гуманизованного моноклонального антитела (Ab2) подтипа IgG₄, у которого серин заменен пролином. Это дает шарнирную последовательность по типу IgG₄ и сводит к минимуму неполное образование межцепочечных дисульфидных мостиков, что характерно для IgG₄. Определяющие комплементарность участки (CDR) подчеркнуты. Выделенная жирным последовательность NST: сайт N-связанного гликозилирования консенсусной последовательности; выделенные жирным последовательности DP являются потенциальными сайтами расщепления; выделенные жирным последовательности NX, где X может быть S, T или G, являются потенциальными сайтами дезамидирования; выделенные жирным последовательности DX, где X может быть G, S, T или SDG, являются потенциальными сайтами изомеризации; выделенные жирным метионины являются потенциальными сайтами окисления метионина; выделенная жирным Q является ожидаемой N-концевой пироглутаминовой кислотой.

На фиг. 22 представлено схематическое изображение, на котором виден сниженный риск иммуногенности при коррекции к последовательности зародышевого типа. 24H4 (WT) в каркасных участках содержит пять аминокислот, отличных от аминокислот последовательности зародышевого типа, как указано на схематическом изображении.

На фиг. 23A-23C показана оптимизация Ab1. Были отобраны оптимизированные кандидаты, которые специфически связывались с промиостатином, что в результате дало десятки клонов с увеличенной аффинностью. Проводили FACS для демонстрации увеличенного связывания клонов дрожжей (фиг. 23B) относительно Ab1 (фиг. 23A). На фиг. 23C показано, что варианты со зрелой аффинностью также имеют более низкую скорость диссоциации по Octet.

На фиг. 24A, 24B показаны результаты выравнивания последовательностей переменных участков тяжелой цепи (фиг. 24A) и переменных участков легкой цепи (фиг. 24B) исходного Ab1 с вариантами с оптимизированной аффинностью Ab3 и Ab5. Идентификаторы последовательностей сверху вниз соответствуют SEQ ID NO: 24, 26, 28 (фиг. 24A). Идентификаторы последовательностей сверху вниз соответствуют SEQ ID NO: 30, 32, 34 (фиг. 24B). Определяющие комплементарность участки (CDR) определены с помощью номенклатуры по Kabat (подчеркнутая) и IMGT (жирным шрифтом). Замены относительно исходного Ab1 показаны светло-серыми.

На фиг. 25 показана экспрессия промиостатина и латентного миостатина в мышце и в плазме от нормальных и атрофических мышечей.

На фиг. 26 показаны результаты количественной оценки изменений промиостатина и латентного миостатина в мышце и в плазме. Столбцами слева направо показаны промиостатин, латентный миостатин, промиостатин, латентный миостатин и латентный миостатин.

На фиг. 27 показано, что Ab2 характерным образом распознает промиостатин и латентный миостатин, связываясь с основными формами миостатина как в сыворотке крови, так и в мышце. Вестерн-блоттинг в невозстановительных условиях для продомена (темно-серым) и зрелого фактора роста (светло-серым). Для рекомбинантного промиостатина (rProMyostatin) наблюдали миграцию промиостатина и миостатинового продомена (латентного миостатина) на геле, показано стрелками. В сыворотке крови как Ab2, так и AbMyo связываются с латентным миостатином (бэнд продомена) и несколькими частично процессированными предшественниками, однако только Ab2 распознавало промиостатин (верхний бэнд). В мышце Ab2 осаждало промиостатин, при этом взаимодействие AbMyo с промиостатином в мышечной ткани отсутствовало.

На фиг. 28A, 28B представлена модель потока миостатина в нормальной и атрофической мышце. В нормальной мышце (фиг. 28A) промиостатин вырабатывается в мышце и превращается в латентный миостатин путем расщепления фуриновой протеазой, которое может происходить либо внутри, либо снаружи клетки. Некоторая доля латентного миостатина в мышце затем высвобождается в кровоток, образуя циркулирующий пул латентного миостатина. При атрофии мышцы (фиг. 28B) увеличение активного фактора роста миостатин вызвано повышением уровней промиостатина в мышце и увеличенным превращением латентного миостатина в активный фактор роста. Как следствие, циркулирующий латентный миостатин снижается, поскольку мышечный пул латентного миостатина перенаправляется к формирова-

нию зрелого миоостатина посредством расщепления mTLL2.

На фиг. 29 показаны результаты детекции антитела Ab2 (верхняя линия) и контрольного IgG (нижняя линия) в сыворотке крови крыс, которым была введена доза препарата. Ab2 характеризуется повышенными уровнями в кровотоке по сравнению с контрольным IgG, со средним значением 17,1 мкг/мл Ab2 в сыворотке крови в конце исследования. Уровни Ab2 определяли с помощью набора для ИФА, специфичного к IgG человека, с известными количествами каждого антитела, применяемого в качестве эталонного стандарта.

На фиг. 30А, 30В показаны фармакодинамические эффекты Ab2 у обработанных крыс. На фиг. 30А показано, что у крыс, обработанных Ab2, наблюдали повышенную массу нежировых тканей по сравнению с животными, обработанными контрольным PBS или IgG. Ab2 и IgG вводили внутривенно дозами 10 мг/кг в 0-й день. Массу нежировых тканей измеряли с помощью qNMR (N=8 на группу) на 7-, 14-, 21- и 28-й дни после введения дозы. На фиг. 30В показано, что прямые мышцы бедра и передние большеберцовые мышцы собирали у всех групп в конце исследования (N=8 на группу) и взвешивали для определения массы мышц. У крыс, обработанных посредством Ab2, наблюдали увеличение на 14 и 11% значений массы соответственно прямой мышцы бедра и передней большеберцовой мышцы.

На фиг. 31А, 31В показаны уровни про-/латентного миоостатина у крыс, обработанных посредством Ab2. На фиг. 31А показано, что обработка посредством Ab2 (верхняя линия) увеличивает уровни латентного миоостатина в сыворотке крови крысы в ~20 раз. На фиг. 31В показано, что в мышце крыс (прямой мышце бедра) обработка посредством Ab2 приводит к 1,9-кратному увеличению латентной формы миоостатина. Столбцы слева направо соответствуют промиостатину, латентному миоостатину, промиостатину и латентному миоостатину. Не наблюдали никакого статистически значимого изменения промиостатина в мышце крыс. Эти данные получены в результате количественных анализов вестерн-блоттингом с p=3 образцами на группу.

На фиг. 32 показано, что обработка посредством Ab2 (Ab2) или посредством антитела сравнения (AbMyo) приводит к увеличению массы нежировых тканей в течение первых 7 дней после введения дозы антител. Увеличение показателей массы нежировых тканей эквивалентно для Ab2 и AbMyo до 21-го дня после введения дозы. Однако через 28 дней после введения дозы в группе обработанных посредством AbMyo теряется увеличение показателей массы нежировых тканей, тогда как увеличение показателей в группе обработанных посредством Ab2 сохраняется на протяжении всего периода исследования. Верхняя линия соответствует Ab2, средняя линия соответствует AbMyo, а нижняя линия соответствует контрольному IgG (5 мг/кг).

На фиг. 33 показано, что после однократной 5 мг/кг дозы Ab2 (верхняя линия) или антитела сравнения (AbMyo, нижняя линия) уровни лекарственного средства в сыворотке крови измеряли с помощью ИФА к IgG человека. Лекарственное средство детектировали в сыворотке крови уже через 1 ч после введения дозы, а уровни >1 мкг/мл обоих антител можно было детектировать на протяжении всего периода исследования. Тем не менее Ab2 характеризуется значительно более длительным периодом полужизни и предполагаемой площадью под кривой (AUCINF), чем AbMyo, что свидетельствует о том, что при аналогичных дозах Ab2 характеризуется значительно большим воздействием, чем AbMyo.

На фиг. 34 показано, что миоостатин в сыворотке крови измеряли у мышей, обработанных лекарственным средством, и в контролях с использованием флуоресцентного вестерн-блоттинга. Несмотря на увеличенное воздействие Ab2 в сыворотке крови, уровни латентного миоостатина в сыворотке крови у мышей, обработанных как Ab2, так и AbMyo, были схожими. Эти данные свидетельствуют о том, что уровни циркулирующего свободного лекарственного средства в достаточной степени превышают уровень мишени, чтобы повышенное воздействие Ab2 в сыворотке крови не приводило к большему увеличению циркулирующего латентного миоостатина, в отличие от того, что наблюдают в группе AbMyo. Группы данных слева направо соответствуют IgG, Ab2, AbMyo, IgG, Ab2 и AbMyo.

На фиг. 35А, 35В показано, что относительные уровни латентного миоостатина и промиостатина измеряли в мышечных лизатах мышей с помощью флуоресцентного вестерн-блоттинга. На фиг. 35А показано, что латентный миоостатин повышен как в обработанных посредством Ab2, так и в обработанных посредством AbMyo мышцах. Тем не менее повышение латентного миоостатина в обработанных посредством AbMyo мышцах возвращается к исходному уровню к 28-му дню, тогда как уровни в обработанных посредством Ab2 мышцах остаются повышенными по меньшей мере до этого момента времени (P<0,003 относительно обработки посредством AbMyo). На фиг. 35В показано, что аналогичную тенденцию наблюдают с промиостатином, хотя различие между обработанными посредством Ab2 и AbMyo группами на 28-й день не является статистически значимым (P=0,068).

На фиг. 36А показаны эффекты обработки посредством Ab2 на массу и функциональность мышц у мышей.

На фиг. 36В показаны эффекты обработки посредством Ab2 на способность производить максимальное усилие у мышей.

Подробное раскрытие настоящего изобретения

Миостатин является представителем суперсемейства TGF β и принадлежит к подсемейству, включающему двух представителей: миоостатин (также известный как GDF8) и GDF11. Наряду с другими

представителями суперсемейства TGF β , как миостатин, так и GDF11 изначально экспрессируются в виде неактивных полипептидов-предшественников (называемых соответственно промиостатином и proGDF11). Доменная структура и номенклатура показаны на фиг. 1А. На фиг. 1В показана анимационная модель общей структуры промиостатина, в которой зрелый фактор роста удерживается запертым в клетке, состоящей из двух альфа спиралей, соединенных с помощью петли, называемой "лассо латентности".

Активация и высвобождение зрелого фактора роста осуществляются с помощью нескольких отдельных событий протеазного расщепления, обозначенных на фиг. 2. Первый этап расщепления промиостатина и proGDF11 осуществляется с участием пропротеиновой конвертазы, которая производит разрез по консервативному сайту RXXR между продомом и зрелым фактором роста. Это расщепление создает латентный комплекс, в котором зрелый фактор роста защищен продомом от связывания с его рецепторами. Активация и высвобождение зрелого активного фактора роста миостатин осуществляется после расщепления дополнительной протеазой из семейства BMP/толлоидных протеаз, такой как mTLL-2 (фиг. 2).

Ниже приведены иллюстративные последовательности proGDF8 у человека, крысы, мыши и яванского макака. В этих последовательностях proGDF8 сайт расщепления пропротеиновой конвертазой выделен жирным шрифтом, а сайт толлоидной протеазы обозначается подчеркиванием. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления сайт расщепления пропротеиновой конвертазы содержит аминокислотные остатки 240-243 из SEQ ID NO: 52-55. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления сайт толлоидной протеазы содержит аминокислотные остатки 74-75 из SEQ ID NO: 52-55. Следует понимать, что приведенные в настоящем документе иллюстративные последовательности proGDF8 не подразумеваются как ограничивающие, и в объем настоящего изобретения входят дополнительные последовательности proGDF8 от других видов, в том числе любые их изоформы.

proGDF8 (человека):

NENSEQKENVEKEGLCNACTWRQNTKSSRIEAIKIQILSKLRLETAPNISKDVIRQLLPKA
PPLRELIDQYDVQRDDSSDGSLEDDDYHATTETITMPTESDFLMQVDGKPKCCFFKFSS
KIQYNKVVKAKLWIYLRPVETPTTVFVQILRLIKPMKDGTRYTGIRSLKLDMPGTGIW
QSIDVKTVLQNWLKQPESNLGIEIKALDENGHDLAVTFPGPGEDGLNPFLEVKVTDTPK
RSRRDFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYKANYCSGECEVFVLQKY
PHTHLVHQANPRGSAGPCCTPTKMSPINMLYFNGKEQIIYGKIPAMVVDRCGCS (SEQ
ID NO: 52).

proGDF8 (крысы):

NEDSREANVEKEGLCNAACAWRQNTSYSRIEAIKIQILSKLRLETAPNISKDAIRQLLPRA
PPLRELIDQYDVQRDDSSDGSLEDDDYHATTETITMPTESDFLMQADGKPKCCFFKFSS
KIQYNKVVKAKLWIYLRVKTPTTVFVQILRLIKPMKDGTRYTGIRSLKLDMPGTGIW
QSIDVKTVLQNWLKQPESNLGIEIKALDENGHDLAVTFPGPGEDGLNPFLEVKVTDTPK
RSRRDFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYKANYCSGECEVFVLQKY
PHTHLVHQANPRGSAGPCCTPTKMSPINMLYFNGKEQIIYGKIPAMVVDRCGCS (SEQ
ID NO: 53).

proGDF8 (мыши):

NEGSREENVKEKEGLCNAACAWRQNTSYSRIEAIKIQILSKLRLETAPNISKDAIRQLLPRA
PPLRELIDQYDVQRDDSSDGSLEDDDYHATTETITMPTESDFLMQADGKPKCCFFKFSS
KIQYNKVVKAKLWIYLRPVKTPTTVFVQILRLIKPMKDGTRYTGIRSLKLDMPGTGIW
QSIDVKTVLQNWLKQPESNLGIEIKALDENGHDLAVTFPGPGEDGLNPFLEVKVTDTPK
RSRRDFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYKANYCSGECEVFVLQKY
PHTHLVHQANPRGSAGPCCTPTKMSPINMLYFNGKEQIIYGKIPAMVVDRCGCS (SEQ
ID NO: 54).

proGDF8 (яванского макака):

NENSEQKENVEKEGLCNACTWRQNTKSSRIEAIKIQILSKLRLETAPNISKDAIRQLLPKA
PPLRELIDQYDVQRDDSSDGSLEDDDYHATTETITMPTESDFLMQVDGKPKCCFFKFSS
KIQYNKVVKAKLWIYLRPVETPTTVFVQILRLIKPMKDGTRYTGIRSLKLDMPGTGIW
QSIDVKTVLQNWLKQPESNLGIEIKALDENGHDLAVTFPGPGEDGLNPFLEVKVTDTPK
RSRRDFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWDWIIA (SEQ ID NO: 55).

Миостатин и GDF11 обладают относительно высокой степенью консервативности в их доменах зрелой формы фактора роста с идентичностью 90%, но далеко не такой высокой консервативностью в участках их продоменов с идентичностью аминокислот у них менее 50%. Миостатин и GDF11 связываются и передают сигнал через одни и те же рецепторы, состоящие из рецептора I типа (ALK4/5) в ассоциации с рецептором II типа (ACTRIIA/B). Связывание миостатина с рецепторами I типа и II типа инициирует сигнальный каскад, приводящий к фосфорилированию SMAD и транскрипционной активации генов атрофии мышц. Относительно высокая степень консервативности зрелых факторов роста затрудняет поиск реагентов, таких как моноклональные антитела, которые могут различать зрелый миостатин и GDF11.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее изобретение относится к антителам про-/латентного миостатина, которые специфически связываются с химерной конструкцией, которая содержит домен фактора роста и N-концевую часть пропептида GDF11 и C-концевую часть пропептида GDF8. Эту химерную конструкцию, как изложено ниже, называют GDF11 Arm8.

> GDF11Arm8 (SEQ ID NO: 65)

```
MDMRVPAQLLGLLLWFSGVLGDYKDDDDKNNNNHHLEVLFGQPAEGPAAAAA
AAAAAGVGGERSSRPAPSVAPDPGCPVCVWRQHSRELRESIKSQILSKRLKEAPNIS
REVVKQLLPKAPPLRELIDQYDVQRDDSSDGSLEDDDYHATTETITMPTESDFLMQVD
GKPKCCFFKFSSKIQYNKVVKAKLWIYLRPVETPTTVFVQILRLIKPMKDGRYTGIRSL
KLDMPGTGIWQSIDVKTVLQNWKLQPNLGLGIEIKALDENGHDLAVTFPGPGEDGLNP
FLEVKVTDTPKRSRRNLGLDCDEHSSERCCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYKANYCS
GQCEYMFQMOKYPHTHLVQANPRGSAGPCCTPTKMSPINMLYFNDKQQIYGKIPGMV
VDRCGCS
```

Роль миостатина в миопатиях.

Скелетные мышцы составляют примерно 40% массы тела и являются динамическим органом, восстанавливающимся со скоростью 1-2% в день. Атрофия мышц представляет собой жестко регулируемый катаболический процесс, который имеет место в периоды дисфункции (например, дисфункциональная атрофия) и/или в ответ на усиленное системное воспаление (кахексия). При дисфункциональной атрофии, которая может иметь место при длительных периодах иммобилизации, таких как во время постельного режима, дистрофия мышечной ткани происходит быстро. Например, во время госпитализации в течение одной недели в среднем пациент теряет ~1,3 кг массы мышц.

Атрофия мышц обуславливает значительную заболеваемость в широком спектре клинических состояний. При заболеваниях денервации, таких как амиотрофический боковой склероз (ALS) или спинальная мышечная атрофия (SMA), и генетических заболеваниях, в том числе мышечных дистрофиях, потеря силы и функциональности мышц являются клиническими проявлениями с высокой степенью инвалидизации, для которых не существует адекватных видов лечения. При кахектическом синдроме, вызванном почечной недостаточностью, СПИДом, сердечными заболеваниями или злокачественной опухолью, мышечная атрофия зачастую отрицательно влияет на успешное лечение первичного состояния. Дистрофия мышечной ткани также является результатом естественного процесса старения и в наиболее тяжелой форме классифицируется как саркопения, широко распространенное состояние среди пожилых людей, которое все чаще признается требующей вмешательства патологией. Наконец, основной причиной атрофии мышц является дисфункция. Иммобилизация вызывает быструю и значительную дистрофию мышечной ткани при большой группе состояний, таких как перелом шейки бедра, элективная замена сустава, повреждение спинного мозга, критическое состояние при миопатии и инсульт. Несмотря на то, что они различны по своей природе, эти показания имеют общую характеристику - слабость мышц, что приводит к значительной недееспособности, длительной физической реабилитации и периодам восстановления и ухудшению качества жизни.

Все еще существует неудовлетворенная медицинская потребность при состояниях, относящихся к атрофии мышц. Следовательно, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее изобретение относится к описываемым в настоящем документе способам лечения атрофии мышц. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления способы по настоящему изобретению относятся к лечению первичной миопатии. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления способы по настоящему изобретению относятся к лечению вторичной миопатии, такой как, например, заболевания денервации, генетическая мышечная атрофия и кахексия, состояния, при которых дистрофия мышечной ткани является вторичной на фоне связанной с заболеванием патологии. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления предлагаемые настоящим изобретением способы лечения различных форм первичной миопатии, таких как дисфункциональная атрофия (например, ассоциированная с переломом шейки бедра или повреждением спинного мозга (SCI)), приводят в результате к увеличению массы, силы и функциональности мышц у субъекта.

Ингибирование метаболического пути миостатина.

Существует несколько антагонистов метаболического пути миостатина на разных стадиях клиниче-

ских испытаний, предназначенных для лечения мышечных состояний. Такие антагонисты пути целенаправленно воздействуют либо на зрелый фактор роста, либо на его рецептор II типа, и большинство оказывают антагонизирующее действие на передачу сигналов с участием множества представителей семейства TGF β . Например, ряд современных клинических кандидатов блокирует дополнительные факторы роста, такие как активин A, GDF11 и BMP 9 и 10, которые соответственно являются регуляторами репродуктивной биологии, заживления ран, эритропоэза и образования кровеносных сосудов. Аспекты настоящего изобретения относятся к признанию того, что блокировка этих факторов, помимо миостатина, потенциально будет ограничивать количество пациентов, которые могут безопасно пройти терапию, из-за неприемлемых побочных эффектов.

Соответственно, настоящее изобретение относится к антителам, способным связываться с промиостатином и/или латентным миостатином, тем самым ингибируя активность миостатина, и к их применениям для лечения заболеваний и нарушений, ассоциированных с миопатией. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления с учетом распространенности латентного комплекса в кровотоке настоящее изобретение относится к способам лечения, которые специфически нацелены на более распространенные и более долгоживущие предшественники миостатина, например, промиостатин и латентный миостатин, а не на зрелый фактор роста. Без привязки к какой-либо конкретной теории, представленные в настоящем документе антитела могут предупреждать протеолитическую активацию промиостатина и/или латентного миостатина в зрелый миостатин, который считается "активной" формой миостатина, способной активировать метаболический путь миостатина, например, путем связывания рецепторов I типа (ALK4/5) и II типа (ACR11A/B).

Применяемый в контексте настоящего документа термин "про-/латентный миостатин" относится к промиостатину, латентному миостатину или как к первому, так и ко второму. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело к про-/латентному миостатину специфически связывается с промиостатином. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело к про-/латентному миостатину специфически связывается с латентным миостатином. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело к про-/латентному миостатину специфически связывается как с латентным миостатином, так и с промиостатином. Следует понимать, что "латентный миостатин" и "промиостатин" также в настоящем документе соответственно могут называться "латентным GDF8" и "proGDF8".

Применяемый в контексте настоящего документа термин "зрелый миостатин" относится к зрелой, биологически активной форме миостатина. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления зрелый миостатин способен связывать и/или активировать рецептор миостатина. Активация и высвобождение зрелого миостатина *in vivo* из его промиостатиновой формы осуществляется в ходе нескольких отдельных событий расщепления протеазами. В первую очередь "промиостатин" расщепляется пропротеиновой конвертазой, что приводит в результате к образованию "латентного миостатина", в котором зрелый миостатин защищен от связывания с его рецепторами частью продомена. Активация и высвобождение зрелого миостатина осуществляется после расщепления латентного миостатина дополнительной протеазой из семейства BMP/толлоидных протеаз, такой как mTLL-2. См., например, фиг. 1A, 1B и 2. Применяемый в контексте настоящего документа термин "зрелый миостатин" может относиться как к полноразмерному зрелому миостатину, так и к фрагментам полноразмерного зрелого миостатина, которые сохраняют биологическую активность. Иллюстративные последовательности зрелого миостатина, их варианты и способы получения зрелого миостатина хорошо известны из уровня техники и описаны более подробно в настоящем документе.

Термин "промиостатин", также известный как "proGDF8", относится к неактивному предшественнику зрелого миостатина, который содержит связанный дисульфидными связями гомодимер, причем каждая молекула гомодимера содержит аминоконцевой продомен, ковалентно связанный с карбоксиконцевым доменом зрелого миостатина. В соответствии с одним вариантом осуществления "промиостатин" не был расщеплен ни пропротеиновой конвертазой, ни протеазой из семейства BMP/толлоидных протеаз. Иллюстративные последовательности промиостатина, их варианты и способы получения промиостатина хорошо известны из уровня техники и описаны более подробно в настоящем документе.

Применяемый в контексте настоящего документа термин "латентный миостатин" относится к неактивному предшественнику зрелого миостатина, который содержит связанный дисульфидными связями гомодимер, причем каждая молекула гомодимера содержит аминоконцевой продомен, нековалентно связанный с карбоксиконцевым доменом зрелого миостатина. В соответствии с одним вариантом осуществления "латентный миостатин" образуется из промиостатина, который был расщеплен пропротеиновой конвертазой, но который не был расщеплен протеазой из семейства BMP/толлоидных протеаз. В соответствии с другим вариантом осуществления "латентный миостатин" может быть получен путем объединения продомена и карбоксиконцевого домена зрелого миостатина *in vitro* и обеспечения им возможности прохождения надлежащего фолдинга. См., например, Sengle et al., J. Biol. Chem., 286(7):5087-5099, 2011. Иллюстративные последовательности латентного миостатина, их варианты и способы получения латентного миостатина хорошо известны из уровня техники и описаны более подробно в настоящем документе.

Применяемый в контексте настоящего документа термин "про-/латентный миостатин" относится к

промиостатину, латентному миостатину или и как к промиостатину, так и к латентному миостатину. В соответствии с одним вариантом осуществления раскрываемое в настоящем документе антитело связывается с промиостатином. В соответствии с другим вариантом осуществления раскрываемое в настоящем документе антитело связывается с латентным миостатином. В соответствии с другим вариантом осуществления раскрываемое в настоящем документе антитело связывается с промиостатином и латентным миостатином.

Применяемый в контексте настоящего документа термин "чистый промиостатин" или "чистый про-GDF8" относится к композиции, содержащей промиостатин, который не содержит или практически не содержит других форм миостатина, таких как латентный миостатин и зрелый миостатин. В соответствии с одним вариантом осуществления раскрываемое в настоящем документе антитело специфически связывается с чистым промиостатином. Иными словами, такое антитело связывается с промиостатином в композиции, которая не содержит других форм миостатина, т.е. латентного миостатина и зрелого миостатина.

Применяемый в контексте настоящего документа термин "сайт расщепления пропротеиновой конвертазой" относится к сайту, в котором промиостатин расщепляется пропротеиновой конвертазой. В соответствии с одним вариантом осуществления сайт расщепления пропротеиновой конвертазой является консервативным сайтом RXXR между продоменом и биологически активным доменом или зрелым миостатином. См., например, фиг. 1A, 1B и 2.

Применяемый в контексте настоящего документа термин "сайт расщепления протеазой семейства BMP/толлоидных протеаз" относится к сайту, в котором латентный миостатин расщепляется представителем семейства BMP/толлоидных протеаз. В соответствии с одним вариантом осуществления представителем семейства BMP/толлоидных протеаз является mTLL-2. См., например, фиг. 1A, 1B и 2.

Антитела, которые связывают про-/латентный миостатин.

В основе настоящего изобретения лежит по меньшей мере частично неожиданное открытие того, что некоторые специфичные к про-/латентному миостатину антитела (например, антитело, называемое в настоящем документе Ab1) предупреждали протеолитическую активацию про-/латентного миостатина в зрелый миостатин. Кроме того, ингибирование активации миостатина с помощью таких антител было эффективным для увеличения массы мышц как в индуцированной дексаметазоном, так и в индуцированной иммобилизацией мышшиной модели атрофии мышц. Аспекты настоящего изобретения относятся к антителам (например, антителам и антигенсвязывающим фрагментам), которые связываются с про-/латентным миостатином и ингибируют протеолитическую активацию про-/латентного миостатина в зрелый миостатин.

Антитело (взаимозаменяемо используемое во множественной форме) представляет собой молекулу иммуноглобулина, способную специфически связываться с мишенью, такой как углевод, полинуклеотид, липид, полипептид и т.д., по меньшей мере в одном антигенраспознающем сайте, локализованном в вариабельном участке молекулы иммуноглобулина. Применяемый в контексте настоящего документа термин "антитело" охватывает не только интактные (например, полноразмерные) поликлональные или моноклональные антитела, но также их антигенсвязывающие фрагменты (такие как Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), одноцепочечные (scFv), их мутанты, слитые белки, содержащие антительную часть, гуманизированные антитела, химерные антитела, диатела, линейные антитела, одноцепочечные антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела) и любую другую модифицированную конфигурацию молекулы иммуноглобулина, которая содержит антигенраспознающий сайт требуемой специфичности, включая варианты гликозилирования антител, варианты аминокислотных последовательностей антител и ковалентно модифицированные антитела. К антителу относится антитело любого класса, такого как IgD, IgE, IgG, IgA или IgM (или его подкласса), и антитело необязательно должно относиться к какому-либо определенному классу. В зависимости от аминокислотной последовательности константного домена тяжелых цепей антитела, иммуноглобулина можно отнести к различным классам. Существует пять основных классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них могут быть дополнительно разделены на подклассы (изотипы), например, IgG₄, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂. Константные домены тяжелой цепи, которые соответствуют различным классам иммуноглобулинов, соответственно называются альфа, дельта, эpsilon, гамма и мю. Хорошо известны структуры субъединиц и трехмерные конфигурации различных классов иммуноглобулинов.

Применяемое в контексте настоящего документа выражение "выделенное антитело" предназначено для обозначения антитела, которое практически не содержит других антител с другими антигенными специфичностями (например, выделенное антитело, которое специфически связывается с про-/латентным миостатином практически не содержит антител, которые специфически связывают антигены, отличные от про-/латентного миостатина). Выделенное антитело, которое специфически связывает про-/латентный миостатин, может, тем не менее, иметь перекрестную реактивность с другими антигенами, такими как молекулы про-/латентного миостатина от других видов. Кроме того, выделенное антитело может практически не содержать других клеточных материалов и/или химических веществ.

Применяемый в контексте настоящего документа термин "человеческое антитело" предназначен для включения антител, имеющих вариабельные и константные участки, полученные из последователь-

ностей иммуноглобулинов зародышевого типа человека и их фрагментов. Человеческие антитела по настоящему изобретению могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина зародышевого типа человека (например, мутации, введенные случайным или сайт-специфическим мутагенезом *in vitro* или в результате соматической мутации *in vivo*), например, в CDR и, в частности, CDR3. Тем не менее применяемый в контексте настоящего документа термин "человеческое антитело" не предназначен для включения антител, у которых последовательности CDR, полученные от последовательности зародышевого типа млекопитающего другого вида, такого как мышь, были привиты на человеческие каркасные последовательности.

Термин "эпитоп" включает в себя любую полипептидную детерминанту, способную специфически связываться с рецептором иммуноглобулина или Т-клеток. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антигенные детерминанты включают химически активные поверхностные группировки молекул, такие как аминокислоты, сахарные боковые цепи, фосфорил или сульфонил, и, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, могут иметь конкретные трехмерные структурные характеристики и/или характеристики удельного заряда. Эпитоп представляет собой участок антигена, который связывается антителом. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления говорят, что антитело специфически связывает антиген, если оно преимущественно распознает свой целевой антиген в сложной смеси белков и/или макромолекул.

Описанные в настоящем документе антитела способны связываться с про-/латентным миостатином, таким образом ингибируя протеолитическую активацию про-/латентного миостатина в зрелый миостатин. В некоторых случаях описанные в настоящем документе антитела могут ингибировать протеолитическую активацию про-/латентного миостатина по меньшей мере на 20%, например, на 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95% или выше. В некоторых случаях описанные в настоящем документе антитела могут ингибировать протеолитическое расщепление промиостатина пропротеиновой конвертазой (например, фурином) по меньшей мере на 20%, например, на 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95% или выше. В некоторых случаях описанные в настоящем документе антитела могут ингибировать протеолитическое расщепление промиостатина или латентного миостатина толлоидной протеазой (например, mTLL2) по меньшей мере на 20%, например, на 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95% или выше. Ингибирующую активность антитела к про-/латентному миостатину можно измерить с помощью стандартных способов, например с помощью вестерн-блоттинга, как описано в примере 1 и на фиг. 3. Тем не менее следует понимать, что для измерения ингибирующей активности антитела к про-/латентному миостатину на протеолитическое расщепление про-/латентного миостатина можно применять дополнительные способы. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ингибирование расщепления про-/латентного миостатина (например, с помощью пропротеиновой конвертазы и/или толлоидной протеазы) можно отразить в виде константы ингибирования (K_i), которая является показателем ингибирующей силы и которая представляет собой концентрацию ингибитора (например, антитела к про-/латентному миостатину), необходимую для уменьшения активности протеазы (например, пропротеиновой конвертазы или толлоидной протеазы) наполовину и не зависит от концентраций фермента или субстрата.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления пропротеиновая конвертаза содержит (i) каталитический домен, который гидролизует пептидную связь белка, содержащего сайт расщепления пропротеиновой конвертазой, и (ii) карман связывания, который связывается с rTGF посредством сайта расщепления пропротеиновой конвертазой. К примерам пропротеиновых конвертаз для применения в соответствии с настоящим раскрытием относятся, без ограничения, PCSK5/6, PACE4, PACE7 и PACE3 (например, фурин). Пропотеиновую конвертазу в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, получают от любого млекопитающего, включая, без ограничения, людей, обезьян или грызунов (например, мышей, крыс, хомяков).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления пропротеиновая конвертаза гомологична пропротеиновой конвертазе, выбранной из группы, состоящей из: PCSK5/6, PACE4, PACE7 и PACE3 (например, фурина). Например, пропротеиновая конвертаза может быть по меньшей мере на 70% идентичной, по меньшей мере на 80% идентичной, по меньшей мере на 90% идентичной, по меньшей мере на 95% идентичной, по меньшей мере на 96% идентичной, по меньшей мере на 97% идентичной, по меньшей мере на 98% идентичной, по меньшей мере на 99% идентичной, по меньшей мере на 99,5% идентичной или по меньшей мере приблизительно на 99,9% идентичной PCSK5/6, PACE4, PACE7 или PACE3 (например, фурину).

Сайт расщепления пропротеиновой конвертазой в соответствии с некоторыми вариантами осуществления является аминокислотной последовательностью, которая может расщепляться пропротеиновой конвертазой (например, PCSK5/6, PACE4, PACE7 и PACE3). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления сайт расщепления пропротеиновой конвертазой содержит аминокислотную последовательность R-X-X-R, где R является аргинином, а X является любой аминокислотой. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления сайт расщепления пропротеиновой конвертазой содержит аминокислотную последовательность R-X-(K/R)-R, где R является аргинином, K является лизином, а X является любой аминокислотой. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления сайт расщепления пропротеиновой конвертазой содержит аминокислотную последовательность, которая представляет со-

бой R-V-R-R (SEQ ID NO: 57), где R является аргинином, V является валином. Иллюстративные сайты расщепления пропротеиновой конвертазой для миостатина человека, крысы, мыши и яванского макака показаны жирным в SEQ ID NO: 52-55. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления сайт расщепления пропротеиновой конвертазой содержит аминокислотную последовательность RSRR (SEQ ID NO: 56).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления к толлоидным протеазам для применения в соответствии с настоящим раскрытием относятся, без ограничения, BMP-1, mTLL-1 и mTLL-2. Толлоидную протеазу можно получить от любого млекопитающего, в том числе, без ограничения, людей, обезьян или грызунов (например, мышей, крыс, хомяков). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления толлоидная протеаза гомологична толлоидной протеазе, выбранной из группы, состоящей из BMP-1, mTLL-1 и mTLL-2. Например, толлоидная протеаза может быть по меньшей мере на 70% идентичной, по меньшей мере на 80% идентичной, по меньшей мере на 90% идентичной, по меньшей мере на 95% идентичной, по меньшей мере на 96% идентичной, по меньшей мере на 97% идентичной, по меньшей мере на 98% идентичной, по меньшей мере на 99% идентичной, по меньшей мере на 99,5% идентичной или по меньшей мере приблизительно на 99,9% идентичной BMP-1, mTLL-1 и mTLL-2.

Сайт расщепления толлоидной протеазой в соответствии с некоторыми вариантами осуществления представляет собой аминокислотную последовательность, которая может расщепляться толлоидной протеазой (например, BMP-1, mTLL-1 и mTLL-2). Иллюстративные сайты расщепления толлоидной протеазой для миостатина человека, крысы, мыши и яванского макака показаны подчеркнутыми в SEQ ID NO: 52-55. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления сайт расщепления толлоидной протеазой содержит аминокислотную последовательность QR, где Q является глутамином, а R является аргинином.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления описанные в настоящем документе антитела способны связываться с про-/латентным миостатином, таким образом ингибируя активность миостатина. В некоторых случаях описанные в настоящем документе антитела могут ингибировать активацию передачи сигнала с участием миостатина по меньшей мере на 20%, например, на 30, 40, 50, 60, 70%, 80, 90, 95% или выше. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ингибирование передачи сигналов с участием миостатина можно измерить стандартными способами, например, с помощью анализа активации миостатина, который описан в примере 1. Тем не менее следует понимать, что для измерения активации передачи сигналов с участием миостатина можно применять дополнительные способы.

Следует понимать, что степень протеолитического расщепления миостатина, например пропротеиновой конвертазой и/или толлоидной протеазой, можно измерить и/или количественно определить с помощью любого подходящего способа. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления степень протеолитического расщепления миостатина измеряют и/или количественно определяют с помощью твердофазного иммуоферментного анализа (ИФА). Например, ИФА можно применять для измерения уровня высвобожденного фактора роста (например, зрелого миостатина). В качестве другого примера антитело, которое специфически связывается с промиостатином, латентным миостатином и/или зрелым миостатином, можно применять в ИФА для измерения уровня конкретной формы миостатина (например, про-/латентного/зрелого миостатина) с целью количественного определения степени протеолитического расщепления миостатина. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления степень протеолитического расщепления миостатина измеряют и/или количественно определяют с помощью иммуопреципитации с последующим электрофорезом в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия или масс-спектрометрией триптических пептидов, методик на основе анизотропии флуоресценции, FRET-анализов, масс-спектрометрии с водородно-дейтериевым обменом и/или ЯМР-спектроскопии.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитела, также известные как иммуноглобулины, являются тетрамерными гликозилированными белками, состоящими из двух легких (L) цепей массой примерно 25 кДа каждая и двух тяжелых (H) цепей массой примерно 50 кДа каждая. В антителах можно обнаружить два типа легкой цепи, называемые лямбда и каппа. В зависимости от аминокислотной последовательности константного домена тяжелых цепей, иммуноглобулины можно отнести к пяти основным классам: A, D, E, G и M, и несколько из них можно дополнительно разделить на подклассы (изотипы), например, IgG₄, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂. Каждая легкая цепь обычно включает N-концевой варибельный (V) домен (V_L) и константный (C) домен (C_L). Каждая тяжелая цепь обычно включает N-концевой V домен (V_H), три или четыре C-домена (C_H1-3) и шарнирный участок. C_H домен, наиболее близкий к V_H, обозначают C_H1. V_H и V_L домены состоят из четырех участков относительно консервативных последовательностей, называемых каркасными участками (FR1, FR2, FR3 и FR4), которые образуют каркас для трех участков гиперварибельных последовательностей (определяющих комплементарность участков, CDR). CDR содержат большинство остатков, отвечающих за специфические взаимодействия антитела с антигеном. CDR называют CDR1, CDR2 и CDR3. Соответственно, CDR-компоненты на тяжелой цепи называют CDRH1, CDRH2 и CDRH3, в то время как CDR-компоненты на легкой цепи называют CDRL1, CDRL2 и CDRL3. CDR обычно относятся к CDR по Kabat, как описано в Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services (1991), eds.

Kabat et al. Другим стандартом характеристики антигенсвязывающего сайта является ссылка на гипервариабельные петли, как описано у Chothia. См., например, Chothia, D. et al. (1992), J. Mol. Biol. 227:799-817 и Tomlinson et al. (1995), EMBO J. 14:4628-4638. Еще одним стандартом является AbM-определение, используемое программным обеспечением для моделирования антител AbM от Oxford Molecular. См. в целом, например, Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains. B: Antibody Engineering Lab Manual (Ed.: Duebel, S., and Kontermann, R., Springer-Verlag, Heidelberg). Варианты осуществления, описываемые относительно CDR по Kabat, альтернативно можно реализовать с помощью аналогично описываемых соотношений относительно гипервариабельных петель по Chothia или относительно AbM-петель или комбинаций любого из этих способов.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитела к про-/латентному миостатину по настоящему изобретению и молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, которые кодируют антитела, включают аминокислотные последовательности CDR, показанные в табл. 1.

Таблица 1

Антитело	CDRH1 (SEQ ID NO: 1-3)	CDRH2 (SEQ ID NO: 4-9)	CDRH3 (SEQ ID NO: 10-11)	CDRL1 (SEQ ID NO: 12-17)	CDRL2 (SEQ ID NO: 18-21)	CDRL3 (SEQ ID NO: 22-23)
Ab1 Kabat: IMGT:	SSYGMH (SEQ ID NO: 1) GFTFSSYGMH (SEQ ID NO: 2)	VISYDGSNKYY ADSVKG (SEQ ID NO: 4) ISYDGSN (SEQ ID NO: 5)	DLLVRFLEWSH YYGMDV (SEQ ID NO: 10)	SGSSNIGSNTV H (SEQ ID NO: 12) SSNIGSNT (SEQ ID NO: 13)	SDNQRPS (SEQ ID NO: 18) SDN (SEQ ID NO: 19)	AAWDDSLNGV (SEQ ID NO: 22)
Ab3 Kabat: IMGT:	SSYGMH (SEQ ID NO: 1) GFAFSSYGMH (SEQ ID NO: 3)	VISYDGSIKYYA DSVKG (SEQ ID NO: 6) ISYDGSN (SEQ ID NO: 7)	DLLVRFLEWSH KYGMDV (SEQ ID NO: 11)	SGTSNIGSNTV H (SEQ ID NO: 14) TSNIGSNT (SEQ ID NO: 15)	SDDQRPS (SEQ ID NO: 20) SDD (SEQ ID NO: 21)	AAWDESLNGV (SEQ ID NO: 23)
Ab5 Kabat: IMGT:	SSYGMH (SEQ ID NO: 1) GFAFSSYGMH (SEQ ID NO: 3)	VISYDGNKYY ADSVKG (SEQ ID NO: 8) ISYDGNN (SEQ ID NO: 9)	DLLVRFLEWSH KYGMDV (SEQ ID NO: 11)	SGSSNIGGNTV H (SEQ ID NO: 16) SSNIGGNT (SEQ ID NO: 17)	SDDQRPS (SEQ ID NO: 20) SDD (SEQ ID NO: 21)	AAWDESLNGV (SEQ ID NO: 23)

В табл. 1 отдельные последовательности CDRH3 и CDRL3 отображены по системе Kabat и IMGT.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления к средствам, связывающим про-/латентный миостатин (например, антитела), по настоящему изобретению относится любое антитело (в том числе антигенсвязывающий фрагмент), которое включает CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 или CDRL3 или их комбинации, которые представлены для любого из антител, показанных в табл. 1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления средства, связывающие про-/латентный миостатин, включают CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 любого из антител, показанных в табл. 1. Настоящее изобретение также включает любую последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует молекулу, содержащую CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 или CDRL3, которые представлены для любого из антител, показанных в табл. 1. CDR3-домены тяжелой и легкой цепей антитела могут играть особенно важную роль в специфичности/аффинности связывания антитела с антигеном. Соответственно, средства, связывающие про-/латентный миостатин, по настоящему изобретению или их молекулы нуклеиновых кислот могут включать по меньшей мере CDR3 тяжелой и/или легкой цепи антител, которые показаны в табл. 1.

Аспекты настоящего изобретения относятся к моноклональному антителу или антигенсвязывающему фрагменту, который связывается с белком про-/латентного миостатина и который содержит шесть определяющих комплементарность участков (CDR): CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления CDRH1 содержит последовательность, которая изложена под любым из SEQ ID NO: 1-3. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления CDRH2 содержит последовательность, которая изложена под любым из SEQ ID NO: 4-9. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления CDRH3 содержит последовательность, которая изложена под любым из SEQ ID NO: 10-11. CDRL1 содержит последовательность, которая изложена под любым из SEQ ID NO: 12-17. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления CDRL2 содержит последовательность, которая изложена под любым из SEQ ID NO: 18-21. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления CDRL3 содержит последовательность, которая изложена под любым из SEQ ID NO: 22-23.

В соответствии с несколькими вариантами осуществления (например, что касается антитела Ab1 к про-/латентному миостатину, показанному в табл. 1), CDRH1 содержит последовательность, которая изложена под SEQ ID NO: 1 или 2, CDRH2 содержит последовательность, которая изложена под SEQ ID NO: 4 или 5, CDRH3 содержит последовательность, которая изложена под SEQ ID NO: 10, CDRL1 содержит последовательность, которая изложена под SEQ ID NO: 12 или 13, CDRL2 содержит

последовательность, которая изложена под SEQ ID NO: 18 или 19, и CDRL3 содержит последовательность, которая изложена под SEQ ID NO: 22, и антитело связывается с про-/латентным миостатином.

В соответствии с несколькими вариантами осуществления (например, что касается антитела Ab3 к про-/латентному миостатину, показанному в табл. 1), CDRH1 содержит последовательность, которая изложена под SEQ ID NO: 1 или 3, CDRH2 содержит последовательность, которая изложена под SEQ ID NO: 6 или 7, CDRH3 содержит последовательность, которая изложена под SEQ ID NO: 11, CDRL1 содержит последовательность, которая изложена под SEQ ID NO: 14 или 15, CDRL2 содержит последовательность, которая изложена под SEQ ID NO: 20 или 21, и CDRL3 содержит последовательность, которая изложена под SEQ ID NO: 23, и антитело связывается с про-/латентным миостатином.

В соответствии с несколькими вариантами осуществления (например, что касается антитела Ab5 к про-/латентному миостатину, показанному в табл. 1) CDRH1 содержит последовательность, которая изложена под SEQ ID NO: 1 или 3, CDRH2 содержит последовательность, которая изложена под SEQ ID NO: 8 или 9, CDRH3 содержит последовательность, которая изложена под SEQ ID NO: 11, CDRL1 содержит последовательность, которая изложена под SEQ ID NO: 16 или 17, CDRL2 содержит последовательность, которая изложена под SEQ ID NO: 20 или 21, и CDRL3 содержит последовательность, которая изложена под SEQ ID NO: 23, и антитело связывается с про-/латентным миостатином. В нескольких примерах любое из средств, связывающих про-/латентный миостатин (например, антитела), по настоящему изобретению включает любое антитело (в том числе антигенсвязывающий фрагмент), имеющее одну или несколько последовательностей CDR (например, CDRH или CDRL), которые практически аналогичны CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и/или CDRL3. Например, антитела могут включать одну или несколько последовательностей CDR, которые показаны в табл. 1 (SEQ ID NO: 1-23), содержащих до 5, 4, 3, 2 или 1 вариант аминокислотного остатка относительно соответствующего CDR-участка под любым из SEQ ID NO: 1-23. Ниже приведены полная аминокислотная последовательность и последовательность нуклеиновой кислоты для варибельного участка тяжелой цепи и варибельного участка легкой цепи антител, перечисленных в табл. 1.

Варибельный участок тяжелой цепи - исходное Ab1:

QQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNK
YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLLVRFLEWSHYYGMDV
WGQGTITVTVSS (SEQ ID NO: 24)
CAGATCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAG
ACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCG
CCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAAGTA
ATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCA
AGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTAT
TACTGTGCGAGAGATCTCCTGGTGCGATTTTGGAGTGGTCGCACTACTACGGTATG
GACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 38)

Варибельный участок тяжелой цепи - Ab2 зародышевого типа:

QVQLVESGGGVVPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSN
KYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLLVRFLEWSHYYGMD
VWGQGTITVTVSS (SEQ ID NO: 25)
CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAG
ACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCG
CCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAAGTA
ATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCA
AGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTAT
TACTGTGCGAGAGATCTCCTGGTGCGATTTTGGAGTGGTCGCACTACTACGGTATG
GACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 39)

Варибельный участок тяжелой цепи - исходное Ab3:

QQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAASGFAFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSIK
YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLLVRFLEWSHKYGMDV
WGQGTITVTVSS (SEQ ID NO: 26)
CAGATCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAG
ACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTGCCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCG
CCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAAGTA
TCAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCA
AGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTAT
TACTGTGCGAGAGATCTCCTGGTGCGATTTTGGAGTGGTCGACAAAGTACGGTATG
GACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 40)

Вариабельный участок тяжелой цепи - Ab4 зародышевого типа:

QVQLVESGGGVVQPRSLRLSCAASGFAFSSYGMHWVRQAPGKLEWVAVISYDGSIK
YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLLVRFLEWSHKYGMVDV
WGQGTITVTVSS (SEQ ID NO: 27)
CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAG
ACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTGCCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCG
CCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAAGTA
TCAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCA
AGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTAT
TACTGTGCGAGAGATCTCCTGGTGCATTTTTGGAGTGGTCGCACAAGTACGGTATG
GACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 41)

Вариабельный участок тяжелой цепи - исходное Ab5:

QIQLVQSGGGVVQPRSLRLSCAASGFAFSSYGMHWVRQAPGKLEWVAVISYDGNN
KYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLLVRFLEWSHKYGM
VWGQGTITVTVSS (SEQ ID NO: 28)
CAGATCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAG
ACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTGCCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCG
CCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAATA
ATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCA
AGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTAT
TACTGTGCGAGAGATCTCCTGGTGCATTTTTGGAGTGGTCGCACAAGTACGGTATG
GACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 42)

Вариабельный участок тяжелой цепи - Ab6 зародышевого типа:

QVQLVESGGGVVQPRSLRLSCAASGFAFSSYGMHWVRQAPGKLEWVAVISYDGNN
KYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLLVRFLEWSHKYGM
VWGQGTITVTVSS (SEQ ID NO: 29)
CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAG
ACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTGCCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCG
CCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAATA
ATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCA
AGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTAT
TACTGTGCGAGAGATCTCCTGGTGCATTTTTGGAGTGGTCGCACAAGTACGGTATG
GACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 43)

Вариабельный участок легкой цепи - исходное Ab1:

QPVLTQPPSASGTPGQRTVISCSSSNIGSNTVHWYQQLPGTAPKLLIYSDNQRPSGVPD
RFSGSKSGTSASLVISGLQSDDEADYYCAAWDDSLNGVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:
30)
CAGCCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCGGGCAGAGGGTCAC
CATCTCTTGTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAAGTAATACTGTCCACTGGTACCA
GCAACTCCCAGGAACGGCCCCCAAACCTCCTCATCTATAGTGATAATCAGCGCCCCCTC
AGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGTCAT
CAGTGGGTCCAGTCTGACGATGAGGCTGATTATTACTGTGCAGCATGGGATGACA
GCCTGAATGGGGTGTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA (SEQ ID NO: 44)

Вариабельный участок легкой цепи - Ab2 зародышевого типа:

QSVLTQPPSASGTPGQRTVISCSSSNIGSNTVHWYQQLPGTAPKLLIYSDNQRPSGVPD
RFSGSKSGTSASLAISGLQSEADYYCAAWDDSLNGVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 31)
CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCGGGCAGAGGGTCACC
ATCTCTTGTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAAGTAATACTGTCCACTGGTACCA
CAACTCCCAGGAACGGCCCCCAAACCTCCTCATCTATAGTGATAATCAGCGCCCCCTCA
GGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATC
AGTGGGCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCAGCATGGGATGACAG
CCTGAATGGGGTGTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA (SEQ ID NO: 45)

Вариабельный участок легкой цепи - исходное Ab3:

QPVLTQPPSASGTPGQRTVISCSTSNIGSNTVHWYQQLPGTAPKLLIYSDDQRPSGVP
DRFSGSKSGTSASLVISGLQSDDEADYYCAAWDESLNGVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:
32)

CAGCCTGTGCTGACTCAGCCACCCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCAC
CATCTCTTGTCTGGAAGCACCTCCAACATCGGAAGTAATACTGTCCACTGGTACCA
GCAACTCCCAGGAACGGCCCCAACTCCTCATCTATAGTGATGATCAGCGCCCCCTC
AGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGTCAT
CAGTGGGTCCAGTCTGACGATGAGGCTGATTACTGTGCAGCATGGGATGAGA
GCCTGAATGGGGTGTTCCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA (SEQ ID NO: 46)

Вариабельный участок легкой цепи - Ab4 зародышевого типа:

QSVLTQPPSASGTPGQRTVISCSTSNIGSNTVHWYQQLPGTAPKLLIYSDDQRPSGVP
DRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDESLNGVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:
33)

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCAAC
ATCTCTTGTCTGGAAGCACCTCCAACATCGGAAGTAATACTGTCCACTGGTACCAG
CAACTCCCAGGAACGGCCCCAACTCCTCATCTATAGTGATGATCAGCGCCCCCTCA
GGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATC
AGTGGGCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGATTACTGTGCAGCATGGGATGAGAG
CCTGAATGGGGTGTTCCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA (SEQ ID NO: 47)

Вариабельный участок легкой цепи - исходное Ab5:

QPVLTQPPSASGTPGQRTVISCSTSNIGSNTVHWYQQLPGTAPKLLIYSDDQRPSGVP
DRFSGSKSGTSASLVISGLQSDDEADYYCAAWDESLNGVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:
34)

CAGCCTGTGCTGACTCAGCCACCCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCAC
CATCTCTTGTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAGGAAATACTGTCCACTGGTACCA
GCAACTCCCAGGAACGGCCCCAACTCCTCATCTATAGTGATGATCAGCGCCCCCTC
AGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGTCAT
CAGTGGGCTCCAGTCTGACGATGAGGCTGATTACTGTGCAGCATGGGATGAGA
GCCTGAATGGGGTGTTCCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA (SEQ ID NO: 48)

Вариабельный участок легкой цепи - Ab6 зародышевого типа:

QSVLTQPPSASGTPGQRTVISCSTSNIGSNTVHWYQQLPGTAPKLLIYSDDQRPSGVP
DRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDESLNGVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:
35)

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCAAC
ATCTCTTGTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAGGAAATACTGTCCACTGGTACCAG
CAACTCCCAGGAACGGCCCCAACTCCTCATCTATAGTGATGATCAGCGCCCCCTCA
GGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATC
AGTGGGCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGATTACTGTGCAGCATGGGATGAGAG
CCTGAATGGGGTGTTCCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA (SEQ ID NO: 49)

Ab2-тяжелая цепь:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSN
KYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLLVRFLWSHYYGMD
VWQGQTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTKYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCP
PCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF
FLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLG (SEQ ID NO: 50)

Ab2-легкая цепь:

QSVLTQPPSASGTPGQRTVISCSTSNIGSNTVHWYQQLPGTAPKLLIYSDNQRPSGVPD
RFGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTL
FPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPPSKQSNKYAASS
YLSLTPEQWKSHRYSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID NO: 51)

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления к антителам к про-/латентному миостатину по настоящему изобретению относится любое антитело, которое включает вариабельный домен тяже-

лой цепи любой из SEQ ID NO: 24-29 или вариабельный домен легкой цепи любой из SEQ ID NO: 30-35. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления к антителам к про-/латентному миостатину по настоящему изобретению относится любое антитело, которое включает вариабельные части тяжелой цепи и вариабельные части легкой цепи (SEQ ID NO: 24 и 30; 25 и 31; 26 и 32; 27 и 33; 28 и 34 или 29 и 35).

Аспекты по настоящему изобретению относятся к антителам к про-/латентному миостатину, имеющим вариабельную аминокислотную последовательность тяжелой цепи и/или вариабельную аминокислотную последовательность легкой цепи, гомологичную любой из описанных в настоящем документе. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело к про-/латентному миостатину содержит вариабельную последовательность тяжелой цепи или вариабельную последовательность легкой цепи, которая по меньшей мере на 75% (например, на 80, 85, 90, 95, 98 или 99%) идентична вариабельной последовательности тяжелой цепи любой из SEQ ID NO: 24-29 или вариабельной последовательности легкой цепи любой из SEQ ID NO: 30-35. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления гомологичные вариабельные аминокислотные последовательности тяжелой цепи и/или вариабельные аминокислотные последовательности легкой цепи не варьируют в пределах любой из приведенных в настоящем документе последовательностей CDR. Например, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления определенная степень варьирования последовательности (например, 75, 80, 85, 90, 95, 98 или 99%) может иметь место в пределах вариабельной последовательности тяжелой цепи и/или вариабельной последовательности легкой цепи, за исключением любой из представленных в настоящем документе последовательностей CDR.

"Процент идентичности" двух аминокислотных последовательностей определяют с помощью алгоритма Karlin and Altschul Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:2264-68, 1990, модифицированного как у Karlin and Altschul Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:5873-77, 1993. Такой алгоритм включен в программы NBLAST и XBLAST (версии 2.0) Altschul, et al., J. Mol. Biol. 215:403-10, 1990. Белковые запросы поиска в BLAST можно осуществлять с помощью программы XBLAST, score = 50, word length = 3, для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных представляющим интерес белковым молекулам. Если между двумя последовательностями существуют гэпы, можно применять Gapped BLAST, которая описана в работе Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402, 1997. При использовании программ BLAST и Gapped BLAST можно применять параметры по умолчанию соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления в CDR или каркасные последовательности могут быть внесены консервативные мутации в положениях, где остатки маловероятно будут вовлечены во взаимодействие с про-/латентным миостатином, по результатам определения на основе кристаллической структуры. Применяемая в контексте настоящего документа фраза "консервативная аминокислотная замена" относится к аминокислотной замене, которая не изменяет относительный заряд или характеристики размера белка, в которой производят аминокислотную замену. Варианты можно получить в соответствии со способами изменения полипептидной последовательности, известными специалисту в настоящей области техники, такими как те, которые можно найти в источниках, в которых собраны описания таких способов, например, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook, et al., eds., Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989, or Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel, et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., New York. К консервативным заменам аминокислот относятся замены, сделанные среди аминокислот в пределах следующих групп: (a) M, I, L, V; (b) F, Y, W; (c) K, R, H; (d) A, G; (e) S, T; (f) Q, N и (g) E, D.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления представленные в настоящем документе антитела содержат мутации, которые придают антителам требуемые свойства. Например, чтобы избежать потенциальных осложнений из-за обмена Fab-плечами, который, как известно, происходит с нативными mAb IgG₄, представленные в настоящем документе антитела могут содержать стабилизирующую мутацию "Adair" (Angal S., et al., "A single amino acid substitution abolishes the heterogeneity of chimeric mouse/human (IgG₄) antibody," Mol Immunol 30, 105-108; 1993), где серин 228 (нумерация по EU, остаток 241 по нумерации Kabat) преобразован в пролин, что дает в результате IgG₄-подобную (CPPCP (SEQ ID NO: 58)) шарнирную последовательность. Соответственно, любое из антител может включать в себя стабилизирующую мутацию "Adair" или аминокислотную последовательность CPPCP (SEQ ID NO: 58).

Средства, связывающие про-/латентный миостатин, по настоящему изобретению могут необязательно содержать константные участки антитела или их части. Например, V_L-домен может быть присоединен своим С-концом к константному домену легкой цепи, такому как С_κ или С_λ. Аналогично, V_H-домен или его часть могут быть присоединены ко всей или части тяжелой цепи, такой как IgA, IgD, IgE, IgG и IgM и любой подкласс изотипа. Антитела могут включать подходящие константные участки (см., например, Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, No. 91-3242, National Institutes of Health Publications, Bethesda, Md. (1991)). Следовательно, антитела, входящие в объем настоящего изобретения, могут включать V_H- и V_L-домены или их антигенсвязывающую часть в сочетании с любыми подходящими константными участками.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления V_H - и/или V_L -домены могут быть обращены в последовательность зародышевого типа, например FR этих доменов подвергают мутации с использованием традиционных методик молекулярной биологии для приведения их в соответствие с FR, производимыми клетками зародышевого типа. Например, V_H - и/или V_L -домены могут быть обращены в последовательность зародышевого типа соответственно IgHV3-30 (SEQ ID NO: 36) и/или IgLV1-44 (SEQ ID NO: 37). Следует понимать, что любой из V_H - и/или V_L -доменов может быть обращен в любую подходящую последовательность зародышевого типа. В соответствии с другими вариантами осуществления последовательности FR остаются отличными от консенсусных последовательностей зародышевого типа.

IgHV3-30

QVQLVESGGGVVQPGRSRLSCLASASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSN

KYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRADTAVYYCAR (SEQ ID NO: 36)

IgLV1-44

QSVLTQPPSASGTPGQRTVISCSSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPD

RFGSGSKGTSASLAISGLQSEADYYCAAWDDSLNG (SEQ ID NO: 37)

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитела к про-/латентному миостатину или антигенсвязывающие фрагменты могут включать или не включать каркасный участок антител, показанных под SEQ ID NO: 24-35. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитела к про-/латентному миостатину представляют собой мышинные антитела и включают последовательности мышинных каркасных участков.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитела к про-/латентному миостатину по настоящему изобретению связываются с про-/латентным миостатином с относительно высокой аффинностью, например с K_d менее 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} М или менее. Например, антитела к про-/латентному миостатину могут связываться с про-/латентным миостатином с аффинностью от 5 пМ до 500 нМ, например, от 50 пМ до 100 нМ, например, от 500 пМ до 50 нМ. Настоящее изобретение также включает антитела или антигенсвязывающие фрагменты, которые конкурируют с любым из описанных в настоящем документе антител за связывание с про-/латентным миостатином и которые имеют аффинность 50 нМ или менее (например, 20 нМ или менее, 10 нМ или менее, 500 пМ или менее, 50 пМ или менее или 5 пМ или менее). Аффинность и кинетику связывания антитела к про-/латентному миостатину можно протестировать с помощью любого подходящего способа, включая, без ограничения, биосенсорную технологию (например, OCTET или BIACORE).

Антитело, которое "специфически связывается" с целевым антигеном, связывается с антигеном с большей аффинностью, авидностью, легче и/или с большей продолжительностью, чем оно связывается с нецелевыми антигенами. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления в настоящем документе раскрыты антитела, которые специфически связывают про-/латентный миостатин. В соответствии с несколькими вариантами осуществления любое из представленных в настоящем документе антител связывается на сайте расщепления толлоидной протеазой или возле него или на сайте докинга толлоидной протеазы или возле него у про-/латентного миостатина. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело связывается возле сайта расщепления толлоидной протеазой или возле сайта докинга толлоидной протеазы, если оно связывается в пределах 15 или меньше аминокислотных остатков сайта расщепления толлоидной протеазой или сайта докинга толлоидной протеазы. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления любое из представленных в настоящем документе антител связывается в пределах 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислотных остатков сайта расщепления толлоидной протеазой или сайта докинга толлоидной протеазы. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело связывается на сайте расщепления толлоидной протеазой GDF8 или возле него. Например, антитело может связывать аминокислотную последовательность, которая изложена под SEQ ID NO: 62 PKAPPLRELIDQYDVQRDDSSDGSLEDDDYHAT. В соответствии с другими вариантами осуществления любое из представленных в настоящем документе антител связывается на сайте расщепления пропротеиновой конвертазой или возле него или на сайте докинга пропротеиновой конвертазы или возле него у про-/латентного миостатина. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело связывается возле сайта расщепления пропротеиновой конвертазой или возле сайта докинга пропротеиновой конвертазы, если оно связывает в пределах 15 или меньше аминокислотных остатков сайта расщепления пропротеиновой конвертазой или сайта докинга пропротеиновой конвертазы. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления любое из представленных в настоящем документе антител связывается в пределах 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислотных остатков сайта расщепления пропротеиновой конвертазой или сайта докинга пропротеиновой конвертазы. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело связывает на сайте расщепления пропротеиновой конвертазой GDF8 или возле него. Например, антитело может связывать аминокислотную последовательность, которая изложена под SEQ ID NO: 63 GLNPFLEVKVTDTPKRSRRDFGLDCDENHSTESRC.

В одном примере описанные в настоящем документе антитела к про-/латентному миостатину спе-

цифически связывают про-/латентный миостатин, но не другие формы миостатина и/или других представителей семейства факторов роста TGF β . К представителям семейства факторов роста TGF β относятся, без ограничения, белок AMH, ARTN, BMP10, BMP15, BMP2, BMP3, BMP4, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8A, BMP8B, GDF1, GDF10, GDF11, GDF15, GDF2, GDF3, GDF3A, GDF5, GDF6, GDF7, GDF8, GDF9, GDNF, INHA, INHBA, INHBB, INHBC, INHBE, LEFTY1, LEFTY2, NODAL, NRTN, PSPN, TGF β 1, TGF β 2 и TGF β 3. Такие антитела могут связывать про-/латентный миостатин с гораздо большей аффинностью по сравнению с другими представителями семейства факторов роста TGF β (например, по меньшей мере в 2, 5, 10, 50, 100, 200, 500 или 1000 раз выше). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления такие антитела могут связывать про-/латентный миостатин с аффинностью, по меньшей мере в 1000 большей по сравнению с другими представителями семейства факторов роста TGF β . В соответствии с некоторыми вариантами осуществления представленные в настоящем документе антитела могут связываться с про-/латентным миостатином с гораздо большей аффинностью по сравнению с одной или несколькими формами GDF11 или зрелым миостатином (например, по меньшей мере в 2, 5, 10, 50, 100, 200, 500 или 1000 раз выше). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления представленные в настоящем документе антитела могут связываться с про-/латентным миостатином с аффинностью по меньшей мере в 1000 большей по сравнению с одной или несколькими формами GDF11 (например, proGDF11, латентным GDF11 или зрелым GDF11) или зрелым миостатином. В качестве альтернативы или в дополнение, антитела могут характеризоваться гораздо большей ингибирующей активностью в отношении протеолитического расщепления про-/латентного миостатина (например, пропротеиновой конвертазой или толлоидной протеазой) по сравнению с другими представителями семейства TGF β , такими как про-/латентный GDF11 (например, по меньшей мере в 2, 5, 10, 50, 100, 200, 500, 1000 раз выше).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитела связывают антиген, но не могут эффективно удалять антиген из плазмы. Таким образом, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, концентрация антигена в плазме может быть повышена путем уменьшения устранения антигена. Тем не менее в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, представленные в настоящем документе антитела (например, "очищающие" антитела) имеют аффинность к антигену, которая чувствительна к pH. Такие чувствительные к pH антитела могут связываться с антигеном в плазме крови при нейтральном pH и диссоциировать от антигена в кислой среде эндосомы, таким образом уменьшая опосредованное антителом накопление антигена и/или способствуя устранению антигена из плазмы.

Аспекты настоящего изобретения относятся к "очищающим" антителам. Применяемый в контексте настоящего документа термин "'очищающие" антитела" относится к антителам, обладающим как pH-чувствительным связыванием антигена, так и по меньшей мере пороговым уровнем связывания с неонатальным Fc-рецептором клеточной поверхности (FcRn) при нейтральном или физиологическом pH. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления "очищающие" антитела связываются с неонатальным Fc-рецептором, FcRn, при нейтральном pH. Например, "очищающие" антитела могут связываться с FcRn при pH в диапазоне от 7,0 до 7,6. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления "очищающие" антитела могут связываться с антигеном на антигенсвязывающем сайте и связываются с клеточным FcRn посредством Fc-части антитела. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления "очищающие" антитела могут затем интернализироваться, высвобождая антиген в кислую эндосому, которая может разрушаться. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления "очищающее" антитело, которое более не связано с антигеном, может затем высвобождаться (например, посредством экзоцитоза) клеткой обратно в сыворотку крови.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления FcRn в эндотелии сосудов (например, субъекта) продлевает период полужизни "очищающего" антитела. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления клетки эндотелия сосудов интернализуют "очищающие" антитела, которые в соответствии с несколькими вариантами осуществления связываются с антигеном, таким как миостатин (например, промиостатин, латентный миостатин или примированный миостатин). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления "очищающее" антитело возвращается обратно в кровоток. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления "очищающее" антитело имеет повышенный период полужизни (например, в сыворотке крови субъекта) по сравнению с его обычным эквивалентом. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления обычный эквивалент "очищающего" антитела относится к антителу, из которого было получено "очищающее" антитело (например, перед конструированием Fc-части обычного антитела методами инженерии для связывания FcRn с большей аффинностью при pH 7). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления "очищающее" антитело имеет период полужизни в сыворотке крови субъекта, который по меньшей мере на 1, 5, 10, 15, 20, 25, 35, 50, 75, 100, 150, 200 или 250% дольше по сравнению с его обычным эквивалентом.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления Fc-часть "очищающего" антитела связывает FcRn. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления Fc-часть "очищающего" антитела связывается с FcRn при pH 7,4 с K_d в диапазоне от 10^{-3} до 10^{-8} М. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления "очищающее" антитело связывается с FcRn при pH 7,4 с K_d в диапазоне от 10^{-3} до

10^{-7} М, от 10^{-3} до 10^{-6} М, от 10^{-3} до 10^{-5} М, от 10^{-3} до 10^{-4} М, от 10^{-4} до 10^{-8} М, от 10^{-4} до 10^{-7} М, от 10^{-4} до 10^{-6} М, от 10^{-4} до 10^{-5} М, от 10^{-5} до 10^{-8} М, от 10^{-5} до 10^{-7} М, от 10^{-5} до 10^{-6} М, от 10^{-6} до 10^{-8} М, от 10^{-6} до 10^{-7} М или от 10^{-7} до 10^{-8} М. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления FcRn связывается с CH₂-CH₃ шарнирным участком "очищающего" антитела. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления FcRn связывается с тем же участком, что и белок А или белок G. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления FcRn связывается с различными сайтами связывания от FcγR. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления аминокислотные остатки AA Fc-участка "очищающего" антитела необходимы для связывания с FcRn. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления аминокислотные остатки AA Fc-участка "очищающего" антитела влияют на связывание с FcRn.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления любые из представленных в настоящем документе антител сконструированы методами инженерии для связывания FcRn с большей аффинностью. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления любые из представленных в настоящем документе антител сконструированы методами инженерии для связывания FcRn с большей аффинностью при pH 7,4. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления аффинность "очищающих" антител к FcRn повышена для расширения их фармакокинетических (ПК) свойств по сравнению с их обычными эквивалентами. Например, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления "очищающие" антитела вызывают меньше побочных эффектов по причине их эффективности при более низких дозах. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления "очищающие" антитела вводят реже. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления повышен трансцитоз "очищающих" антител в определенные типы тканей. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления "очищающие" антитела усиливают эффективность транс-плацентарной доставки. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления "очищающие" антитела являются более дешевыми в производстве.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления любые из представленных в настоящем документе антител сконструированы методами инженерии для связывания FcRn с меньшей аффинностью. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления любые из представленных в настоящем документе антител сконструированы методами инженерии для связывания FcRn с меньшей аффинностью при pH 7,4. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления аффинность "очищающих" антител к FcRn уменьшена для сокращения их фармакокинетических (ПК) свойств по сравнению с их обычными эквивалентами. Например, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, "очищающие" антитела быстрее устраняются при визуализации и/или радиомунотерапии. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления "очищающие" антитела стимулируют устранение эндогенных патогенных антител в качестве лечения аутоиммунных заболеваний. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления "очищающие" антитела уменьшают риск неблагоприятного исхода беременности, который может быть вызван трансплацентарным транспортом антител, специфических к зародышевому материалу.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления "очищающие" антитела имеют уменьшенную аффинность к антигену при низком pH по сравнению с нейтральным или физиологическим pH (например, pH 7,4). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления "очищающие" антитела имеют уменьшенную аффинность к антигену при кислом pH (например, pH в диапазоне от 5,5 до 6,5) по сравнению с физиологическим pH (например, pH 7,4). Следует понимать, что любые из представленных в настоящем документе антител могут быть сконструированы методами инженерии для диссоциации от антигена в зависимости от изменений pH (например, чувствительные к pH антитела). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления представленные в настоящем документе "очищающие" антитела сконструированы методами инженерии для связывания антигена в зависимости от pH. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления представленные в настоящем документе "очищающие" антитела сконструированы методами инженерии для связывания FcRn в зависимости от pH. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления представленные в настоящем документе "очищающие" антитела интернализируются посредством эндоцитоза. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления представленные в настоящем документе "очищающие" антитела интернализируются посредством связывания FcRn. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления подвергнутые эндоцитозу "очищающие" антитела высвобождают антиген в эндосоме. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления "очищающие" антитела возвращаются на клеточную поверхность. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления "очищающие" антитела остаются присоединенными к клеткам. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления подвергнутые эндоцитозу "очищающие" антитела возвращаются обратно в плазму. Следует учесть, что Fc-часть любого из представленных в настоящем документе антител может быть сконструирована методами инженерии так, чтобы она имела другую FcRn-связывающую активность. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления аффинность связывания FcRn влияет на время устранения антигена "очищающим" антителом. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления "очищающие" антитела могут быть долгодействующими или быстродействующими "очищающими" антителами.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления преобразование обычного терапевтического антитела в "очищающее" антитело снижает эффективную дозу. В соответствии с некоторыми ва-

риантами осуществления преобразование обычного терапевтического антитела в "очищающее" антитело снижает эффективную дозу по меньшей мере на 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95 или 99%. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления преобразование обычного терапевтического антитела в "очищающее" антитело снижает эффективную дозу по меньшей мере в 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 15, 20, 50 или 100 раз.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления подбор соответствующей дозы "очищающего" антитела для терапии можно выполнять эмпирически. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления высокая доза "очищающего" антитела может насытить FcRn, что приводит в результате к антителам, которые стабилизируют антиген в сыворотке крови без интернализации. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления низкая доза "очищающего" антитела может быть терапевтически неэффективной. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления "очищающие" антитела вводят один раз в день, один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в три недели, один раз в четыре недели, один раз в 6 недель, один раз в 8 недель, один раз в 10 недель, один раз в 12 недель, один раз в 16 недель, один раз в 20 недель или один раз в 24 недели.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления любые из представленных в настоящем документе антител можно модифицировать или сконструировать методами инженерии в "очищающие" антитела. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления любые из представленных в настоящем документе антител можно преобразовывать в "очищающее" антитело с помощью любого подходящего способа. Например, подходящие способы получения "очищающих" антител ранее были описаны в работах Igawa et al. (2013), "Engineered Monoclonal Antibody with Novel Antigen-Sweeping Activity In Vivo", PLoS ONE, 8(5):e63236; и Igawa et al. "pH-dependent antigen-binding antibodies as a novel therapeutic modality", Biochimica et Biophysica Acta, 1844 (2014), 1943-1950; содержание каждой из которых, таким образом, включено в настоящий документ посредством ссылки. Тем не менее следует понимать, что приведенные в настоящем документе способы получения "очищающих" антител не подразумеваются в качестве ограничения. Следовательно, в рамках объема настоящего изобретения существуют дополнительные способы получения "очищающих" антител.

В основе некоторых аспектов настоящего изобретения лежит представление о том, что аффинность (например, выраженная в виде K_d) любого из представленных в настоящем документе антител к про-/латентному миостатину является чувствительной к изменениям pH. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления представленные в настоящем документе антитела имеют повышенную K_d связывания с про-/латентным миостатином при относительно низком pH (например, pH в диапазоне от 4,0 до 6,5) по сравнению с относительно высоким pH (например, pH в диапазоне от 7,0 до 7,4). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления представленные в настоящем документе антитела имеют K_d связывания с про-/латентным миостатином в диапазоне от 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} М при pH от 4,0 до 6,5. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления представленные в настоящем документе антитела имеют K_d связывания с про-/латентным миостатином в диапазоне от 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} М при pH от 7,0 до 7,4. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления представленные в настоящем документе антитела имеют K_d связывания с про-/латентным миостатином, которая по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 50 раз, по меньшей мере в 100 раз, по меньшей мере в 500 раз, по меньшей мере в 1000 раз, по меньшей мере в 5000 раз или по меньшей мере в 10000 раз больше при pH от 4,0 до 6,5, чем при pH от 7,0 до 7,4.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее изобретение относится к антителам к про-/латентному миостатину, которые специфически не связываются с эпитопом в пределах аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 64. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления представленные в настоящем документе антитела к про-/латентному миостатину специфически не связываются с тем же эпитопом, что и антитело, описанное в табл. 2a, 11a, 11b или 13 в публикации международной патентной заявки № WO 2016/098357, которая была опубликована 23 июня 2016 г. и которая основана на международной патентной заявке № PCT/JP2015/006323, которая была подана 18 декабря 2015 г. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления представленные в настоящем документе антитела к про-/латентному миостатину не конкурируют или перекрестно не конкурируют за связывание с тем же эпитопом, что и антитело, описанное в табл. 2a, 11a, 11b или 13 в публикации международной патентной заявки № WO 2016/098357, которая была опубликована 23 июня 2016 г. и которая основана на международной патентной заявке № PCT/JP2015/006323, которая была подана 18 декабря 2015 г. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления представленные в настоящем документе антитела к про-/латентному миостатину специфически не связываются с тем же эпитопом, что и антитело, содержащее пару V_H и V_L и описанное в табл. 2a, 11a, 11b или 13 в публикации международной патентной заявки № WO 2016/098357, которая была опубликована 23 июня 2016 г. и которая основана на международной патентной заявке № PCT/JP2015/006323, которая была подана 18 декабря 2015 г. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления представленные в настоящем документе антитела к про-/латентному миостатину не конкурируют или перекрестно не конкурируют за связывание с тем же эпитопом, что и антитело, содержащее пару V_H и V_L и описанное в табл. 2a, 11a, 11b или 13 в публикации международной патентной заявки № WO 2016/098357, которая

была опубликована 23 июня 2016 г. и которая основана на международной патентной заявке № PCT/JP2015/006323, которая была подана 18 декабря 2015 г.

Полипептиды.

Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к полипептиду, имеющему последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28 и SEQ ID NO 29. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления полипептид представляет собой вариабельный домен тяжелой цепи. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления полипептид по меньшей мере на 75% (например, 80, 85, 90, 95, 98 или 99%) идентичен любой из аминокислотных последовательностей, изложенных под SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28 или SEQ ID NO 29.

Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к полипептиду, имеющему последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34 и SEQ ID NO 35. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления полипептид представляет собой вариабельный домен легкой цепи. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления полипептид по меньшей мере на 75% (например, 80, 85, 90, 95, 98 или 99%) идентичен любой из аминокислотных последовательностей, изложенных под SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34 или SEQ ID NO: 35.

Антитела, которые конкурируют с антителами к про-/латентному миостатину. Аспекты настоящего изобретения относятся к антителам, которые конкурируют или перекрестно конкурируют с любым из представленных в настоящем документе антител. Термин "конкурируют", применяемый в контексте настоящего документа в отношении антитела, означает, что первое антитело связывается с эпитопом белка (например, латентным миостатином) достаточно схожим образом со связыванием второго антитела, так что результат связывания первого антитела с его эпитопом явно снижается в присутствии второго антитела по сравнению со связыванием первого антитела в условиях отсутствия второго антитела. В качестве альтернативы, если связывание второго антитела с его эпитопом также явно снижается в присутствии первого антитела, то такой факт может иметь место, но не всегда. То есть, первое антитело может ингибировать связывание второго антитела с его эпитопом без того, чтобы второе антитело ингибировало связывание первого антитела с его соответствующим эпитопом. Тем не менее, если каждое антитело явно ингибирует связывание другого антитела с его эпитопом или лигандом, независимо, в одной и той же, большей или меньшей степени, то говорят, что антитела "перекрестно конкурируют" друг с другом за связывание их соответствующего эпитопа(ов). Как конкурирующие, так и перекрестно конкурирующие антитела входят в объем настоящего изобретения. Независимо от механизма, согласно которому происходит такая конкуренция или перекрестная конкуренция (например, стерическое затруднение, конформационное изменение или связывание с общим эпитопом или его частью), специалист в настоящей области техники поймет, что такие конкурирующие и/или перекрестно конкурирующие антитела охватываются настоящим изобретением и могут быть пригодны для представленных в настоящем документе способов и/или композиций.

Аспекты настоящего изобретения относятся к антителам, которые конкурируют или перекрестно конкурируют с любым из представленных в настоящем документе антител. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело связывается на том же эпитопе, что и любое из представленных в настоящем документе антител, или возле него. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело связывает возле эпитопа, если оно связывается в пределах 15 или меньше аминокислотных остатков эпитопа. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления любое из представленных в настоящем документе антител связывается в пределах 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислотных остатков эпитопа, который связывается любым из представленных в настоящем документе антител.

В соответствии с другим вариантом осуществления антитело конкурирует или перекрестно конкурирует за связывание с любым из представленных в настоящем документе антигенов (например, про-/латентным миостатином) с равновесной константой диссоциации, K_d , между антителом и белком менее 10^{-6} М. В соответствии с другими вариантами осуществления антитело конкурирует или перекрестно конкурирует за связывание с любым из представленных в настоящем описании антигенов с K_d в диапазоне от 10^{-11} до 10^{-6} М.

Аспекты настоящего изобретения относятся к антителам, которые конкурируют за связывание с про-/латентным миостатином с любым из представленных в настоящем документе антител. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело связывается с про-/латентным миостатином на том же эпитопе, что и любое из представленных в настоящем документе антител. Например, в соответствии с несколькими вариантами осуществления любое из представленных в настоящем документе антител связывается на сайте расщепления толлоидной протезой или возле него или на сайте докинга толлоидной протезы или возле него у про-/латентного миостатина. В соответствии с другими вариантами осуществления любое из представленных в настоящем документе антител связывается на сайте расщепления пропротеиновой конвертазой или возле него или на сайте докинга пропротеиновой конвертазы или возле него у про-/латентного миостатина. В соответствии с другим вариантом осуществления антитело

конкурирует за связывание с про-/латентным миостатином с равновесной константой диссоциации, K_d , между антителом и пролатентным миостатином менее 10^{-6} М. В соответствии с другими вариантами осуществления антитело, которое конкурирует с любым из представленных в настоящем документе антител связывается с про-/латентным миостатином с K_d в диапазоне от 10^{-11} до 10^{-6} М.

Любое из представленных в настоящем документе антител можно охарактеризовать с помощью любых подходящих способов. Например, один способ заключается в выявлении эпитопа, с которым связывается антиген, или "картирование эпитопов". Существует множество подходящих способов картирования и характеристики локализации эпитопов на белках, включая расчет кристаллической структуры комплекса антитело-антиген, конкурентные анализы, анализы экспрессии генных фрагментов и анализы на основе синтетических пептидов, которые описаны, например, в Chapter 11 of Harlow and Lane, *Using Antibodies, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1999. В дополнительном примере картирование эпитопов можно применять для определения последовательности, с которой связывается антитело. Эпитоп может быть линейным эпитопом, т.е. содержащимся в одном фрагменте последовательности аминокислот, или конформационным эпитопом, образованным в результате трехмерного взаимодействия аминокислот, которые не всегда могут содержаться в одном фрагменте последовательности (линейной последовательности первичной структуры). Для анализа связывания с антителом можно выделить или синтезировать (например, рекомбинантными методами) и применять пептиды различной длины (например, длиной по меньшей мере 4-6 аминокислот). В другом примере эпитоп, с которым связывается антитело, можно определить при системном скрининге путем применения перекрывающихся пептидов, полученных из целевой антигенной последовательности, и определения связывания антителом. В соответствии с анализами экспрессии генных фрагментов, открытую рамку считывания, кодирующую целевой антиген, фрагментируют либо случайным образом, либо с помощью специфических генетических конструкций и определяют реактивность экспрессированных фрагментов антигена с подлежащим тестированию антителом. Генные фрагменты могут быть получены, например, с помощью ПНР, а затем транскрибированы и транслированы в белок *in vitro* в присутствии радиоактивных аминокислот. Затем с помощью иммунопреципитации и гель-электрофореза определяют связывание антитела с радиоактивно мечеными антигенными фрагментами. Некоторые эпитопы также можно выявить с помощью больших библиотек случайных пептидных последовательностей, экспонированных на поверхности фаговых частиц (фаговых библиотек). В качестве альтернативы, определенную библиотеку перекрывающихся пептидных фрагментов можно протестировать в отношении связывания с тестируемым антителом в простых анализах связывания. В дополнительном примере для выявления остатков, требуемых, достаточных и/или необходимых для связывания эпитопа, можно осуществить мутагенез антигенсвязывающего домена, эксперименты по обмену доменами и сканирующий аланином мутагенез. Например, эксперименты по обмену доменами можно выполнить с применением мутанта целевого антигена, в котором различные фрагменты полипептида про-/латентного миостатина были заменены (произведен обмен с) последовательностями от близкородственного, но отличного по антигенным свойствам белка, такого как другой представитель семейства белков TGF β (например, GDF11). Посредством оценки связывания антитела с мутантным про-/латентным миостатином можно оценить важность конкретного фрагмента антигена для связывания антитела.

В качестве альтернативы можно провести конкурентные анализы с применением других антител, о которых известно, что они связываются с тем же антигеном, для определения, связывается ли антитело с тем же эпитопом, что и другие антитела. Конкурентные анализы хорошо известны специалистам в настоящей области техники. Для определения того, связывает ли антитело к про-/латентному миостатину один или несколько конкретных остатков/сегментов в про-/латентном миостатине, как описано в настоящем документе, можно применять любые подходящие способы, например описанные в настоящем документе способы картирования эпитопа. Кроме того, взаимодействие антитела с одним или несколькими из таких определенных остатков в про-/латентном миостатине можно определить с помощью стандартной методики. Например, можно определить кристаллическую структуру и соответственно можно определить расстояния между остатками в про-/латентном миостатине и одним или нескольких остатках в антителе. Исходя из такого расстояния, можно определить, взаимодействует ли конкретный остаток в про-/латентном миостатине с одним или несколькими остатками в антителе. Кроме того, для определения предпочтительного связывания кандидатного антитела к про-/латентному миостатину с про-/латентным миостатином по сравнению с другой целевой молекулой, такой как мутантный про-/латентный миостатин, можно применять такие подходящие способы, как конкурентные анализы и анализы мутагенеза целевой молекулы.

Получение антител, которые связывают про-/латентный миостатин.

Для получения антител или их антигенсвязывающих фрагментов по настоящему изобретению можно применять множество способов. Например, антитела можно получить с помощью способов рекомбинантной ДНК. Моноклональные антитела также можно получить путем создания гибридом (см., например, Kohler and Milstein (1975) *Nature*, 256:495-499) в соответствии с известными способами. Полученные таким образом гибридомы затем подвергают скринингу с применением стандартных способов, таких как твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА) и поверхностный плазмонный резонанс (например,

ОСТЕТ или BIACORE), для выявления одной или нескольких гибридом, которые продуцируют антитело, которое специфически связывается с указанным антигеном. В качестве иммуногена можно применять любую форму указанного антигена, например, рекомбинантный антиген, встречающийся в природе формы, любые его варианты или фрагменты, а также его антигенный пептид (например, любой из описанных в настоящем документе эпитопов в виде линейного эпитопа или в каркасе в качестве конформационного эпитопа). Один иллюстративный способ получения антител предусматривает скрининг библиотек экспрессии белка, которые экспрессируют антитела или их фрагменты (например, scFv), например библиотек фагового или рибосомного дисплея. Фаговый дисплей описан, например, у Ladner et al., патент США № 5223409; Smith (1985), Science 228:1315-1317; Clackson et al. (1991), Nature, 352:624-628; Marks et al. (1991), J. Mol. Biol., 222:581-597; WO 92/18619, WO 91/17271, WO 92/20791, WO 92/15679, WO 93/01288, WO 92/01047, WO 92/09690 и WO 90/02809.

Помимо применения библиотек дисплея, указанный антиген (например, промиостатин) можно применять для иммунизации не отличного от человека животного, например грызуна, например мыши, хомяка или крысы. В соответствии с одним вариантом осуществления отличным от человека животным является мышь.

В соответствии с другим вариантом осуществления моноклональное антитело получают от отличного от человека животного, а затем модифицируют, например, путем химеризации с применением подходящих методик рекомбинантной ДНК. Были описаны различные подходы создания химерных антител. См., например, Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81:6851, 1985; Takeda et al., Nature 314:452, 1985; Cabilly et al., патент США № 4816567; Boss et al., патент США № 4816397; Tanaguchi et al., публикацию европейского патента EP171496; публикацию европейского патента 0173494, патент Великобритании GB 2177096B.

Для дополнительных методик получения антитела см. Antibodies: A Laboratory Manual, eds. Harlow et al., Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. Настоящее изобретение не обязательно ограничено каким-либо конкретным источником, способом получения или другими конкретными характеристиками антитела.

Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к клеткам-хозяевам, трансформированным полинуклеотидом или вектором. Клетки-хозяева могут представлять собой прокариотическую или эукариотическую клетку. Полинуклеотид или вектор, который присутствует в клетке-хозяине, может быть либо интегрированным в геном клетки-хозяина, либо он может поддерживаться внехромосомно. Клеткой-хозяином может быть любая прокариотическая или эукариотическая клетка, такая как бактериальная, клетка насекомого, гриба, растительная, животная или человеческая клетка. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления клетки гриба представляют собой, например, клетки гриба рода *Saccharomyces*, в частности вида *S. cerevisiae*. Термин "прокариотический" включает все бактерии, которые можно трансформировать или трансфицировать молекулами ДНК или РНК для экспрессии антитела или соответствующих иммуноглобулиновых цепей. К прокариотическим хозяевам можно отнести грамотрицательные, а также грамположительные бактерии, такие как, например, *E. coli*, *S. typhimurium*, *Serratia marcescens* и *Bacillus subtilis*. Термин "эукариотический" включает дрожжи, высшие растения, насекомых и клетки позвоночных, например, клетки млекопитающих, такие как клетки NS0 и CHO. В зависимости от хозяина, используемого в процедуре рекомбинантного получения, антитела или иммуноглобулиновой цепи, кодируемые полинуклеотидом, могут быть гликозилированными или могут быть негликозилированными. Антитела или соответствующие иммуноглобулиновые цепи также могут включать исходный метиониновый аминокислотный остаток.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления после включения вектора в соответствующего хозяина, хозяина можно поддерживать в условиях, подходящих для высокого уровня экспрессии нуклеотидных последовательностей и, при необходимости, сбора и очистки легких цепей иммуноглобулина, тяжелых цепей, димеров легкой/тяжелой цепи или интактных антител, антигенсвязывающих фрагментов или других форм иммуноглобулина; см. Beychok, Cell of Immunoglobulin Synthesis, Academic Press, NY, (1979). Таким образом, полинуклеотиды или векторы вводят в клетки, которые, в свою очередь, продуцируют антитело или антигенсвязывающие фрагменты. Кроме того, для крупномасштабного производства антител или фрагментов антител можно применять трансгенных животных, предпочтительно млекопитающих, содержащих вышеупомянутые клетки-хозяева.

Трансформированные клетки-хозяева можно выращивать в ферментерах и культивировать с помощью любых подходящих методик для достижения оптимального роста клеток. После экспрессии цельные антитела, их димеры, отдельные легкие и тяжелые цепи, другие формы иммуноглобулина или антигенсвязывающие фрагменты можно очистить в соответствии со стандартными в настоящей области техники процедурами, включая осаждение сульфатом аммония, аффинные колонки, колоночную хроматографию, гель-электрофорез и т.п.; см. Scopes, "Protein Purification", Springer Verlag, N.Y. (1982). Затем антитело или антигенсвязывающие фрагменты можно выделить из ростовой среды, клеточных лизатов или фракций клеточных мембран. Выделение и очистку, например, микробиологически экспрессируемых антител или антигенсвязывающих фрагментов можно осуществить любыми общепринятыми способами, такими как, например, препаративные хроматографические разделения и иммунологические разделения, такие как разделения, предусматривающие применение моноклональных или поликлональных

антител, например, к константному участку антитела.

Аспекты настоящего изобретения относятся к гибридоме, которая обеспечивает бесконечно пролонгируемый источник моноклональных антител. В качестве альтернативы получению иммуноглобулинов непосредственно из культуры гибридом, можно применять иммортализованные клетки гибридомы в качестве источника реаранжированных локусов тяжелой цепи и легкой цепи для последующей экспрессии и/или генетической манипуляции. Гены реаранжированных антител можно обратно транскрибировать из соответствующих мРНК с получением кДНК. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления константный участок тяжелой цепи может быть заменен на участок другого изотипа или полностью исключен. Вариабельные участки могут быть связаны друг с другом таким образом, чтобы они кодировали одноцепочечные Fv-участки. Можно связать несколько Fv-участков для придания способности связывания с более чем одной мишенью или можно использовать химерные комбинации тяжелой и легкой цепей. Для клонирования вариабельных участков антител и создания рекомбинантных антител можно применять любой подходящий способ.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления получают подходящую нуклеиновую кислоту, которая кодирует вариабельные участки тяжелой и/или легкой цепи, и вставляют ее в векторы экспрессии, которые можно трансфицировать в стандартные рекомбинантные клетки-хозяева. Можно применять множество таких клеток-хозяев. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления для эффективного процессирования и продуцирования преимущественными могут быть клетки-хозяева млекопитающих. Типичные линии клеток млекопитающих, пригодные для этой цели, включают клетки CHO, клетки 293 или клетки NS0. Получение антитела или антигенсвязывающего фрагмента можно осуществить путем культивирования модифицированного рекомбинантного хозяина в условиях культивирования, подходящих для роста клеток-хозяев и экспрессии кодирующих последовательностей. Антитела или антигенсвязывающие фрагменты могут быть извлечены путем их выделения из культуры. Системы экспрессии можно сконструировать такими, чтобы они включали сигнальные пептиды с тем, чтобы получаемые в результате антитела секретировались в среду; тем не менее, возможно также внутриклеточное получение.

Настоящее изобретение также относится к полинуклеотиду, кодирующему по меньшей мере вариабельный участок иммуноглобулиновой цепи описанных в настоящем документе антител. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления кодируемый полинуклеотидом вариабельный участок содержит по меньшей мере один определяющий комплементарность участок (CDR) V_H и/или V_L вариабельного участка антитела, продуцируемого любой из описанных выше гибридом.

Полинуклеотиды, кодирующие антитело или антигенсвязывающие фрагменты, могут представлять собой, например, ДНК, кДНК, РНК, или синтетически полученную ДНК или РНК, или рекомбинантно полученную молекулу химерной нуклеиновой кислоты, содержащую любой из таких полинуклеотидов либо отдельно, либо в комбинации. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления полинуклеотид является частью вектора. Такие векторы могут содержать дополнительные гены, такие как маркерные гены, которые позволяют производить отбор вектора в подходящей клетке-хозяине и в подходящих условиях.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления полинуклеотид функционально связан с последовательностями контроля экспрессии, обеспечивающими экспрессию в прокариотических или эукариотических клетках. Экспрессия полинуклеотида включает транскрипцию полинуклеотида в транскрибируемую мРНК. Специалистам в настоящей области техники хорошо известны регуляторные элементы, обеспечивающие экспрессию в эукариотических клетках, предпочтительно клетках млекопитающих. К ним можно отнести регуляторные последовательности, которые способствуют инициации транскрипции, и необязательно поли-А-сигналы, которые способствуют терминеции транскрипции и стабилизации транскрипта. К дополнительным регуляторным элементам можно отнести транскрипционные, а также трансляционные энхансеры и/или естественным образом ассоциированные или гетерологичные промоторные участки. К возможным регуляторным элементам, позволяющим экспрессию в прокариотических клетках-хозяевах, относятся, например, промотор PL, Lac, Trp или Tac у *E. coli*, а примерами регуляторных элементов, позволяющих экспрессию в эукариотических клетках-хозяевах, являются промотор AOX1 или GAL1 дрожжей или промотор CMV, промотор SV40, промотор RSV (вируса саркомы Рауса), энхансер CMV, энхансер SV4 или интрон глобина в клетках млекопитающих и других животных.

Помимо элементов, которые ответственны за инициацию транскрипции, такие регуляторные элементы также могут включать сигналы терминеции транскрипции, такие как сайт поли-А SV40 или сайт поли-А tk, идущие после данного полинуклеотида. Кроме того, в зависимости от используемой системы экспрессии, в кодирующую последовательность полинуклеотида можно добавить лидерные последовательности, способные направлять полипептид в клеточный компартмент или секретировать его в среду, и они были описаны ранее. Лидерная последовательность(последовательности) собирается(собираются) в соответствующей фазе с последовательностями инициации и терминеции трансляции и, предпочтительно, лидерной последовательностью, способной направлять секрецию транслированного белка или его части, например, во внеклеточную среду. Необязательно можно использовать гетерологичную полинуклеотидную последовательность, которая кодирует слитый белок, включающий С- или N-концевой сиг-

нальный пептид, придающий требуемые характеристики, например, стабилизацию или упрощенную очистку экспрессированного рекомбинантного продукта.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления полинуклеотиды, кодирующие по меньшей мере переменный домен легкой и/или тяжелой цепи, могут кодировать переменные домены обеих иммуноглобулиновых цепей или только одной. Аналогично, полинуклеотиды могут находиться под контролем одного и того же промотора или могут контролироваться для экспрессии отдельно. Кроме того, некоторые аспекты относятся к векторам, в частности плазмидам, космидам, вирусам и бактериофагам, традиционно применяемым в генной инженерии, которые содержат полинуклеотид, кодирующий переменный домен иммуноглобулиновой цепи антитела или антигенсвязывающий фрагмент; необязательно в комбинации с полинуклеотидом, который кодирует переменный домен другой иммуноглобулиновой цепи антитела.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления последовательности контроля экспрессии представлены в виде эукариотических промоторных систем в векторах, способных трансформировать или трансфицировать эукариотические клетки-хозяева, но также можно использовать последовательности контроля для прокариотических хозяев. Векторы экспрессии, полученные из вирусов, таких как ретровирусы, вирус коревой оспы, аденоассоциированный вирус, вирусы герпеса или вирус папилломы крупного рогатого скота, можно применять для доставки полинуклеотидов или вектора в целевую популяцию клеток (например, для конструирования методами инженерии клетки, экспрессирующей антитело или антигенсвязывающий фрагмент). Для конструирования рекомбинантных вирусных векторов можно применять множество подходящих способов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления полинуклеотиды и векторы могут быть ресуспендированы в липосомах для доставки в клетки-мишени. Векторы, содержащие полинуклеотиды (например, последовательности, кодирующие тяжелый и/или легкий переменный(ые) домен(ы) иммуноглобулиновых цепей и последовательности контроля экспрессии), можно трансфицировать в клетку-хозяина подходящими способами, которые варьируют в зависимости от типа клетки-хозяина.

Модификации.

Антитела или антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению можно модифицировать детектируемой меткой, включая, без ограничения, фермент, простетическая группа, флуоресцентный материал, люминесцентный материал, биолюминесцентный материал, радиоактивный материал, позитронно-активный металл, нерадиоактивный парамагнитный ион металла и аффинную метку для детекции и выделения про-/латентного миостатина. Детектируемое вещество можно связать или конъюгировать либо непосредственно с полипептидами по настоящему раскрытию, либо опосредованно через промежуточный элемент (такой как, например, линкер) с помощью подходящих методик. К неограничивающим примерам подходящих ферментов относятся пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза, β -галактозидаза, глюкозооксидаза или ацетилхолинэстераза; к неограничивающим примерам подходящих комплексов простетических групп относятся стрептавидин/биотин и авидин/биотин; к неограничивающим примерам подходящих флуоресцентных материалов относятся биотин, умбеллиферон, флуоресцеин, изотиоцианат флуоресцеина, родамин, флуоресцеин дихлортриазиниламин, дансилхлорид или фикоэритрин; к примеру люминесцентного материала относится люминол; к неограничивающим примерам биолюминесцентных материалов относятся люцифераза, люциферин и экворин; и к примерам подходящего радиоактивного материала относятся ион радиоактивного металла, например альфа-излучатели или другие радиоизотопы, такие как, например, йод (^{131}I , ^{125}I , ^{123}I , ^{121}I), углерод (^{14}C), сера (^{35}S), тритий (^3H), индий (^{115}mIn , ^{113}mIn , ^{112}In , $^{\text{m}}\text{In}$) и технеций ($^{\text{Tc}}$, $^{\text{mTc}}$), таллий (^{201}Ti), галлий (^{68}Ga , ^{67}Ga), палладий (^{103}Pd), молибден (^{99}Mo), ксенон (^{133}Xe), фтор (^{18}F), ^{153}Sm , $^{\text{Lu}}$, ^{159}Gd , ^{149}Pm , ^{140}La , ^{175}Yb , ^{166}Ho , ^{90}Y , ^{47}Sc , ^{86}Rb , ^{188}Re , ^{142}Pr , ^{105}Rh , ^{97}Ru , ^{68}Ge , ^{57}Co , ^{65}Zn , ^{85}Sr , ^{32}P , ^{153}Gd , ^{169}Yb , ^{51}Cr , ^{54}Mn , ^{75}Se и олово (^{113}Sn , ^{117}Sn). Детектируемое вещество можно связать или конъюгировать либо непосредственно с антителами к про-/латентному миостатину по настоящему раскрытию, либо опосредовано через промежуточный элемент (такой как, например, линкер) с помощью подходящих методик. Антитела к про-/латентному миостатину, конъюгированные с детектируемым веществом, можно применять для диагностических анализов, как описано в настоящем документе.

Фармацевтические композиции.

Одно или несколько антител к про-/латентному миостатину можно смешать с фармацевтически приемлемым носителем (вспомогательным средством), в том числе буфером, с получением фармацевтической композиции для применения при облегчении заболевания или нарушения, которое ассоциировано с миопатией. "Приемлемое" означает, что носитель должен быть совместим с активным ингредиентом композиции (и предпочтительно быть способен стабилизировать активный ингредиент) и не оказывать пагубного воздействия на подлежащего лечению субъекта. Примеры фармацевтически приемлемых вспомогательных средств (носителей), в том числе буферов, будут очевидны для специалиста в настоящей области техники и были описаны ранее. См., например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. (2000), Lippincott Williams and Wilkins, Ed. K.E. Hoover. В одном примере описываемая в настоящем документе фармацевтическая композиция содержит несколько антител к про-/латентному миостатину, которые распознают различные эпитопы/остатки целевого антигена.

Применяемые в настоящих способах фармацевтические композиции могут содержать фармацевтически приемлемые носители, вспомогательные средства или стабилизаторы в форме лиофилизированных составов или водных растворов. (Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. (2000), Lippincott Williams and Wilkins, Ed. K.E. Hoover). Приемлемые носители, вспомогательные средства или стабилизаторы являются нетоксичными для принимающих их пациентов в применяемых дозировках и концентрациях и могут содержать буферы, такие как фосфатный, цитратный и на основе других органических кислот; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония, хлорид гексаметония, хлорид бензалкония, хлорид бензетония, фенол, бутиловый или бензиловый спирт, алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен, катехол, резорцин, циклогексанол, 3-пентанол и м-крезол); низкомолекулярные (менее приблизительно 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстраны; хелатирующие средства, такие как ЭДТА; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, Zn-белковые комплексы); и/или неионогенные поверхностноактивные вещества, такие как TWEENTM, PLURONICSTM или полиэтиленгликоль (PEG). В настоящем документе дополнительно описаны фармацевтически приемлемые вспомогательные средства.

В некоторых примерах описываемая в настоящем документе фармацевтическая композиция содержит липосомы, содержащие антитело к про-/латентному миостатину, которые можно получить любым подходящим способом, таким как описанный в работе Epstein, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688 (1985); Hwang, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4030 (1980); и патентах США № 4485045 и 4544545. Липосомы с увеличенной продолжительностью пребывания в кровотоке раскрыты в патенте США № 5013556.

Особенно полезные липосомы можно получить с помощью способа обращенно-фазового выпаривания с липидной композицией, содержащей фосфатидилхолин, холестерин и PEG-derivatизированный фосфатидилэтаноламин (PEG-PE). Липосомы экстрадируют через фильтры с определенным размером пор с получением липосом с требуемым диаметром.

Антитело к про-/латентному миостатину можно также заключить в микрокапсулы, полученные, например, методиками коацервации или путем межфазной полимеризации, например, гидроксиметилцеллюлозы, или желатиновые микрокапсулы и полиметилметакрилатные микрокапсулы соответственно в коллоидных системах доставки лекарственных средств (например, липосомах, альбуминовых микросферах, микроэмульсиях, наночастицах и микрокапсулах) или в макроэмульсиях. Иллюстративные методики были описаны ранее, см., например, Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. Mack Publishing (2000).

В других примерах описанная в настоящем документе фармацевтическая композиция может быть составлена в формате с замедленным высвобождением. Подходящие примеры препаратов с замедленным высвобождением включают полупроницаемые матрицы из твердых гидрофобных полимеров, содержащие антитело, причем матрицы имеют форму формованных изделий, например, пленок или микрокапсул. К примерам матриц с замедленным высвобождением относятся сложные полиэфир, гидрогели (например, поли(2-гидроксипропилметакрилат) или поливиниловый спирт), полилактоиды (патент США № 3773919), сополимеры L-глутаминовой кислоты и 7-этил-L-глутамата, неразлагаемый этиленвинилацетат, разлагаемые сополимеры молочной кислоты и гликолевой кислоты, такие как LUPRON DEPOTTM (инъекционные микросферы, состоящие из сополимера молочной кислоты и гликолевой кислоты и ацетата лейпролида), изобутират ацетата сахарозы и поли-D-(-)-3-гидроксимасляная кислота.

Фармацевтические композиции, подлежащие применению для введения *in vivo*, должны быть стерильными. Этого легко достичь, например, путем фильтрации через мембраны для стерилизующего фильтрования. Композиции терапевтических антител обычно помещают в емкость, имеющую стерильное отверстие для доступа, например пакет для внутривенного раствора или флакон с пробкой, прокалываемой иглой для подкожной инъекции.

Описываемые в настоящем документе фармацевтические композиции могут быть представлены в стандартных лекарственных формах, таких как таблетки, пилюли, капсулы, порошки, гранулы, растворы, или суспензии, или суппозитории для перорального, парентерального или ректального введения или введения путем ингаляции или инсуффляции.

Для приготовления твердых композиций, таких как таблетки, действующий активный ингредиент можно смешать с фармацевтическим носителем, например с обычными ингредиентами для таблетирования, такими как кукурузный крахмал, лактоза, сахароза, сорбит, тальк, стеариновая кислота, стеарат магния, дикальция фосфат или камеди, и другими фармацевтическими разбавителями, например водой, с получением композиции до придания ей твердой лекарственной формы, содержащей гомогенную смесь соединения по настоящему изобретению или его нетоксичной фармацевтически приемлемой соли. Если речь идет о том, что эти композиции до придания им лекарственной формы имеют гомогенный вид, под-

разумевают, что активный ингредиент равномерно диспергирован по всей композиции так, чтобы композицию можно было легко разделить на эквивалентно эффективные стандартные лекарственные формы, такие как таблетки, пилюли и капсулы. Затем эту композицию до придания ей твердой лекарственной формы подразделяют на стандартные лекарственные формы описанного выше типа, содержащие от 0,1 до приблизительно 500 мг активного ингредиента по настоящему раскрытию. Таблетки или пилюли новой композиции можно покрыть или иным образом составить для получения лекарственной формы, обеспечивающей преимущество длительного действия. Например, таблетка или пилюля может содержать составляющий ее внутренний содержащий дозу и внешний содержащий дозу компонент, причем последний имеет форму оболочки над первым. Эти два компонента могут быть разделены энтеросолюбильным слоем, который предназначен для противодействия расщеплению в желудке и позволяет внутреннему компоненту проходить в интактном виде в двенадцатиперстную кишку или задерживать его высвобождение. Для таких энтеросолюбильных слоев или покрытий можно применять различные материалы, при этом такие материалы включают ряд полимерных кислот и смеси полимерных кислот с такими материалами, как шеллак, цетиловый спирт и ацетат целлюлозы. К подходящим поверхностно-активным веществам относятся, в частности, неионогенные средства, такие как полиоксиэтиленсорбитаны (например, Tween™ 20, 40, 60, 80 или 85) и другие сорбитаны (например, Span™ 20, 40, 60, 80 или 85). Композиции с поверхностно-активным веществом обычно будут содержать от 0,05 до 5% поверхностно-активного вещества и могут содержать от 0,1 до 2,5%. Понятно, что при необходимости могут быть добавлены и другие ингредиенты, например, маннит или другие фармацевтически приемлемые наполнители.

Подходящие эмульсии можно получить с применением коммерчески доступных жировых эмульсий, таких как Intralipid™, Liposyn™, Infonutrol™, Lipofundin™ и Lipiphysan™. Активный ингредиент может быть либо растворен в предварительно смешанной эмульсионной композиции, либо, альтернативно, он может быть растворен в масле (например, соевом масле, сафлоровом масле, хлопковом масле, кунжутном масле, кукурузном масле или миндальном масле) и эмульсии, полученной при смешивании с фосфолипидом (например, фосфолипидами яиц, фосфолипидами сои или соевым лецитином) и воды. Понятно, что могут быть добавлены и другие ингредиенты, например глицерин или глюкоза, для регулирования тоничности эмульсии. Подходящие эмульсии обычно будут содержать до 20% масла, например от 5 до 20%.

Эмульсионные композиции могут представлять собой такие, которые получены путем смешивания антитела к промиостатину с Intralipid™ или его компонентами (соевым маслом, фосфолипидами яйца, глицерином и водой).

К фармацевтическим композициям для ингаляции или инсуффляции относятся растворы и суспензии в фармацевтически приемлемых, водных или органических растворителях или их смесях и порошки. Жидкие или твердые композиции могут содержать подходящие фармацевтически приемлемые вспомогательные средства, которые указаны выше. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композиции вводят пероральным или через носовой дыхательный путь для локального или системного эффекта.

Композиции в предпочтительно стерильных фармацевтически приемлемых растворителях можно распылять с применением газов. Распыленные растворы можно вдыхать непосредственно из устройства для распыления, или устройство для распыления можно прикрепить к маске для лица, палатке или дыхательному аппарату с положительным перемежающимся давлением. Раствор, суспензию или порошкообразные композиции можно вводить, предпочтительно перорально или назально, из устройств, которые соответствующим образом доставляют состав.

Применение антител к про-/латентному миостатину для лечения заболеваний/нарушений.

Описанные в настоящем документе антитела к про-/латентному миостатину эффективны при лечении ассоциированного с миопатией заболевания или нарушения. Применяемый в контексте настоящего документа термин "миопатия" относится к мышечному заболеванию, при котором мышечные волокна не функционируют должным образом, что обычно приводит к слабости мышц. К миопатиям относят мышечные заболевания, которые являются по своей природе нервномышечными или скелетномышечными. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления миопатия представляет собой наследственную миопатию. К наследственным миопатиям относят, без ограничения, дистрофии, миотонии, врожденные миопатии (например, непрогрессирующую врожденную нитеобразную миопатию, много-/министержевую миопатию и центроядерную миопатию), митохондриальные миопатии, семейные периодические миопатии, воспалительные миопатии и метаболические миопатии (например, болезнь накопления гликогена и нарушение накопления липидов). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления миопатия представляет собой приобретенную миопатию. К приобретенным миопатиям относят, без ограничения, миопатию, индуцированную внешним веществом (например, миопатию, индуцированную лекарственным средством, и глюкокортикоидную миопатию, алкогольную миопатию и миопатию из-за других токсичных средств), миозит (например, дерматомиозит, полимиозит и миозит с включенными тельцами), оссифицирующий миозит, рабдомиолиз и миоглобинурии, а также дисфунк-

циональную атрофию. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления миопатия представляет собой дисфункциональную атрофию, которая может быть вызвана переломом кости (например, переломом шейки бедра) или повреждением нерва (например, травмой спинного мозга (SCI)). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления миопатия связана с таким заболеванием или нарушением, как амиотрофический боковой склероз (ALS), спинальная мышечная атрофия (SMA), кахектические синдромы из-за почечной недостаточности, СПИДа, состояний при сердечной недостаточности и/или злокачественной опухоли. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления миопатия связана со старением.

Один аспект настоящего изобретения относится к способу лечения субъекта с миопатией, причем способ предусматривает введение субъекту эффективного количества описанного выше антитела. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления миопатия является первичной миопатией. В соответствии с другим вариантом осуществления первичная миопатия включает дисфункциональную атрофию. В соответствии с другими вариантами осуществления дисфункциональная атрофия ассоциирована с переломом шейки бедра, элективной заменой сустава, критическим состоянием при миопатии, повреждением спинного мозга или инсультом. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления миопатия является вторичной миопатией, при которой дистрофия мышечной ткани является вторичной на фоне связанной с заболеванием патологии. В соответствии с другими вариантами осуществления вторичная миопатия включает денервацию, генетическую мышечную слабость или кахексию. В соответствии с другим вариантом осуществления вторичная миопатия является денервацией, ассоциированной с амиотрофическим боковым склерозом или спинальной мышечной атрофией. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления вторичная миопатия представляет собой генетическую мышечную слабость, ассоциированную с мышечной дистрофией. В соответствии с другими вариантами осуществления вторичная миопатия представляет собой кахексию, ассоциированную с почечной недостаточностью, СПИДом, состоянием при сердечной недостаточности, злокачественной опухолью или старением.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу лечения субъекта с заболеванием или состоянием, связанным со старением. К иллюстративным заболеваниям и состояниям, связанным со старением, относятся, без ограничения, саркопения (возрастная потеря массы мышц), дряхлость и андрогенная недостаточность.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу лечения субъекта с заболеванием или состоянием, связанным с дисфункциональной атрофией/травмой. К иллюстративным заболеваниям и состояниям, связанным с дисфункциональной атрофией/травмой, относятся, без ограничения, мышечная слабость, связанная со временем, проведенным в отделении интенсивной терапии (ICU), замена бедра/сустава, перелом шейки бедра, инсульт, постельный режим, SCI, повреждение мышцы-вращателя плеча, протезирование коленного сустава, перелом кости и ожоги.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу лечения субъекта с нейродегенеративным заболеванием или состоянием. К иллюстративным нейродегенеративным заболеваниям или состояниям относятся, без ограничения, спинальная мышечная атрофия и амиотрофический боковой склероз (ALS).

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу лечения субъекта с заболеванием или состоянием, связанным с кахексией. К иллюстративным заболеваниям и состояниям, связанным с кахексией, относятся, без ограничения, злокачественная опухоль, хроническая сердечная недостаточность, синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД), хроническое обструктивное заболевание легких (COPD) и хроническое заболевание почек (CKD).

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу лечения субъекта с заболеванием или состоянием, связанным с редкими заболеваниями. К иллюстративным редким заболеваниям и состояниям относятся, без ограничения, несовершенный остеогенез, спорадический миозит с включенными тельцами и острый лимфобластный лейкоз.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу лечения субъекта с заболеванием или состоянием, связанным с метаболическим нарушением и/или конституцией организма. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления заболевание или состояние представляет собой ожирение (например, тяжелое ожирение), синдром Прадера-Вилли, сахарный диабет II типа или анорексию. Однако, дополнительные заболевания или состояния относятся к метаболическим нарушениям и/или конституции организма будут понятными специалисту в настоящей области и находятся в рамках объема настоящего изобретения.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу лечения субъекта с заболеванием или состоянием, связанным с врожденными миопатиями. К иллюстративным врожденным миопатиям относятся, без ограничения, сцепленная с X-хромосомой миотубулярная миопатия, аутосомно-доминантная центроядерная миопатия, аутосомно-рецессивная центроядерная миопатия, непрогрессирующая врожденная нитеобразная миопатия и врожденная миопатия с диспропорцией волокон.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу лечения субъекта с заболеванием или состоянием, связанным с мышечными дистрофиями. К иллюстративным мышечным дистрофиям относятся, без ограничения, дистрофия Дюшенна, болезнь Беккера, фациоскапулохумеральная (FSH) и тазо-

во-плечевая мышечные дистрофии.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу лечения субъекта с урогинекологическим заболеванием или состоянием, ларингологическим нарушением (стеноз), экстраокулярной миопатией, синдромом запястного канала, синдромом Гийена-Барре или остеосаркомой.

Для осуществления на практике описанного в настоящем документе способа эффективное количество описанной выше фармацевтической композиции можно вводить нуждающемуся в лечении субъекту (например, человеку) подходящим путем, таким как внутривенное введение, например, в виде струйного введения или непрерывной инфузией в течение определенного периода времени, внутримышечный, внутривнутренний, внутричерепной, подкожный, интраартикулярный, внутрисуставной, интратекальный, пероральный, ингаляционный или местный пути. Для введения пригодны коммерчески доступные распылители для жидких составов, включая струйные распылители и ультразвуковые распылители. Жидкие составы могут быть распылены непосредственно, а лиофилизированный порошок можно распылить после ресуспендирования. В качестве альтернативы антитела к про-/латентному миостатину можно распылить в аэрозоль с применением фторуглеродного состава и дозирующего ингалятора или вдыхать в виде лиофилизированного и измельченного порошка.

Субъект, подлежащий лечению описанными в настоящем документе способами, может представлять собой млекопитающее, более предпочтительно человека. К млекопитающим относятся, без ограничения, сельскохозяйственные животные, спортивные животные, домашние животные, приматы, лошади, собаки, кошки, мыши и крысы. Субъект-человек, который нуждается в лечении, может быть пациентом-человеком, состоящим в группе риска или имеющим подозрение на наличие ассоциированного с миопатией заболевания/нарушения, такого как указанные выше. Субъекта с заболеванием или нарушением, ассоциированным с про-/латентным миостатином, можно выявить с помощью обычного медицинского обследования, например лабораторных анализов, функциональных тестов органов, компьютерной томографии или ультразвука. У субъекта с подозрением на наличие какого-либо из таких заболеваний/нарушений могут проявляться один или несколько симптомов заболевания/нарушения. Субъект, состоящий в группе риска развития заболевания/нарушения, может быть субъектом с одним или несколькими факторами риска развития такого заболевания/нарушения.

Применяемое в контексте настоящего документа выражение "эффективное количество" относится к количеству каждого активного средства, необходимому для оказания терапевтического эффекта на субъекта, либо отдельно, либо в комбинации с одним или несколькими другими активными средствами. Эффективные количества варьируют, как известно специалистами в настоящей области техники, в зависимости от конкретного подвергаемого лечению состояния, тяжести состояния, индивидуальных параметров пациента, в том числе возраста, физического состояния, размера, пола и веса, продолжительности лечения, природы параллельной терапии (при наличии), конкретного пути введения и подобных факторов, которые известны практикующему врачу. Эти факторы хорошо известны специалистам в настоящей области и могут быть выяснены путем постановки простейшего эксперимента. В целом предпочтительно применять максимальную дозу отдельных компонентов или их комбинаций, т.е. наивысшую безопасную дозу с медицинской точки зрения. Тем не менее специалистам в настоящей области техники будет понятно, что пациент может настаивать на более низкой дозе или переносимой дозе по медицинским причинам, психологическим причинам или практически по любым другим причинам. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления эффективное количество относится к количеству антитела или его антигенсвязывающей части, которое является достаточным для уменьшения или облегчения тяжести и/или продолжительности нарушения или одного или нескольких симптомов, для предупреждения прогрессирования нарушения, для начала регрессии нарушения, для предупреждения рецидива, развития, начала или прогрессирования одного или нескольких симптомов, ассоциированных с нарушением, для обнаружения нарушения или для усиления или улучшения профилактического или терапевтического эффекта(эффектов) другой терапии (например, профилактического или терапевтического средства).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления в контексте введения антитела к про-/латентному миостатину субъекту эффективное количество представляет собой количество, эффективное для увеличения массы целевой мышцы у субъекта по сравнению с массой контрольной мышцы. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления увеличение массы мышцы является увеличением по меньшей мере в 1,1 раза, по меньшей мере в 1,2 раза, по меньшей мере в 1,3 раза, по меньшей мере в 1,4 раза, по меньшей мере в 1,5 раза, по меньшей мере в 1,6 раза, по меньшей мере в 1,7 раза, по меньшей мере в 1,8 раза, по меньшей мере в 1,9 раза, по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 5 раз или более по сравнению с массой контрольной мышцы. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления увеличение массы мышцы является увеличением в диапазоне от 1-кратного до 5-кратного, от 2-кратного до 10-кратного, от 1-кратного до 1,5-кратного, от 1-кратного до 2-кратного и т.д. по сравнению с массой контрольной мышцы.

Применяемый в контексте настоящего документа термин "масса контрольной мышцы" относится к эталонному стандарту, пригодному для оценки эффектов состояния (например, лечения антителом к про-/латентному миостатину), оказываемых на массу целевой мышцы у субъекта. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления масса контрольной мышцы является заранее определенным значени-

ем. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления массу контрольной мышцы определяют экспериментально. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления масса контрольной мышцы является массой целевой мышцы у субъекта, которому не было введено антитело к про-/латентному миостатину. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления масса контрольной мышцы является массой (например, средней массой) целевой мышцы в группе субъектов, которым не было введено антитело к про-/латентному миостатину. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления масса контрольной мышцы является массой целевой мышцы у субъекта перед (например, непосредственно перед) введением антитела к про-/латентному миостатину. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления масса контрольной мышцы представляет собой массу целевой мышцы у субъекта, которому было введено вместо антитела к про-/латентному миостатину нормальное антитело (например, того же изотипа, что и антитело к про-/латентному миостатину), которое было получено от животного, которое не было подвергнуто воздействию антигена, на который направлено антитело к про-/латентному миостатину. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления масса контрольной мышцы представляет собой массу целевой мышцы у субъекта, которому вместо антитела к про-/латентному миостатину был введен наполнитель, например солевой раствор.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления в контексте введения антитела к про-/латентному миостатину субъекту, эффективное количество представляет собой количество, эффективное для увеличения способности производить усилие (например, производить максимальное усилие, которое определено *in vitro* с помощью системы рычагов для исследования мышечной деятельности, снабженной ванной для горизонтальной перфузии) целевой мышцы у субъекта по сравнению с контрольной способностью производить усилие. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления увеличением способности производить усилие является увеличение по меньшей мере в 1,1 раза, по меньшей мере в 1,2 раза, по меньшей мере в 1,3 раза, по меньшей мере в 1,4 раза, по меньшей мере в 1,5 раза, по меньшей мере в 1,6 раза, по меньшей мере в 1,7 раза, по меньшей мере в 1,8 раза, по меньшей мере в 1,9 раза, по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 5 раз или более по сравнению с контрольной способностью производить усилие. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления увеличением способности производить усилие является увеличение в диапазоне от 1-кратного до 5-кратного, от 2-кратного до 10-кратного, от 1-кратного до 1,5-кратного, от 1-кратного до 2-кратного и т.д. по сравнению с контрольной способностью производить усилие.

Применяемый в контексте настоящего документа термин "контрольная способность производить усилие" относится к эталонному стандарту, пригодному для оценки эффектов состояния (например, лечения антителом к про-/латентному миостатину) на способность производить усилие мышцей у субъекта. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления контрольная способность производить усилие является заранее определенным значением. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления контрольную способность производить усилие определяют экспериментально. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления способность производить усилие представляет собой способность производить усилие целевой мышцей у субъекта, которому не было введено антитело к про-/латентному миостатину. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления способность производить усилие представляет собой способность производить усилие (например, средняя способность производить усилие) целевой мышцей в популяции субъектов, которым не было введено антитело к про-/латентному миостатину. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления способность производить усилие представляет собой способность производить усилие целевой мышцей у субъекта перед (например, непосредственно перед) введением антитела к про-/латентному миостатину. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления способность производить усилие представляет собой способность производить усилие целевой мышцей у субъекта, которому было введено вместо антитела к про-/латентному миостатину нормальное антитело (например, того же изотипа, что и антитело к про-/латентному миостатину), которое было получено от животного, которое не было подвергнуто воздействию антигена, на который направлено антитело к про-/латентному миостатину. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления способность производить усилие представляет собой способность производить усилие целевой мышцей у субъекта, которому вместо антитела к про-/латентному миостатину был введен наполнитель, например, солевой раствор.

При определении дозы, как правило, будут иметь такие эмпирические факторы, как период полужизни. Например, для продления периода полужизни антитела и для предупреждения атаки антителом иммунной системой хозяина можно применять антитела, которые совместимы с иммунной системой человека, такие как гуманизированные антитела или полностью человеческие антитела. Частоту введения можно определить и корректировать на протяжении курса терапии, и, как правило, но необязательно, в ее основе лежит лечение, и/или подавление, и/или облегчение, и/или задержка развития ассоциированного с миопатией заболевания/нарушения. В качестве альтернативы могут подойти составы с замедленным постоянным высвобождением антитела к про-/латентному миостатину. Специалистам в настоящей области техники будут очевидны различные составы и устройства для достижения замедленного высвобождения, и они входят в объем настоящего изобретения.

В одном примере дозы антитела к про-/латентному миостатину, которое описано в настоящем до-

кументе, можно определить эмпирически у индивидуумов, которым было произведено одно или несколько введений антитела. Индивидуумам дают нарастающие дозы антагониста. Для оценки эффективности антагониста можно отслеживать показатель заболевания/нарушения.

Обычно для введения любого из описанных в настоящем документе антител исходная кандидатная доза может составлять приблизительно 2 мг/кг. В контексте настоящего описания типичная суточная доза может варьировать от приблизительно любой из 0,1, до 3, до 30, до 300, до 3, до 30, до 100 мг/кг или более, в зависимости от упомянутых выше факторов. При повторных введениях в течение нескольких дней или дольше, в зависимости от состояния, лечение продолжают до тех пор, пока не произойдет требуемое подавление симптомов или пока не будут достигнуты достаточные терапевтические уровни для облегчения заболевания или нарушения, ассоциированного с про-/латентным миостатином, или его симптома. Иллюстративный режим введения доз предусматривает введение начальной дозы приблизительно 2 мг/кг с последующей еженедельной поддерживающей дозой приблизительно 1 мг/кг антитела или с последующей поддерживающей дозой приблизительно 1 мг/кг раз в две недели. Тем не менее могут подойти и другие режимы введения доз, в зависимости от картины фармакокинетического распада, которую хочет достичь практикующий врач. Например, предусмотрено введение доз от одного-четырех раз в неделю. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления можно применять дозировку, варьирующую от приблизительно 3 мкг/кг до приблизительно 2 мг/кг (такую как приблизительно 3, приблизительно 10, приблизительно 30, приблизительно 100, приблизительно 300 мкг/кг, приблизительно 1 и приблизительно 2 мг/кг). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления частота введения доз составляет один раз в неделю, в 2 недели, в 4 недели, в 5 недель, в 6 недель, в 7 недель, в 8 недель, в 9 недель или в 10 недель или один раз в месяц, в 2 месяца или в 3 месяца, в 4 месяца, в 5 месяцев, в 6 месяцев, в 8 месяцев, в 10 месяцев, в год или реже. Прогресс такой терапии легко отслеживать с помощью обычных методик и анализов. Режим введения доз (в том числе применяемого антитела) можно изменять со временем.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления взрослому пациенту с нормальным весом можно вводить дозы в диапазоне от 0,3 до 5,00 мг/кг. Конкретный режим введения доз, например доза, интервалы и периодичность, будет зависеть от конкретного индивидуума и истории болезни этого индивидуума, а также от свойств отдельных средств (таких как период полужизни средства и других соответствующих факторов).

В контексте настоящего изобретения соответствующая доза антитела к про-/латентному миостатину будет зависеть от конкретного используемого антитела (или композиций с ним), типа и тяжести заболевания/нарушения, независимо от того, вводят ли антитело с профилактической или терапевтической целью, предыдущей терапии, истории болезни пациента и ответа на антагонист, а также усмотрение лечащего врача. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления врач-клиницист будет вводить антитело к про-/латентному миостатину до тех пор, пока не будет достигнута доза, которая приведет к требуемому результату. Введение антитела к про-/латентному миостатину может быть непрерывным или периодическим, в зависимости, например, от физиологического состояния реципиента, является ли введение терапевтическим или профилактическим и других факторов, известных практикующим специалистам. Введение антитела к про-/латентному миостатину может быть фактически непрерывным в течение предварительно выбранного периода времени или может быть в виде серии вводимых через некоторый промежуток времени доз, например, до, во время или после развития заболевания или нарушения, ассоциированного с про-/латентным миостатином.

Применяемый в контексте настоящего документа термин "лечение" относится к применению или введению композиции, включающей один или несколько активных средств, субъекту, который имеет заболевание/нарушение, ассоциированное с миопатией, симптом заболевания/нарушения или предрасположенность к заболеванию/нарушению, с целью излечения, исцеления, смягчения, ослабления, изменения, устранения, облегчения, уменьшения, воздействия на нарушение, симптом заболевания или предрасположенность к заболеванию/нарушению.

Смягчение заболевания/нарушения, ассоциированного с про-/латентным миостатином, включает задержку развития или прогрессирования заболевания или уменьшение тяжести заболевания. Для смягчения заболевания не обязательно должны быть достигнуты лечебные результаты. Применяемая в контексте настоящего документа "задержка" развития заболевания/нарушения, ассоциированного с про-/латентным миостатином, означает перенесение начала, затруднение развития, замедление, торможение, стабилизацию и/или отдаление прогрессирования заболевания. Эта задержка может быть разной продолжительности, в зависимости от истории болезни и/или подлежащих лечению индивидуумов. Способ, с помощью которого "задерживают" или облегчают развитие заболевания или задерживают начало заболевания, представляет собой способ, с помощью которого уменьшают вероятность развития одного или нескольких симптомов заболевания в заданный период времени и/или уменьшают степень выраженности симптомов в заданный период времени по сравнению с тем, когда не применяют данный способ. Такие сравнения обычно основаны на клинических исследованиях с применением некоторого числа субъектов, достаточного для получения статистически значимого результата.

"Развитие" или "прогрессирование" заболевания означает начальные проявления и/или последую-

шее прогрессирование заболевания. Развитие заболевания можно обнаружить и оценить с помощью стандартных клинических методик. Тем не менее развитие также относится к прогрессированию, которое может не поддаваться обнаружению. В контексте настоящего изобретения развитие или прогрессирование относится к биологическому течению симптомов. "Развитие" включает возникновение, рецидив и начало. Применяемый в контексте настоящего документа термин "начало" или "возникновение" заболевания/нарушения, ассоциированного с миопатией, включает первое начало и/или рецидив.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления описанное в настоящем документе антитело к про-/латентному миостатину вводят нуждающемуся в лечении субъекту в количестве, достаточном для ингибирования протеолитической активации про-/латентного миостатина в активный миостатин по меньшей мере на 20% (например, на 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90% или более) *in vivo*. В соответствии с другими вариантами осуществления антитело вводят в количестве, эффективном для уменьшения уровня про-/латентного миостатина или латентного миостатина по меньшей мере на 20% (например, на 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90% или более).

Для введения фармацевтической композиции субъекту можно применять традиционные способы, известные специалистам в области медицины, в зависимости от типа подлежащего лечению заболевания или места заболевания. Эту композицию также можно вводить другими традиционными путями, например вводить перорально, парентерально, посредством ингаляционного спрея, применять местно, ректально, назально, трансбуккально, вагинально или через имплантируемый резервуар. Применяемый в контексте настоящего документа термин "парентеральный" включает методики подкожной, внутрикожной, внутривенной, внутримышечной, интраартикулярной, внутриартериальной, внутрисуставной, интратеральной, интратекальной, внутриочаговой и внутричерепной инъекции или инфузии. Кроме того, ее можно вводить субъекту через инъекционные депо-пути введения, например, с помощью 1-, 3- или 6-месячных инъекционных или биоразлагаемых депо-материалов и способов.

Инъекционные композиции могут содержать различные носители, такие как растительные масла, диметилаксамид, диметилформамид, этиллактат, этилкарбонат, изопропилмиристат, этанол и полиолы (глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль и др.). При внутривенной инъекции водорастворимые антитела можно вводить способом капельного введения, посредством которого инфузионно вводят фармацевтический состав, содержащий антитело и физиологически приемлемые вспомогательные средства. Физиологически приемлемые вспомогательные средства могут включать, например, 5% декстрозу, 0,9% солевой раствор, раствор Рингера или другие подходящие вспомогательные средства. Внутримышечные препараты, например стерильный состав с подходящей растворимой солевой формой антитела, можно растворять и вводить в фармацевтическом вспомогательном средстве, таком как вода для инъекций, 0,9% солевой раствор или 5% раствор глюкозы.

В соответствии с одним вариантом осуществления антитело к про-/латентному миостатину вводят с помощью сайт-специфических или целенаправленных методик локальной доставки. К примерам сайт-специфических или целенаправленных методик локальной доставки относятся различные имплантируемые депо-источники антитела к про-/латентному миостатину или катетеры локальной доставки, такие как инфузионные катетеры, постоянный катетер или игольчатый катетер, синтетические трансплантаты, адвентициальные оболочки, шунты и стенты или другие имплантируемые устройства, сайт-специфические носители, прямая инъекция или прямое нанесение. См., например, публикацию РСТ № WO 00/53211 и патент США № 5981568.

Также можно применять целенаправленную доставку терапевтических композиций, содержащих полинуклеотид или вектор экспрессии. Методики опосредованной рецептором доставки ДНК описаны, например, в работах Findeis et al., *Trends Biotechnol.* (1993), 11:202; Chiou et al., *Gene Therapeutics: Methods And Applications Of Direct Gene Transfer* (J.A. Wolff, ed.) (1994); Wu et al., *J. Biol. Chem.* (1988), 263:621; Wu et al., *J. Biol. Chem.* (1994) 269:542; Zenke et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1990), 87:3655; Wu et al., *J. Biol. Chem.* (1991), 266:338.

Терапевтические композиции, содержащие полинуклеотид (например, кодирующие описанные в настоящем документе антитела к про-/латентному миостатину), вводят в диапазоне от приблизительно 100 нг до приблизительно 200 мг ДНК для локального введения по протоколу генной терапии. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления диапазоны концентраций от приблизительно 500 нг до приблизительно 50 мг, от приблизительно 1 мкг до приблизительно 2 мг, от приблизительно 5 до приблизительно 500 мкг и от приблизительно 20 до приблизительно 100 мкг ДНК или более также можно применять в ходе осуществления протокола генной терапии.

Терапевтические полинуклеотиды и полипептиды, описанные в настоящем документе, можно доставить с помощью средств генной доставки. Средство генной доставки может иметь вирусное или невирусное происхождение (см., в целом, Jolly, *Cancer Gene Therapy* (1994), 1:51; Kimura, *Human Gene Therapy* (1994) 5:845; Connelly, *Human Gene Therapy* (1995), 1:185 и Kaplitt, *Nature Genetics* (1994), 6:148). Экспрессию таких кодирующих последовательностей можно индуцировать с помощью эндогенных или гетерологичных промоторов и/или энхансеров млекопитающих. Экспрессия кодирующей последовательности может быть либо конститутивной, либо регулируемой.

В объем настоящего изобретения входят подходящие вирусные векторы для доставки требуемого

полинуклеотида (например, кодирующего раскрываемое в настоящем документе антитело) и экспрессия в требуемой клетке. К иллюстративным вирусным средствам доставки относятся, без ограничения, рекомбинантные ретровирусы (см., например, РСТ публикации № WO 90/07936; WO 94/03622; WO 93/25698; WO 93/25234; WO 93/11230; WO 93/10218; WO 91/02805; патенты США № 5219740 и 4777127; патент GB № 2200651 и патент EP № 0345242), векторы на основе альфавируса (например, векторы на основе вируса Синдбис, вирус леса Семлики (ATCC VR-67; ATCC VR-1247), вирус реки Росс (ATCC VR-373; ATCC VR-1246) и вирус венесуэльского энцефалита лошадей (ATCC VR-923; ATCC VR-1250; ATCC VR 1249; ATCC VR-532)) и векторы на основе аденоассоциированного вируса (AAV) (см., например, РСТ публикации № WO 94/12649, WO 93/03769; WO 93/19191; WO 94/28938; WO 95/11984 и WO 95/00655). Также можно использовать введение ДНК, связанной с инактивированным аденовирусом, как описано у Curiel, Hum. Gene Ther. (1992), 3:147.

Также можно использовать невирусные средства и способы доставки, включая, без ограничения, поликатионную конденсированную ДНК, связанную или не связанную с инактивированным аденовирусом (см., например, Curiel, Hum. Gene Ther. (1992), 3:147); связанную с лигандом ДНК (см., например, Wu, J. Biol. Chem. (1989), 264:16985); эукариотические клетки в качестве средств клеточной доставки (см., например, патент США № 5814482; РСТ публикации № WO 95/07994, WO 96/17072, WO 95/30763 и WO 97/42338) и нейтрализацию заряда или слияние нуклеиновой кислоты с клеточными мембранами. Также можно использовать "голую" ДНК. Иллюстративные способы внесения "голой" ДНК описаны в РСТ публикации № WO 90/11092 и патенте США № 5580859. Липосомы, которые могут выполнять роль средств генной доставки, описаны в патенте США № 5422120; РСТ публикациях № WO 95/13796, WO 94/23697, WO 91/14445 и патенте EP № 0524968. Дополнительные подходы описаны в работе Philip, Mol. Cell. Biol. (1994), 14:2411 и в работе Woffendin, Proc. Natl. Acad. Sci. (1994), 91:1581.

Конкретный режим введения доз, например доза, интервалы и периодичность, применяемый в описанном в настоящем документе способе, будет зависеть от конкретного субъекта и истории болезни такого субъекта.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления нуждающемуся в лечении субъекту можно вводить более одного антитела к про-/латентному миостатину или комбинацию антитела к про-/латентному миостатину и другого подходящего терапевтического средства. Антагонист может быть того же типа или отличаться. Антитело к про-/латентному миостатину можно также применять в сочетании с другими средствами, которые предназначены для усиления и/или дополнения эффективности средств.

Эффективность лечения заболевания/нарушения, ассоциированного с миопатией, можно оценить с помощью любых подходящих способов. Например, эффективность лечения заболевания/нарушения, ассоциированного с миопатией, можно оценить путем оценки слабости мышц (например, оценки структуры и степени слабости), электромиографии, оценки химического состава крови (например, оценки электролитов, оценки эндокринных причин, измерения уровня креатининкиназы, определения скорости седиментации эритроцитов и проведения анализов на антинуклеарное антитело) и оценки биоптатов (например, гистологическим, гистохимическим, электронно-микроскопическим, биохимическим и генетическим анализом).

Наборы для применения при облегчении ассоциированных с миопатией заболеваний/нарушений.

Настоящее изобретение также относится к наборам для применения при облегчении ассоциированных с миопатией заболеваний/нарушений. Такие наборы могут включать одну или несколько емкостей, содержащих антитело к про-/латентному миостатину, например любое из описанных в настоящем документе.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления набор может содержать инструкции по применению в соответствии с любым из описанных в настоящем документе способов. Включенные инструкции могут содержать описание введения антитела к про-/латентному миостатину для лечения, задержки начала или облегчения целевого заболевания, как описано в настоящем документе. Набор может дополнительно содержать описание выбора индивидуума, подходящего для лечения, на основании выявления того, есть ли у такого индивидуума целевое заболевание. В соответствии с другими вариантами осуществления инструкции содержат описание введения антитела индивидууму, находящемуся в группе риска возникновения целевого заболевания.

Инструкции, касающиеся применения антитела к про-/латентному миостатину, обычно включают информацию о дозировке, схеме введения доз и пути введения для предполагаемого лечения. Емкости могут представлять собой емкости с однократной дозой, многодозовые упаковки (например, пакеты с множеством доз) или емкости с субъединицами доз. Инструкции, поставляемые в наборах по настоящему изобретению, обычно представляют собой письменные инструкции на этикетке или листок-вкладыш в упаковке (например, лист бумаги, включенный в набор), но также приемлемы машиночитаемые инструкции (например, инструкции, которые хранятся на магнитном или оптическом диске).

На этикетке или листке-вкладыше указано, что композицию применяют для лечения, задержки начала и/или облегчения заболевания или нарушения, ассоциированного с миопатией. Могут быть приведены инструкции по применению на практике любого из описанных в настоящем документе способов.

Наборы по настоящему изобретению находятся в подходящей упаковке. К подходящей упаковке относятся, без ограничения, флаконы, бутылки, банки, гибкая упаковка (например, герметичные майларовые или пластиковые пакеты) и тому подобное. Также предусмотрены упаковки для применения в комбинации с конкретным устройством, таким как ингалятор, устройство для назального введения (например, аэрозольный ингалятор) или инфузионное устройство, такое как мини-помпа. Набор может иметь стерильное отверстие (например, емкость может представлять собой пакет для внутривенного раствора или флакон с пробкой, прокалываемой иглой для подкожной инъекции). Емкость также может иметь стерильное отверстие (например, емкость может представлять собой пакет для внутривенного раствора или флакон с пробкой, прокалываемой иглой для подкожной инъекции). По меньшей мере одно активное средство в композиции представляет собой описанное в настоящем документе антитело к про-/латентному миостатину.

В наборах необязательно могут быть дополнительные компоненты, такие как буферы и пояснительная информация. Как правило, набор содержит емкость и этикетку или листок-вкладыш (листки-вкладыши) на емкости или ассоциированные с емкостью. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к изделиям, содержащим содержимое описанных выше наборов.

Анализ для детекции про-/латентного миостатина.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления представленные в настоящем документе способы и композиции относятся к способу детекции про-/латентного миостатина в полученном от субъекта образце. Применяемый в контексте настоящего документа термин "субъект" относится к отдельному организму, например отдельному млекопитающему. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления субъектом является человек. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления субъектом является отличное от человека млекопитающее. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления субъектом является отличный от человека примат. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления субъектом является грызун. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления субъектом является баран, коза, крупный рогатый скот, кошка или собака. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления субъектом является позвоночное, амфибия, рептилия, рыба, насекомое, муха или нематода. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления субъектом является исследуемое животное. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления субъект получен методами генной инженерии, например генетически модифицированный методами генной инженерии отличный от человека субъект. Субъект может быть любого пола и на любом этапе развития. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления субъектом является пациент или здоровый доброволец.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления способ детекции про-/латентного миостатина в полученном от субъекта образце предусматривает (а) приведение в контакт образца с антителом к про-/латентному миостатину в условиях, подходящих для связывания антитела с антигеном, если антиген присутствует в образце, тем самым образуя комплексы связывания; и (b) определение уровня антитела или антигенсвязывающего фрагмента, связанного с антигеном (например, определение уровня комплексов связывания).

Применяемый в контексте настоящего документа комплекс связывания относится к биомолекулярному комплексу антитела (в том числе антигенсвязывающих фрагментов), связанного с антигеном (например, белком, про-/латентным миостатином). Комплексы связывания могут содержать антитела с одной специфичностью или два или более антитела или антигенсвязывающих фрагментов с различной специфичностью. В соответствии с одним вариантом осуществления комплекс связывания содержит два или более антитела, распознающих различные антигенные сайты на одном и том же антигене. В некоторых случаях антитело может связываться с антигеном при связывании его с другими биомолекулами, такими как РНК, ДНК, полисахариды или белки. В соответствии с одним вариантом осуществления комплекс связывания содержит два или более антитела, распознающих различные антигены. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело в комплексе связывания (например, иммобилизованное антитело, связанное с антигеном) само может быть связано, как и антиген, с антителом (например, поддающимся детекции меченым антителом). Таким образом, комплексы связывания в некоторых случаях могут содержать множество антигенов и множество антител или антигенсвязывающих фрагментов.

Антигены, присутствующие в комплексах связывания, могут быть или не быть в их нативной конформации *in situ*. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления комплекс связывания образуется между антителом и очищенным белковым антигеном или выделенными белками, содержащими антиген, причем антиген не находится в его нативной конформации *in situ*. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления комплекс связывания образуется между антителом и очищенным белковым антигеном, причем антиген не находится в его нативной конформации *in situ* и иммобилизован на твердой подложке (например, PVDF-мембране). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления комплекс связывания образуется с антителом и, например, белком клеточной поверхности, который присутствует *in situ* в нативной конформации (например, на поверхности клетки).

Антитела в комплексах связывания могут содержать или не содержать поддающуюся детекции метку. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления комплексы связывания содержат под-

дающиеся детекции меченые антитела и не содержащие метку антитела. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления комплексы связывания содержат поддающийся детекции меченый антиген. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитела в комплексах связывания иммобилизованы на одной или нескольких твердых подложках. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антигены в комплексах связывания иммобилизованы на одной или нескольких твердых подложках. Иллюстративные твердые подложки раскрыты в настоящем документе и будут очевидны рядовому специалисту в настоящей области техники. Вышеупомянутые примеры комплексов связывания не предназначены для ограничения. Рядовому специалисту в настоящей области техники будут очевидны и другие примеры комплексов связывания.

В любом из способов детекции, диагностики и отслеживания антитела (в том числе антигенсвязывающие фрагменты) или антиген могут быть конъюгированы с поверхностью твердой подложки либо непосредственно, либо опосредованно. Способы конъюгирования с твердыми подложками являются стандартными и могут быть осуществлены посредством ковалентных и нековалентных взаимодействий. К неограничивающим примерам способов конъюгации относятся адсорбция, сшивания, взаимодействия антитела с белком A/G и взаимодействия стрептавидина и биотина. Рядовому специалисту в настоящей области техники будут очевидны и другие способы конъюгации.

В соответствии с некоторыми аспектами способы детекции, диагностики и отслеживания предусматривают сравнение уровня антитела (в том числе антигенсвязывающих фрагментов), связанного с антигеном (например, с про-/латентным миостатином), с одним или несколькими эталонными стандартами. Эталонным стандартом может быть, например, уровень соответствующего про-/латентного миостатина у субъекта, который имеет или не имеет про-/латентный миостатин. В соответствии с одним вариантом осуществления эталонный стандарт представляет собой уровень про-/латентного миостатина, детектируемый в образце, который не содержит про-/латентный миостатин (например, фоновый уровень). В качестве альтернативы фоновый уровень можно определить из образца, который содержит определенный уровень про-/латентного миостатина, путем приведения в контакт образца с неспецифическими антителами (например, антителами, полученными из неиммунной сыворотки крови). Впрочем, эталонным стандартом может быть уровень про-/латентного миостатина, детектируемый в образце, который содержит про-/латентный миостатин (например, положительный контроль). В некоторых случаях эталонный стандарт может представлять собой серию уровней, ассоциированных с различными концентрациями про-/латентного миостатина в образце и пригодных для количественной оценки концентрации про-/латентного миостатина в исследуемом образце. Вышеприведенные примеры эталонных стандартов не являются ограничивающими, и специалисту в настоящей области техники будет сразу очевиден другой подходящий эталонный стандарт. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления уровень антитела, связанного с про-/латентным миостатином, сравнивают с уровнем зрелого миостатина. В некоторых случаях уровень про-/латентного миостатина сравнивают со зрелым миостатином для определения соотношения неактивного к активному миостатину в образце.

Уровень про-/латентного миостатина можно измерить, как предложено в настоящем документе, из биологического образца. Биологический образец относится к любому биологическому материалу, который может быть получен от субъекта или клетки. Например, биологическим образцом может быть цельная кровь, плазма, сыворотка крови, слюна, спинномозговая жидкость, моча, клетки (или клеточный лизат) или ткань (например, нормальная ткань или опухолевая ткань). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления биологический образец представляет собой образец жидкости. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления биологический образец представляет собой образец твердой ткани. Например, образец ткани может включать без ограничения скелетную мышцу, сердечную мышцу, жировую ткань, а также ткань из других органов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления биологический образец представляет собой биоптат. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления образец твердой ткани может быть преобразован в образец жидкости с помощью стандартных в настоящей области способов.

Биологический образец также может включать одну или несколько клеток клеточной линии. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления клеточная линия включает клетки человека, клетки примата (например, клетки vero), клетки крысы (например, клетки GH3, клетки OC23) или клетки мыши (например, клетки MC3T3). Существуют различные линии клеток человека, включая, без ограничения, клетки эмбриональной почки человека (HEK), клетки HeLa, клетки злокачественной опухоли из 60 клеточных линий злокачественных опухолей Национального института онкологии (NCI60), клетки DU145 (злокачественная опухоль предстательной железы), Lncap (клетки злокачественной опухоли предстательной железы), клетки MCF-7 (злокачественная опухоль молочной железы), клетки MDA-MB-438 (злокачественная опухоль молочной железы), клетки PC3 (злокачественная опухоль предстательной железы), клетки T47D (злокачественная опухоль молочной железы), клетки THP-1 (острый миелоидный лейкоз), клетки U87 (глиобластомы), клетки нейробластомы человека SHSY5Y (клонированные из миеломы) и клетки Saos-2 (злокачественная опухоль кости).

Еще один вариант осуществления относится к способу отслеживания заболевания, состояния или любого его лечения (например, миопатии или лечения миопатии) у субъекта, имеющего заболевание или

состояние или подверженного риску его развития, предусматривающему (а) получение биологического образца от субъекта, (b) определение уровня про-/латентного миостатина в биологическом образце с применением антитела, которое детектирует про-/латентный миостатин, и (с) повторение стадий (а) и (b) один или несколько раз. Миостатин применяют в качестве биомаркера атрофии мышц, однако имеющиеся в настоящее время коммерчески доступные способы и реагенты (например, антитела, используемые в ИФА и вестерн-блоттинге) либо не являются специфичными к миостатину, либо детектируют только зрелый миостатин, либо вообще не детектируют миостатин. Таким образом, в настоящем документе предложены способы и реагенты (например, антитела) для детекции про-/латентного миостатина в контексте заболеваний и/или состояний (например, атрофии мышц) с целью диагностики. В качестве одного из примеров, уровень про-/латентного миостатина можно измерять у субъекта или в биологическом образце от него для детекции или отслеживания прогрессирования заболевания или состояния. В качестве другого примера уровень про-/латентного миостатина можно измерять у субъекта или в биологическом образце от него для отслеживания ответа на лечение заболевания или состояния. Следует понимать, что уровень про-/латентного миостатина можно отслеживать в течение любого подходящего периода времени, который может различаться в зависимости от заболевания или состояния, субъекта или любого режима лечения, который может быть назначен субъекту.

Другой вариант осуществления относится к диагностической композиции, содержащей любое из описанных выше антител, антигенсвязывающих фрагментов, полинуклеотидов, векторов или клеток и необязательно подходящих средств для детекции. Антитела, например, пригодны для применения в иммунологических анализах, в которых их можно использовать в жидкой фазе или связанными с твердофазным носителем. Примерами иммунологических анализов, в которых можно использовать антитело, являются конкурентные и неконкурентные иммуноанализы в прямом или опосредованном формате. Примерами таких иммунологических анализов являются иммуноферментный анализ (ИФА), радиоиммуноанализ (RIA), сэндвич-анализ (иммунометрический анализ), проточная цитометрия, вестерн-блоттинг, иммунопреципитационные анализы, иммуногистохимия, иммуномикроскопия, иммунохроматографические анализы с латеральным потоком и протеомные чипы. Антигены и антитела можно связать со многими различными твердыми подложками (например, носителями, мембраной, колонками, протеомным чипом и т. д.). К примерам материалов твердой подложки относятся стекло, полистирол, поливинилхлорид, поливинилидендифторид, полипропилен, полиэтилен, поликарбонат, декстран, нейлон, амилозы, природные и модифицированные целлюлозы, такие как нитроцеллюлоза, полиакриламиды, агарозы и магнетит. Природа подложки может быть либо фиксированной, либо суспендированной в растворе (например, гранулы).

В соответствии с другим вариантом осуществления антитела (в том числе антигенсвязывающие фрагменты), представленные в настоящем документе, также можно применять в способе оценки экспрессии про-/латентного миостатина у субъекта путем получения биологического образца от субъекта, который может представлять собой образец ткани, образец крови или образец любой другой подходящей жидкости организма. Процедура может предусматривать приведение в контакт образца крови (цельной крови, сыворотки крови, плазмы), образца ткани или выделенного из него образца белка с антителом в условиях, обеспечивающих образование комплексов связывания между антителом и антигеном. Затем уровень таких комплексов связывания можно определить любым подходящим способом. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления биологический образец приводят в контакт с антителом в условиях, подходящих для связывания антитела с белком, про-/латентным миостатином, если антиген присутствует в образце, и образования комплексов связывания, состоящих из антитела, связанного с антигеном. Эту стадию приведения в контакт обычно осуществляют в реакционной камере, такой как пробирка, лунка планшета, мембранная ванна, чашка для культивирования клеток, предметное стекло и тому подобное. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело иммобилизовано на твердой подложке. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антиген иммобилизован на твердой подложке. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления твердая подложка представляет собой поверхность реакционной камеры. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления твердая подложка представляет собой полимерную мембрану (например, нитроцеллюлозную полоску, мембрану из поливинилидендифторида (PVDF) и т. д.). Можно применять другие подходящие твердые подложки.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело иммобилизуют на твердой подложке перед приведением в контакт с антигеном. В соответствии с другими вариантами осуществления иммобилизацию антитела осуществляют после образования комплексов связывания. В соответствии с еще одними вариантами осуществления, антиген иммобилизуют на твердой подложке до образования комплексов связывания. В реакционную камеру добавляют детектирующий реагент для детекции иммобилизованных комплексов связывания. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления детектирующий реагент включает поддающееся детекции меченое вторичное антитело к антигену. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления первичное антитело само по себе является поддающимся детекции меченым и таким образом является детектирующим реагентом.

В соответствии с одним аспектом способы детекции предусматривают стадии иммобилизации антител на твердой подложке; нанесения образца (например, биологического образца или образца выде-

ленного белка) на твердую подложку в условиях, которые позволяют связываться антигену с антителами, если они присутствуют в образце; удаления избыточного образца с твердой подложки; нанесение поддающихся детекции меченых антител в условиях, которые позволяют связываться поддающимися детекции меченым антителам с связанными с антигеном иммобилизованными антителами; промывания твердой подложки и анализ на наличие метки на твердой подложке.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антиген иммобилизуют на твердой подложке, такой как PVDF-мембрана, перед приведением в контакт с антителом в реакционной камере (например, мембранной ванне). В реакционную камеру добавляют детектирующий реагент для детекции иммобилизованных комплексов связывания. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления детектирующий реагент включает поддающееся детекции меченое вторичное антитело к антигену. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления детектирующий реагент включает поддающееся детекции меченое вторичное антитело к первичному антителу. Как раскрыто в настоящем документе, поддающаяся детекции метка может представлять собой, например, радиоизотоп, флуорофор, люминесцентную молекулу, фермент, биотиновый фрагмент, метку в виде эпитопа или молекулу красителя. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления первичное антитело само по себе является поддающимся детекции меченым и таким образом является детектирующим реагентом. Подходящие поддающиеся детекции метки описаны в настоящем документе и будут очевидны рядовому специалисту в настоящей области техники.

Соответственно, настоящее изобретение относится к диагностическим наборам, пригодным для домашнего или клинического применения (в службе оказания медицинской помощи), которые содержат (а) поддающиеся детекции меченые и/или не меченые антитела в качестве антигенсвязывающих реагентов (например, реагентов, связывающих про-/латентный миостатин); (b) детектирующий реагент и, необязательно, (c) подробные инструкции по применению реагентов для детекции антигенов в образце. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления диагностический набор включает антитело и/или про-/латентный миостатин, иммобилизованные на твердой подложке. Для включения в диагностические наборы пригодны любые из описанных в настоящем документе твердых подложек. В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления твердая подложка представляет собой поверхность реакционной камеры лунки планшета. Как правило, лунка планшета находится в многолунчном планшете, имеющем некоторое количество лунок, выбранное из 6, 12, 24, 96, 384 или 1536, но без ограничения. В соответствии с другими вариантами осуществления в диагностических наборах присутствует поддающееся детекции меченое антитело. Диагностические наборы не ограничены такими вариантами осуществления, и специалисту в настоящей области техники будут очевидны другие изменения в составе набора.

Таким образом, следующие конкретные варианты осуществления следует истолковывать как просто иллюстративные, а не ограничивающие каким-либо образом остальную часть раскрытия. Все упомянутые в настоящем документе публикации включены посредством ссылок для указанных в настоящем документе целей или предметов изобретения.

Примеры

Пример 1. Создание и отбор антител.

Краткое описание антител.

Ab2 представляет собой полностью человеческое моноклональное антитело изотипа IgG₄/лямбда к про-/латентному миостатину, которое связывается с промиостатином и латентным миостатином человека с высоким сродством ($K_d=3420$ пМ от FortéBio BLI). Антитело может ингибировать протеолитическую активацию про-/латентного миостатина со значениями IC_{50} в 0,5-микромольном диапазоне (что в пределах или вблизи пределов обнаружения с помощью анализа). Теоретическая молекулярная масса полипептида составляет 144736 Да, а его теоретическое значение pI составляет 6,7. Для выявления вариантов с более высокой аффинностью Ab4 и Ab6 проводили оптимизацию аффинности с помощью дисплея антител. Варианты с оптимизированной аффинностью конструировали аналогичным образом на каркасных детерминантах изотипа IgG₄/лямбда человека.

Таблица 2. Биохимические свойства кандидатных антител к про-/латентному миостатину

Антитело	Аффинность (Octet), пМ	Теоретическая MW (Да) *агликозилированное	Расчетное pI
Ab1	4760	144809,8	6,9
Ab2	3420	144735,6	6,7
Ab4	472	144661,7	6,7
Ab6	331	144629,5	6,7

Платформа и выявление исходного антитела.

Исходное антитело Ab1 выявляли путем отбора из библиотеки фагового дисплея интактных анти-

тел с использованием про- и латентного миостатина в качестве первичных антигенов для отбора. Отбор фагов и первоначальный скрининг проводили с применением библиотеки, у которой экспонирован обычный scFv в формате, аналогичном описанному McCafferty et al. (McCafferty et al., 1990). Каждый раунд отбора состоял из предварительной очистки (для удаления неспецифических фаговых антител), инкубации с антигеном, промывки, элюирования и амплификации. Отборы проводили на протяжении нескольких раундов с применением как твердой фазы (биотинилированные антигены, нанесенные на иммунологические пробирки), так и фазы раствора (биотинилированные антигены, захваченные с помощью гранул, покрытых стрептавидином).

Всего в отношении связывания с про- или латентным миостатином было подвергнуто скринингу 10000 отдельных клонов scFv в ходе двух отдельных кампаний. Первая программа предусматривала использование про-/латентного миостатина в качестве антигена, в то время как вторая кампания предусматривала применения латентного миостатина в качестве антигена. Секвенировали ДНК в отношении представляющих интерес клонов scFv, и было выявлено 216 уникальных клонов. Клоны scFv с положительным связыванием были подвергнуты противоскринингу в отношении связывания с proGDF11, а также с панелью неродственных белков для подтверждения специфичности к про-/латентному миостатину. Из этой панели уникальных клонов scFv 101 (из 134 специфичных к GDF8 клонов) были преобразованы в полноразмерный IgG (изотипа IgG₄) для определения дополнительных характеристик.

У полноразмерных антител IgG дополнительно определяли характеристики с помощью ИФА в отношении связывания с человеческими и мышинными про- и латентными формами миостатина и GDF11. Антитела также подвергали скринингу в отношении связывания с продоменом миостатина, proTGFβ (человеческим и мышинным), зрелым фактором роста миостатин, зрелым фактором роста GDF11, фактором роста активин А и проактивин А. Отбирали ведущие антитела по их перекрестной реактивности с про- и латентным человеческим и мышинным миостатином без взаимодействий с белками GDF11, активин или TGFβ.

Использовали две формы анализа количественного измерения связывания с эпитопами. Во-первых, разрабатывали и получали химерные конструкции, у которых были поменяны местами части продоменов миостатина и GDF11. Эти химерные белки анализировали в отношении взаимодействия с антителами для скрининга с помощью ИФА. Анализ количественного измерения связывания с эпитопами проводили с применением прибора FortéBio BLI, в котором биотинилированное антитело к про-/латентному миостатину иммобилизовали на покрытом стрептавидином биосенсорном чипе и оценивали перекрестную блокировку антител по ответу от сенсора. Данные эксперименты по количественному измерению связывания с эпитопами наряду с данными, полученными в ходе ИФА-экспериментов по связыванию, позволяли произвести разделение наших функционально активных ведущих антител (см. ниже) на три различные группы эпитопов (см. табл. 3).

Таблица 3. Ранжирование пяти антител IgG₄ к про-/латентному миостатину

ID клона	Kd proGDF8 (мкМ) (Octet)	IC ₅₀ ² человеческого proGDF8 (мкМ), анализ по гену- репортеру	IC ₅₀ ² мышинного proGDF8 (мкМ), анализ по гену- репортеру	% увеличения массы тела за 6 недель 25 мг/кг/неделя	% увеличения массы нежировых тканей за 4 недели 20 мг/кг/неделя	Степень связывания с эпитопом
Ab1	11,5	0,996	1,46	14,58*	14,1*	1
Ab7	28	0,983	1,68	12,42*	ND	1
Ab8	0,5	6,037	139 ¹	10,33*	7,4	2
Ab9	22	12,16	19,86	7,44	ND	3
Ab10	0,3	0,772	ND	ND	14,3*	1

*Статистическая значимость по однофакторному дисперсионному анализу с критерием Даннета.

Ab8 не связывался с латентным миостатином, только с промиостатином. Препараты мышинного про-/латентного миостатина имели ~40% латентного материала, который уменьшал видимую эффективность в функциональных анализах.

ND: не определено.

Для оценки способности антител связывать и ингибировать активацию про-/латентного миостатина ставили ряд биохимических и клеточных анализов. Кинетику связывания с про- и латентным миостатином измеряли с помощью FortéBio Octet, в котором биотинилированный субстратный белок был иммобилизован на покрытых стрептавидином сенсорных чипах. Равновесные константы диссоциации полученных в результате скрининга кандидатов показаны в табл. 3.

Для измерения способности IgG ингибировать передачу сигнала от миостатина был разработан анализ активации миостатина. Кондиционированная среда от клеток, сверхэкспрессирующих либо mT112 (толоидная протеаза, необходимая для активации миостатина), либо фурин (пропротеиновая конвертаза, которая отщепляет зрелый фактор роста от продомена). После предварительной инкубации с тестируемым антителом про-/латентный миостатин или латентный миостатин инкубировали либо со средой, кондиционированной смесью mT112 и фурином (промиостатин), либо со средой, кондиционированной mT112 (латентный миостатин). После реакции протеолиза в течение ночи высвобождение зрелого фактора роста измеряли с помощью анализа по гену-репортеру CAGA в клетках 293T. Антитела дополнительно проверяли по дозозависимому эффекту в том же анализе, результаты которого приведены в табл. 3.

У пяти исходных антител (табл. 3) наблюдали согласованную сильную селективность и активность во всех вышеприведенных анализах, а затем их отбирали для определения дополнительных характеристик *in vivo* (рассмотрено в примере 2). Для согласованности приведены обобщенные значения связывания и активности этих антител в отношении про-/латентного миостатина, поскольку Ab8 не распознавало латентный миостатин.

Для определения механизма действия кандидатов антител образцы анализировали с помощью вестерн-блоттинга с применением поликлонального антитела, вырабатываемого к продомону миостатина, как показано на фиг. 3. Это позволяло отслеживать фрагмент (выделен рамкой) продомена миостатина, который образуется после отщепления mT112. По мере увеличения концентрации Ab1 наблюдали дозозависимое уменьшение образования данного фрагмента. Из этого эксперимента видно, что действие антител в анализе 1 по степени связывания с эпитопом заключалось в блокировании расщепления про- и латентного миостатина представителями семейства толлоидных протеаз.

Исходя из активности *in vitro* и *in vivo* активных антител к про-/латентному миостатину, Ab1 было выбрано в качестве ведущего антитела для дальнейшей оптимизации, в том числе созревания аффинности, коррекции к последовательности зародышевого типа и анализа возможности промышленного производства.

Оптимизация Ab1.

Для дополнительной оптимизации было выбрано антитело Ab1. Аффинность к про-/латентному миостатину оптимизировали с помощью дрожжевого дисплея. Кроме того, последовательность Ab1 скорректировали к последовательности зародышевого типа для уменьшения потенциальной подверженности иммуногенности положений аминокислот, отличных от аминокислот последовательности зародышевого типа, в каркасных детерминантах переменных участков человека.

Оптимизация аффинности Ab1 с помощью дрожжевого дисплея.

Исходное антитело Ab1 оптимизировали в отношении связывания с про-/латентным миостатином с помощью подхода scFv-дисплея у дрожжей. Вкратце, создавали три различные библиотеки scFv для введения точечных мутаций в выбранные положения CDR на основе частоты встречаемости аминокислот, наблюдаемой в естественных репертуарах человеческих антител, с использованием глубокого секвенирования антител, которое соответствовало человеческим каркасным детерминантам, используемым в Ab1. Каждая библиотека содержала scFv с учетом последовательности Ab1 с одноклеточными мутациями, введенными в каждый CDR, так чтобы каждый вариант полученной в результате тяжелой цепи или легкой цепи имел три полные замены, по одной в каждом CDR. Эти три библиотеки применяли для FACS-сортировки и отбора для выявления пулов клонов с более высокой аффинностью связывания к про-/латентному миостатину (фиг. 23). Прямое связывание экспрессируемых у дрожжей клонов scFv использовали для отбора антител с целью преобразования их в полноразмерный IgG, экспрессируемых в культуре клеток млекопитающих.

Многие из клонов scFv с более высокой аффинностью, выявленные в ходе кампании на дрожжах, содержали замену в положении 28 тяжелой цепи. Для некоторых клонов замена треонина на аспарагин приводила к включению неканонического мотива N-гликозилирования в CDRH1. Поскольку N-гликозилирование в переменном участке антитела может быть нежелательным, любой клон, который содержал мотив гликозилирования, подвергали дополнительной замене так, чтобы он содержал в этом положении аланин.

Кинетику связывания с про- и латентным миостатином затем оценивали с помощью Octet для каждой конструкции с оптимизированной аффинностью и сравнивали с кинетикой связывания у исходного Ab1 (рассмотрено в примере 2). У всех клонов показали значимо повышенную аффинность связывания к миостатину, а два из них, Ab3 и Ab5, были отобраны на основе профиля избирательного связывания относительно GDF11.

Первичная последовательность и остов антител к про-/латентному миостатину.

Ниже показаны результаты выравнивания последовательностей переменных участков исходного Ab1 с его вариантами с оптимизированной аффинностью. Определяющие комплементарность участки (CDR) определены с помощью номенклатуры по Kabat (подчеркнута) и IMGT (жирным шрифтом). Замены относительно исходного Ab1 показаны текстом в нижнем регистре (ниже и на фиг. 24A, 24B).

А. Вариабельный участок тяжелой цепи:

	КАРКАСНЫЙ 1	CDR1	КАРКАСНЫЙ 2
Исходное Ab1	QIQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVA		
Ab3	QIQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAASGFaFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVA		
Ab5	QIQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAASGFaFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVA		
	CDR2	КАРКАСНЫЙ 3	
Исходное Ab1	VISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR		
Ab3	VISYDGSiKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR		
Ab5	VISYDGNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR		
	CDR3	КАРКАСНЫЙ 4	
Исходное Ab1	DLVRFLEWSHYGMDVWGQGT TTVSS (SEQ ID NO: 24)		
Ab3	DLVRFLEWSHkYGMDVWGQGT TTVSS (SEQ ID NO: 26)		
Ab5	DLVRFLEWSHkYGMDVWGQGT TTVSS (SEQ ID NO: 28)		

В. Вариабельный участок легкой цепи:

	КАРКАСНЫЙ 1	CDR1	FRW2
Исходное Ab1	QPVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGSNTVHWYQQLPGTAPKLLIY		
Ab3	QPVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSLSNIGSNTVHWYQQLPGTAPKLLIY		
Ab5	QPVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGgNTVHWYQQLPGTAPKLLIY		
	CDR2	КАРКАСНЫЙ 3	
Исходное Ab1	SDNQRP SGVPDRFSGSKSGTSASLVISGLQSDDEADYYC		
Ab3	SDdQRP SGVPDRFSGSKSGTSASLVISGLQSDDEADYYC		
Ab5	SDdQRP SGVPDRFSGSKSGTSASLVISGLQSDDEADYYC		
	CDR3	КАРКАСНЫЙ 4	
исходное Ab1	AAWDDSLNGVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 30)		
Ab3	AAWDeSLNGVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 32)		
Ab5	AAWDeSLNGVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 34)		

Конструирование антител методами инженерии и обоснование выбора изотипа.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело, пригодное для блокировки миостатина, не будет обладать эффекторной функцией. Поэтому для гуманизированной конструкции был выбран Fc-участок IgG₄. Антитела изотипа IgG₄ плохо связываются с C1q комплемента и, следовательно, не оказывают значительного активирующего действия на комплемент. Эти антитела также слабо связываются с рецепторами Fcγ, что приводит к неэффективной антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (ADCC) или к ее отсутствию.

Чтобы избежать возможного осложнения из-за обмена Fab-плечами, который, как известно, имеет место с нативными mAb IgG₄, были сконструированы методами инженерии Ab1 и его варианты со стабилизирующей мутацией "Adair" (Angal, 1993), при которой серин 228 (нумерация по EU, остаток 241 при нумерации по Kabat) превращается в пролин, что приводит к образованию IgG₄-подобной (CPPCP (SEQ ID NO: 58)) шарнирную последовательность. Сконструированная методами инженерии Fc-последовательность была использована при получении одобренных антител Keytruda, Mylotarg и Tusabri, а также ряда кандидатных mAb, находящихся в настоящее время на поздней стадии клинических испытаний.

Коррекция к последовательности зародышевого типа и оценка риска иммуногенности.

Исходное Ab1 антитело и его варианты представляло собой полностью человеческий IgG₄ (S228P), лямбда антитела, полученные из фагового дисплея. Fc-часть антитела содержала единственную стабилизирующую мутацию для предотвращения обмена Fab-плечами (описано выше). Ожидали, что Fc IgG₄ не будет иметь поддающегося измерению связывания с Fc-гамма-рецепторами (см. пример 2).

Каркасные участки в вариабельной последовательности Ab1, которые были выделены из библиотеки фагового дисплея интактного полностью человеческого антитела, содержат пять аминокислот, отличных от аминокислот последовательности зародышевого типа (см. ниже и фиг. 22). Определяющие комплементарность участки (CDR) определены с помощью номенклатуры Kabat и подчеркнуты. Остатки, отличные от остатков в последовательности зародышевого типа, показаны в нижнем регистре.

А. Варибельный участок тяжелой цепи

```

<-----FR1-----><CDR><-----FR2-----><-----CDR2----->
Ab1      QIQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKG
IgHV3-30.v...e.....

<-----FR3-----><-----CDR3-----><-----FR4----->
Ab1      RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLLVRFLEWSHYGMDVWGQGT TTVTVSS (SEQ
ID NO: 24)
IgHV3-30      ..... (SEQ ID NO: 36)
JH6      ..... (SEQ
ID NO: 59)

```

В. Варибельный участок легкой цепи:

```

<-----FR1-----><-----CDR1-----><-----FR2-----><CDR2----->
Ab1      QPVLTPPPSASGTPGQRVTISCSGSSNIGSNTVHWYQQLPGTAPKLLIYSDNQRP
IgLV1-44 .s.....n.....n.....

<-----FR3-----><-----CDR3-----><-----FR4----->
Ab1      GVPDRFSGSGSGTSASLVISGLQSDDEADYYCAAWDDSLNGVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:30)
IgLV1-44 .....a.....e..... (SEQ ID NO: 60)
JL1/2/3      ..... (SEQ ID NO: 61)

```

Для смягчения потенциала иммуногенности создавали дополнительные варианты молекул Ab1, у которых заменены остатки каркасных участков, отличные от остатков последовательности зародышевого типа, на соответствующие им аминокислоты последовательности зародышевой типа. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления замена, относящаяся к Ab1, может быть аналогичным образом применима к Ab3 и Ab4 или любому антителу, раскрываемому в настоящем описании, для которого уместна коррекция к последовательности зародышевого типа.

Ниже показаны результаты выравнивания последовательностей варибельных участков Ab1 с его вариантами с оптимизированной аффинностью: А) тяжелая цепь, В) легкая цепь. Определяющие комплементарность участки (CDR) определены с помощью номенклатуры Kabat (подчеркнуты) и номенклатуры IMGT (выделено жирным). Замены в каркасных участках, присутствующие в исходном Ab1, показаны в нижнем регистре.

А. Варибельный участок тяжелой цепи:

	КАРКАСНЫЙ 1	CDR1	КАРКАСНЫЙ 2
IgHV3-30	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS	<u>GFTFSYGMH</u>	WVRQAPGKGLEWVA
Ab1	QIQLVqSGGGVVQPGRSLRLSCAAS	<u>GFTFSYGMH</u>	WVRQAPGKGLEWVA
Ab2	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS	<u>GFTFSYGMH</u>	WVRQAPGKGLEWVA
Ab4	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS	<u>GFAPFSYGMH</u>	WVRQAPGKGLEWVA
Ab6	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS	<u>GFAPFSYGMH</u>	WVRQAPGKGLEWVA

	CDR2	КАРКАСНЫЙ 3
IgHV3-30	<u>VISYDGSNKYYADSVKGR</u>	FTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
Ab1	<u>VISYDGSNKYYADSVKGR</u>	FTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
Ab2	<u>VISYDGSNKYYADSVKGR</u>	FTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
Ab4	<u>VISYDGSNKYYADSVKGR</u>	FTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
Ab6	<u>VISYDGN NKYYADSVKGR</u>	FTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR

	CDR3	КАРКАСНЫЙ 4
IgHV3-30	-----	(SEQ ID NO: 36)
Ab1	<u>DLLVRFLEWSHYGMDV</u>	WGQGT TTVTVSS (SEQ ID NO: 24)
Ab2	<u>DLLVRFLEWSHYGMDV</u>	WGQGT TTVTVSS (SEQ ID NO: 25)
Ab4	<u>DLLVRFLEWSHYGMDV</u>	WGQGT TTVTVSS (SEQ ID NO: 27)
Ab6	<u>DLLVRFLEWSHYGMDV</u>	WGQGT TTVTVSS (SEQ ID NO: 29)

В. Вариабельный участок леркой цепи:

	КАРКАСНЫЙ 1	CDR1	FRW2
IgLV1-44	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSS	SSNIGSNT	VNWYQQLPGTAPKLLIY
Ab1	QpVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSS	SSNIGSNT	VHWYQQLPGTAPKLLIY
Ab2	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSS	SSNIGSNT	VHWYQQLPGTAPKLLIY
Ab4	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSS	TSNIGSNT	VHWYQQLPGTAPKLLIY
Ab6	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSS	SSNIGGNT	VHWYQQLPGTAPKLLIY
	CDR2	КАРКАСНЫЙ 3	
IgLV1-44	SNNQR PSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYC		
Ab1	SDNQR PSGVPDRFSGSKSGTSASLViSGLQSDDEADYYC		
Ab2	SDNQR PSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYC		
Ab4	SDDQR PSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYC		
Ab6	SDDQR PSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYC		
	CDR3	КАРКАСНЫЙ 4	
IgLV1-44	-----	(SEQ ID NO: 60)	
Ab1	AAWDDSLNGV FGGGTKLTVL	(SEQ ID NO: 30)	
Ab2	AAWDDSLNGV FGGGTKLTVL	(SEQ ID NO: 31)	
Ab4	AAWDESLNGV FGGGTKLTVL	(SEQ ID NO: 33)	
Ab6	AAWDESLNGV FGGGTKLTVL	(SEQ ID NO: 35)	

Было обнаружено, что три из пяти замен находятся вдали от CDR-участков и поэтому не влияют на связывание. Пролин в положении 2 легкой цепи закрывался CDRL3, и замена его на серин последовательности эмбрионального типа фактически улучшала связывание с про-/латентным миостатином, стабилизируя конформацию CDR.

Общее антитело было более чем на 99% человеческим (рассчитано как 100% минус % АК, отличных от АК последовательности зародышевого типа, исключая CDRH3). Химические конъюгации отсутствовали. Последовательность CDRH2 тяжелой цепи содержала участок с потенциальной склонностью к изомеризации (Asp-Gly), который также присутствовал в последовательности IgHV3-30 зародышевого типа.

Пример 2.

Фармакологическая характеристика.

Фармакологические анализы in vitro.

В общей сложности 24 оптимизированных варианта Ab1 были экспрессированы и очищены в виде IgG₄ и проанализированы на предмет повышенного связывания и функциональной активности. Изменения в этих молекулах включали мутации коррекции к последовательности зародышевого типа в исходном вариабельном участке наряду с мутациями в CDR, которые придавали повышенное связывание с про-/латентным миостатином при скрининге в отношении созревания аффинности (см. пример 1).

Варианты Ab1 подвергали скринингу в нескольких различных ИФА-анализах, в которых повторно оценивали связывание с белками промиостатина и латентного миостатина (человека, мыши и яванского макака), наряду с масштабным скринингом отрицательных контрольных белков для проверки того, что в результате созревания аффинности не было введено неспецифическое связывание. Отрицательные контроли включали белки GDF11 (proGDF11, латентный GDF11 и зрелый GDF11), белки TGFβ и белки активина (проактивин). Кроме того, антитела оценивали в отношении полиспецифичности (которая может приводить к быстрому выведению) в ходе скрининга, аналогичному опубликованному ранее (Hotzel et al., 2012). Любые антитела со значимыми взаимодействиями с отрицательными контрольными белками или с бакуловирусными частицами в ходе скрининга полиспецифичности далее не рассматривали в качестве кандидатов для программы по разработке.

Также оценивали 24 оптимизированных варианта Ab1 в анализе активации промиостатина для определения их функциональной эффективности, а значения EC₅₀ из кривых зависимости доза-эффект сравнивали с исходным антителом Ab1. Большинство антител имели эквивалентные или повышенные значения EC₅₀, при этом у нескольких наблюдали сниженную эффективность в этом анализе. Антитела со сниженной эффективностью в анализе активности исключали из дальнейшего анализа.

Были выявлены три варианта Ab1 с повышенным связыванием с промиостатином и латентным миостатином, которые при этом сохраняли специфичность к промиостатину и латентному миостатину. Данные по связыванию и активности для этих трех вариантов и исходной молекулы Ab1 приведены в табл. 4-7, последовательности показаны в примере 1.

Таблица 4. Характеристики связывания у антител с промиостатином человека/яванского макака/мыши относительно исходного Ab1 IgG₄

Ab1				
Анализ активности - клетки 293T		Анализ кинетики - Fortebio Octet		
	EC50 (мкМ)	Кассоциации (1/Мс)	Кдиссоциации (1/с)	Kd (М)
Человека	0,274	4,18E+05	1,99E-03	4,76E-09
Яванского макака	0,5842	3,05E+05	1,75E-03	5,75E-09
Мыши	0,8386	2,37E+05	2,62E-03	1,10E-08

Таблица 5. Характеристики связывания антител с промиостатином человека/яванского макака/мыши относительно Ab1 IgG₄ с правильными остатками последовательности зародышевого типа, замененными (Ab2) на остатки, не скорректированные к последовательности зародышевого типа

Ab2				
Анализ активности - клетки 293T		Анализ кинетики - Fortebio Octet		
	EC50 (мкМ)	Кассоциации (1/Мс)	Кдиссоциации (1/с)	Kd (М)
Человека	0,248	4,57E+05	1,56E-03	3,42E-09
Яванского макака	0,6168	2,78E+05	1,41E-03	5,08E-09
Мыши	0,7138	2,35E+05	1,97E-03	8,39E-09

Таблица 6. Характеристики связывания антител с промиостатином человека/яванского макака/мыши относительно Ab3 IgG₄, содержащего остатки, скорректированные к последовательности зародышевого типа (Ab4)

Ab4				
Анализ активности - клетки 293T		Анализ кинетики - Fortebio Octet		
	EC50 (мкМ)	Кассоциации (1/Мс)	Кдиссоциации (1/с)	Kd (М)
Человека	0,179	4,98E+05	2,35E-04	4,72E-10
Яванского макака	0,4451	3,01E+05	2,34E-04	7,76E-10
Мыши	0,4466	2,53E+05	2,72E-04	1,08E-09

Таблица 7. Характеристики связывания антител с промиостатином человека/яванского макака/мыши относительно Ab5 IgG₄, содержащего остатки, скорректированные к последовательности зародышевого типа (Ab6)

Ab6				
Анализ активности - клетки 293T		Анализ кинетики - Fortebio Octet		
	EC50 (нМ)	Кассоциации (1/Мс)	Кдиссоциации (1/с)	Kd (М)
Человека	0,151	5,27E+05	2,51E-04	4,77E-10
Яванского макака	0,4037	3,50E+05	2,57E-04	7,35E-10
Мыши	0,3068	2,94E+05	2,81E-04	9,54E-10

Клеточный, ex vivo и in vivo анализы биологической активности.

Оптимизированные варианты Ab1 оценивали в анализе активации GDF8 в ходе исследования дозо-

зависимого эффекта. В этих экспериментах 0,5 мкМ промиостатина предварительно инкубировали с увеличивающимися количествами тестируемого изделия. После этой стадии предварительной инкубации добавляли кондиционированные среды от клеток HEK293, которые сверхэкспрессировали протеазы mT112 и фурин, для выделения зрелого фактора роста из промиостатина. После инкубации при 30°C в течение ночи материал добавляли к клеткам 293T, несущим репортерную плазмиду с геном SMAD-люциферазы, и регистрировали активность высвобожденного материала. Данные, полученные в результате такого скрининга, показаны на фиг. 4.

Селективность к миостатину относительно других представителей семейства TGFβ.

Селективность кандидатных антител также оценивали как с помощью анализов связывания, так и с помощью функциональных анализов для проверки отсутствия перекрестной реактивности с другими представителями семейства TGFβ. Миостатин человека и GDF11 являются на 90% идентичными в домене зрелого фактора роста и на 47% идентичны в участках продомена. По результатам исследований картирования эпитопа было определено, что молекула исходного Ab1 распознает эпитоп на продомене промиостатина и латентного миостатина, поскольку при помощи ИФА-анализов было показано связывание этого антитела с конструкцией, состоящей из продомена миостатина. Несмотря на то, что продомены миостатина и GDF11 менее чем на 50% идентичны и не ожидалась значимая перекрестная реактивность, была проведена тщательная оценка специфичности ведущих антител.

Был разработан чувствительный анализ для детекции взаимодействий между представляющими интерес антителами и отрицательными контрольными реагентами. В этом анализе биотинилированный proGDF11 или биотинилированный промиостатин был иммобилизован на покрытом стрептавидином наконечнике сенсора FortéBio BLI, который вносили в лунки, содержащие 30 мкг/мл антитела. Взаимодействия аналита с белком, иммобилизованным на чипе, измеряли по величине ответа от биосенсорного чипа. Ответ от биосенсора после 5 мин ассоциации (насыщающий сигнал для proGDF8) сравнивали для двух антигенов и выражали в виде процента ответа для связывания GDF8. Все антитела имели минимальные взаимодействия с proGDF11, в отличие от устойчивых событий связывания, измеренных для промиостатина.

Таблица 8. Взаимодействие с proGDF 11 при высоких концентрациях кандидатных молекул

	Ответ GDF11, выраженный в виде процента ответа GDF8
Ab1	1,33%
Ab2	0,81%
Ab4	2,51%
Ab6	2,07%

Кандидатов антител также оценивали в анализе активации GDF11. В этом анализе 50 нМ proGDF11 предварительно инкубировали с увеличивающимися концентрациями антитела. После предварительной инкубации, для протеолитической активации proGDF11 добавляли кондиционированную среду от клеток HEK293, которые сверхэкспрессируют BMP-1 (протеазу из семейства толлоидных протеаз) и PCSK5 (представителя семейства фуринов, специфичного к GDF11). После инкубации в течение ночи при 30°C реакционные смеси оценивали в отношении активности GDF11 в клеточной линии с SMAD-репортером. Как показано в табл. 8, антитела к миостатину не ингибировали активацию proGDF11, тогда как положительное контрольное антитело оказывало дозозависимое ингибирующее действие на активацию GDF11.

Аффинности связывания кандидатов антител определяли с помощью аналитической тест-системы FortéBio Octet QKe, которая не нуждается в использовании меток и использует биослойную интерферометрию. В каждом эксперименте антигены были иммобилизованы на биосенсорах (покрытые стрептавидином биосенсоры к proGDF8, proGDF11 и проактивину, прямое аминное связывание со всеми остальными), а антитела/конструкции были представлены в растворе с высокой концентрацией (50 мкг/мл) для измерения связывающих взаимодействий.

Аффинности связывания антител определяли с помощью аналитической тест-системы FortéBio Octet QKe, которая не нуждается в использовании меток и использует биослойную интерферометрию. Человеческий proGDF8, латентный GDF8, proGDF11 и проактивин подвергали биотинилированию и иммобилизовали на покрытых стрептавидином биосенсорах (FortéBio). Зрелые факторы роста иммобилизовали посредством прямого аминного связывания с аминокреактивными наконечниками в соответствии с инструкциями производителя (FortéBio). В каждом эксперименте антитела/конструкции были представлены в растворе в одной высокой концентрации (50 мкг/мл) для измерения связывающих взаимодействий. Факторы роста приобретали у R&D systems, а биотинилированные белки получали, как уже было описано.

Таблица 9а. Сравнение антител в отношении связывания с различными формами нескольких представителей семейства TGF3

	<i>Ab2</i>	<i>Ab4</i>	<i>Ab6</i>	<i>Ab1</i>
ProGDF8	7.35E-09	9.24E-10	8.89E-10	6.23E-09
Латентный GDF8	7.84E-09	1.10E-09	1.12E-09	9.06E-09
Зрелый GDF8	-	-	-	-
ProGDF11	-	*1,25E-07	*6,07E-08	-
Зрелый GDF11	-	-	-	-
Проактивин А	-	-	-	-
Зрелый активин А	-	-	-	-
BMP 9	-	-	-	-
BMP10	-	-	-	-
Зрелый TGFB1	-	-	-	-

*Неспецифическое связывание.

Результаты, полученные в исследовании связывания антигена, приведены в табл. 9а. Эксперименты без детектируемого связывания отмечены знаком минус (-). Было несколько расчетных значений K_d , которые были подобраны для данных с плохим ответом связывания, что указано в таблице как слабое неспецифическое связывание (*).

Поскольку образец proGDF8, использованный в табл. 9а, содержал примерно 10-15% латентного GDF8, для подтверждения специфического связывания proGDF8 с человеческими и мышинными антигенами GDF8 использовали отдельный эксперимент. Кроме того, также оценивали в отношении аффинности связывания с Ab2 и AbMyo примированный GDF8, в котором proGDF8 протеолитически расщеплялся как пропротеиновой конвертазой, так и толлоидной протеазой. Для этих экспериментов очищали гомогенный препарат человеческого proGDF8 из стабильно интегрированных 293 клеток, культивируемых в присутствии 30 мкМ деканоил-RVKR-CMV. Примированный человеческий GDF8 получали путем *in vitro* расщепления proGDF8 с использованием кондиционированной среды от сверхэкспрессирующих mT112 клеток и очищенной протеазы фуринов. В экспериментах по связыванию с этими белками использовали 150 нМ Ab2 или AbMyo для насыщения сайтов иммобилизации на наконечниках для захвата Fc человека (FortéBio) и оценивали ассоциацию и диссоциацию 150 нМ аналита.

Также проводили анализ аффинностей связывания с мышинными белками, а полученные данные приведены в табл. 9b. Мышинный белок proGDF8 получали путем удаления всего зрелого и латентного мышинного GDF8 из образца путем отрицательного отбора с антителом, которое строго распознает латентный и зрелый GDF8 (AbMyo2). Использовали 50 нМ антитела для насыщения наконечника для захвата антител к Fc человека (FortéBio). Изначально все антитела испытывали относительно одной 200 нМ концентрации мышинного proGDF8, мышинного латентного GDF8 и зрелого GDF8. Если наблюдали связывание, значение K_d определяли путем иммобилизации антитела, как описано выше, и с применением аналита в титре от 200 до 0,82 нМ путем 3-кратных разведений. K_d определяли с помощью глобального выравнивания с применением программного обеспечения для анализа данных FortéBio 8.2. Для связывания со зрелым миостатином 5 мкг/мл фактора роста (R&D systems) связывали с аминореактивными сенсорными наконечниками (FortéBio) в ацетатном буфере при pH 5. Все антитела первоначально тестировали в количестве 333 нМ в отношении связывания с таким связанным с миостатином сенсором. Затем антитела, у которых наблюдали связывание, тестировали в концентрациях в диапазоне от 333 до 1,37 нМ путем 3-кратных разведений. Для определения K_d взаимодействий использовали глобальное выравнивание с применением анализа данных FortéBio 8.2.

Таблица 9b. Сравнение антител в отношении связывания с различными формами человеческого и мышинного GDF8

	Ab2	AbMyo
Человеческий proGDF8	2,9 E-09	-
Человеческий латентный GDF8	2,4 E-9	3,87E-10
Человеческий примированный GDF8	8,66E-09	8,83E-10
Зрелый GDF8	-	4,7 E-11
Мышиный ProGDF8	2,3 E-09	-
Мышиный латентный GDF8	2,0 E-09	<1E-12

Результаты, полученные в исследовании связывания антигена, приведены в табл. 9b. Эксперименты без детектируемого связывания отмечены знаком минус (-). Несколько значений, обозначенных как <1E-12, относились к очень низким скоростям диссоциации, что не позволяло провести количественную оценку высокой аффинности. К удивлению, AbMyo не мог распознавать рекомбинантный proGDF8, что отличалось от результатов, о которых сообщалось в публикации Latres et al., 2015, где авторы сообщали об ассоциации AbMyo с proGDF8 в эксперименте по иммунопреципитации из сыворотки крови мышей, которым вводили дозу антитела, что могло давать артефакты. Другим неожиданным результатом было взаимодействие между Ab2 и примированным GDF8, комплексом GDF8 с отщепленным толлоидной протеазой продоменом. Этот результат был неожиданным, поскольку Ab2 блокирует отщепление толлоидной протеазой продомена, и свидетельствовал, что взаимодействие Ab2 с proGDF8 и латентным GDF8 не нуждается в интактном сайте для расщепления толлоидной протеазой.

Оценка функциональности Fc-участка.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления терапия антителами к про-/латентному миостатину предусматривает связывание с растворимой мишенью (про-/латентным миостатином) и предупреждение протеолитической активации. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность и фиксация комплемента не вовлечены в этот процесс. Ab1 и его родственные варианты конструировали методами инженерии такими, чтобы они содержали Fc-участок IgG₄. Понятно, что антитела IgG₄ обычно не обладают эффекторной функцией по причине их слабого связывания с компонентом C1q комплемента и рецепторами Fcγ.

Для демонстрации уменьшенной способности эффекторной функции, Ab1 и родственные с ним антитела тестировали в отношении связывания с CD64 (FcγRI) и C1q с помощью ИФА. Для сравнения также готовили IgG₄-вариант Ab1. В этом анализе у всех антител IgG₄ наблюдали значимо более слабое связывание (в 10-20 раз) с CD64 и C1q по сравнению с IgG₄. Значения относительного связывания при EC₅₀ приведены в табл. 10.

Таблица 10. Аффинности относительного связывания Ab2 и родственных с ним антител с CD64

Антитело	Изотип	Относительно связывание CD64 при EC50 (%)	Относительно связывание C1q при EC50 (%)
Ab1-G1	IgG1	100	100
Ab1	IgG4 (S228P)	10	ND
Ab2	IgG4 (S228P)	5	8
Ab3	IgG4 (S228P)	5	5
Ab5	IgG4 (S228P)	8	9

ND - Не определено.

Видимые аффинности связывания Ab1 и родственных с ним вариантов с CD64 и C1q были схожи с другими клиническими кандидатными антителами IgG₄ и были значительно уменьшены по сравнению с антителами изотипа IgG₄. Поэтому, исходя из биологии антител IgG₄, был сделан вывод, что антитела к про-/латентному миостатину не будут индуцировать существенную эффекторную функцию *in vivo*.

Эффективность на животных моделях.

Исходя из результатов характеристики *in vitro*, были выбраны четыре антитела для тестирования в исследовании *in vivo* (Ab7, Ab1, Ab8 и Ab9). Цель этого исследования заключалась в оценке способности этих четырех кандидатных антител модулировать мышечную массу у мышей. Пять (5) групп из десяти (10) самцов SCID мышей получали введение тестируемого изделия путем внутрибрюшинной (IP) инъекции один раз в неделю на 0-, 7-, 14-, 21-, 28- и 35-й дни. Перед введением тестируемого изделия (0-й день) все животные проходили оценку силы захвата. Оценка силы захвата также проводили на послед-

ний день исследования (42-й день). На 0-й день собирали кровь из ретро-орбитального синуса для проведения клинического анализа крови (СВС). После введения дозы животных ежедневно оценивали в отношении массы тела и наблюдали за общим состоянием здоровья. На 42-й день после оценки силы захвата животных умерщвляли путем передозировки CO_2 и собирали кровь с помощью сердечной пункции для оценки СВС. Для получения плазмы собирали дополнительную кровь. Выделяли и взвешивали различные ткани. Собирали следующие мышцы: икроножную, грудную, камбаловидную, трицепс, переднюю большеберцовую, квадрицепс (прямую мышцу бедра) и диафрагму. Собирали следующие органы: сердце, почку, селезенку, печень и паховую белую жировую ткань. Все ткани взвешивали и замораживали, за исключением икроножных мышц, которые фиксировали в формалине (нога 1) и ОСТ (нога 2) для гистологического анализа.

Результаты.

Данные по среднему ежедневному проценту изменения массы для животных в исследовании SCH-02 показаны на фиг. 6. Животные во всех пяти группах еженедельно набирали массу. Животные, обработанные антителом Ab1, имели наибольшее увеличение массы тела (14,6%), как изображено на фиг. 6. Только животные, обработанные Ab1, имели статистически значимое увеличение среднего процента изменения массы тела по сравнению с животными в контрольной группе с наполнителем (PBS) (фиг. 6).

Значения масс для иссеченных мышц изображены на фиг. 7 и 8. Животные, обработанные Ab1, имели статистически значимые увеличения значений массы икроножной мышцы (фиг. 7A) и диафрагмы (фиг. 8B) по сравнению с животными, обработанными контрольным носителем (PBS), соответственно 27,6% и 49,8%. Увеличения массы по сравнению с контрольным PBS наблюдали и у дополнительных мышц от животных, обработанных Ab1, но эти различия не были статистически значимыми. Статистически значимых различий между группами обработки для средних значений массы ткани сердца, селезенки, почки, печени и жировой ткани не было.

Исследование дозозависимого эффекта на SCID.

В исследовании *in vivo* (описано выше) у животных, которым еженедельно вводили дозу Ab1 в количестве 25 мг/кг в течение 6 недель, наблюдали статистически значимые увеличения массы тела и значений массы мышц (икроножной мышцы и диафрагмы) по сравнению с животными, которым вводили дозу наполнителя (PBS). Такую улучшающую мышечную активность Ab1 затем более детально изучали в исследовании дозозависимого эффекта у мышей SCID. В этом исследовании изучали, может ли увеличение дозы Ab1 до 60 мг/кг/нед. увеличивать степень эффекта, оказываемого на массу мышцы, и может ли уменьшение дозы Ab1 до 2 мг/кг/нед. уменьшить степень эффекта, оказываемого на массу мышцы. В этом исследовании активность Ab1 сравнивали с двумя другими антителами (Ab8, которое изначально тестировали в описанном выше исследовании Ab10).

Десять групп из десяти самцов SCID мышей получали введение тестируемого изделия путем внутривенной (IP) инъекции (10 мл/кг) два раза в неделю на 0-, 3-, 7-, 10-, 14-, 17-, 21- и 24-й дни. Дозы тестируемых изделий были следующими: Ab1 (30, 10, 3 и 1 мг/кг), Ab10 (10 и 3 мг/кг) и Ab8 (10 и 3 мг/кг). Контрольным группам вводили дозы PBS и контрольного IgG (30 мг/кг). Группы обработки описаны в табл. 11. Возраст животных в начале исследования составлял 10 недель. Массу тела измеряли на -4-й день и два раза в неделю на протяжении всего периода исследования, в соответствии с днями введения дозы. Параметры состава массы тела (масса жира, масса нежировых тканей и содержание воды) измеряли с помощью Echo MRI (QNMР) на -4-, 7-, 14-, 21- и 28-й дни. Через 30 дней после первой дозы антитела животных умерщвляли путем передозировки CO_2 и собирали кровь с помощью сердечной пункции для оценки СВС и получения плазмы. Кроме того, после окончания исследования выделяли и взвешивали различные ткани. Собирали следующие мышцы: икроножную, камбаловидную, переднюю большеберцовую, квадрицепс (прямую мышцу бедра) и диафрагму. Мышцы иссекали как с правой, так и с левой ноги исследуемых мышей. Для анализа значения массы отдельных мышц с обеих ног объединяли и рассчитывали среднюю массу мышцы в граммах. Собирали и другие ткани: сердце, почку, селезенку, печень и жировую ткань. Все ткани взвешивали, а затем замораживали, за исключением икроножных мышц, которые фиксировали в формалине (левая нога) и ОСТ (правая нога) для гистологического анализа.

Таблица 11. Схема исследования

Группа обработки	Доза тестируемого изделия	Кол-во доз в	Общая доза в	ID
		неделю	неделю	живот ных
1	Контрольный PBS	2	0	1-10
2	Контрольный IgG (30 мг/кг)	2	60 мг/кг/нед.	11-20
3	Ab1 (30 мг/кг)	2	60 мг/кг/нед.	21-30
4	Ab1 (10 мг/кг)	2	20 мг/кг/нед.	31-40
5	Ab1 (3 мг/кг)	2	6 мг/кг/нед.	41-50
6	Ab1 (1 мг/кг)	2	2 мг/кг/нед.	51-60
7	Ab10 (10 мг/кг)	2	20 мг/кг/нед.	61-70
8	Ab10 (3 мг/кг)	2	6 мг/кг/нед.	71-80
9	Ab8 (10 мг/кг)	2	20 мг/кг/нед.	81-90
10	Ab8 (3 мг/кг)	2	6 мг/кг/нед.	91-100

Данные по среднему проценту изменения массы и среднему проценту изменения массы нежировых тканей у животных, обработанных наполнителем (PBS), контрольным IgG и различными дозами Ab1, показаны на фиг. 9. Животные, обработанные Ab1 дозами 20 и 60 мг/кг/нед., имели значимые увеличения массы тела на 28-й день исследования по сравнению с животными, обработанными контрольным IgG, соответственно 15,3 и 14,4% (фиг. 9A). Все четыре группы животных, обработанных Ab1 (60, 20, 6 и 2 мг/кг/нед.), имели статистически значимые увеличения массы нежировых тканей на 28-й день исследования по сравнению с обработанными контрольным IgG животными, соответственно 14,1, 12,4, 17,1 и 15,5% (фиг. 9B).

Значения массы для четырех мышц (квадрицепса, икроножной, передней большеберцовой и диафрагмы) графически представлены на фиг. 10. Камбаловидную мышцу также иссекали, но небольшой размер мышцы давал набор чрезвычайно изменчивых данных. Животные, обработанные всеми дозами Ab1, имели статистически значимые увеличения значений массы мышц по сравнению с животными с контрольным IgG (фиг. 10). Средние проценты изменения массы мышцы по сравнению с контрольным IgG показаны над соответствующим столбцом на каждом графике мышцы. Средние проценты изменения массы для квадрицепса варьировали в диапазоне от 20,5% для наиболее высокой дозы до 10,7% для наиболее низкой дозы (фиг. 10A). Средние проценты изменения массы для икроножной мышцы варьировали в диапазоне от 17,7% для наиболее высокой дозы до 15,9% для наиболее низкой дозы (фиг. 10B). Средние проценты изменения массы для передней большеберцовой мышцы варьировали в диапазоне от 24,0% для наиболее высокой дозы до 18,0% для наиболее низкой дозы (фиг. 10C). Средние проценты изменения массы для мышцы диафрагмы превышали 30% для всех групп доз (фиг. 10D). Статистически значимых различий между группами обработки для средних значений массы ткани сердца, селезенки, почки, печени и жировой ткани не было.

Обработка Ab1 в модели развития индуцированной дексаметазоном атрофии мышц.

С учетом способности антитела Ab1 к миостатину наращивать массу мышц у здоровых SCID-мышей, определяли, может ли обработка посредством Ab1 также защищать животных от обработок, которые индуцируют атрофию мышц. Была создана модель индуцированных кортикостероидами атрофии мышц путем обработки животных в течение двух недель дексаметазоном в их питьевой воде. Выбранная доза (2,5 мг/кг/день) могла индуцировать значительные уменьшения массы нежировых тканей организма и массы отдельных мышц задних конечностей. В следующем эксперименте животных обрабатывали различными дозами Ab1 для определения, может ли оно защитить животных от такой индуцированной дексаметазоном атрофии мышц.

В этом исследовании восемь групп по десять самцов мышей (C57BL/6) были вовлечены в исследование в возрасте 13,5 недель. Начиная с 0-го дня исследования мышам давали либо нормальную питьевую воду (группы 1-4), либо воду, содержащую дексаметазон (группы 5-8). Тестируемые изделия вводили внутривенной (IP) инъекцией (10 мл/кг) дважды в неделю на 0-, 3-, 7- и 10-й дни. Тестируемые изделия и дозы были следующими: PBS (группы 1 и 5), 10 мг/кг контр. IgG (группы 2 и 6), 10 мг/кг Ab1 (группы 3 и 7) и 1 мг/кг Ab1 (группы 4 и 8). Группы обработки описаны в табл. 12. Массу тела измеряли по меньшей мере дважды в неделю на протяжении всего периода исследования. Параметры состава массы тела (масса жира, масса нежировых тканей и содержание воды) измеряли с помощью Echo MRI (QNMР) на -1-, 6- и 13-й дни. Через 14 дней после первой дозы антитела животных умерщвляли путем передозировки CO₂ и собирали кровь с помощью сердечной пункции для получения плазмы. Кроме того,

после окончания исследования выделяли и взвешивали различные ткани. Собирали следующие мышцы: икроножную, камбаловидную, переднюю большеберцовую, квадрицепс (прямую мышцу бедра) и диафрагму. Мышцы иссекали как с правой, так и с левой ноги исследуемых мышей. Для анализа значения массы отдельных мышц с обеих ног объединяли и рассчитывали среднюю массу мышцы в граммах. Собирали и другие ткани: сердце, почку, селезенку, печень и жировую ткань. Все ткани взвешивали, а затем замораживали, за исключением икроножных мышц, которые фиксировали в формалине (левая нога) и ОСТ (правая нога) для гистологического анализа.

Таблица 12. Группы обработки для исследования на модели индуцированной дексаметазоном атрофии

Группа обработки	Дексаметазон в питьевой воде	Доза тестируемого изделия	Кол-во доз в неделю	Общая доза в неделю	ID животных
1	отсутствовал	Контрольный PBS	2	0	1-10
2	отсутствовал	Контрольный IgG (10 мг/кг)	2	20 мг/кг/нед.	11-20
3	отсутствовал	Ab1 (10 мг/кг)	2	20 мг/кг/нед.	21-30
4	отсутствовал	Ab1 (1 мг/кг)	2	2 мг/кг/нед.	31-40
5	2,5 мг/кг/день	Контрольный PBS	2	0	51-60
6	2,5 мг/кг/день	Контрольный IgG (10 мг/кг)	2	20 мг/кг/нед.	61-70
7	2,5 мг/кг/день	Ab1 (10 мг/кг)	2	20 мг/кг/нед.	71-80
8	2,5 мг/кг/день	Ab1 (1 мг/кг)	2	2 мг/кг/нед.	81-90

В этом эксперименте определяли, будет ли обработка мышей антителом Ab1 к миостатину защищать животных от индуцированной кортикостероидами атрофии мышц. В ходе данного исследования два раза в неделю измеряли массу тела, а массу нежировых тканей с помощью QNMR на -1-й, 6-й и 13-й дни. Данные по среднему проценту изменения массы и среднему проценту изменения массы нежировых тканей у животных в контрольной группе без заболевания (группе 1) и группах, обработанных дексаметазоном (группах 5-8), показаны на фиг. 11. Значимые различия в среднем проценте изменения массы тела среди любых из этих групп обработки на 14-й день отсутствовали (фиг. 11A). Обработка мышей дексаметазоном в течение двух недель приводила к значимому уменьшению массы нежировых тканей организма (группы 5 и 6) по сравнению с контрольной группой (группой 1), которой давали нормальную питьевую воду (фиг. 11B). Тем не менее у мышей, обработанных как дексаметазоном, так и антителом Ab1 в количестве 20 мг/кг/нед. (группа 7), не наблюдали значимого различия в проценте изменения массы нежировых тканей организма на 14-й день исследования по сравнению с контрольной группой (группой 1). У животных, обработанных Ab1 в количестве 20 мг/кг/нед., но не 2 мг/кг/нед., наблюдали значимое различие в проценте изменения массы нежировых тканей организма на 14-й день по сравнению с любой из обработанных дексаметазоном контрольных групп (групп 5 и 6).

В конце двухнедельного периода обработки дексаметазоном и тестируемыми изделиями иссекали и взвешивали отдельные мышцы. Данные по массе для двух мышц (икроножной и квадрицепсу) представлены графически на фиг. 12A, 12B. У животных, которые получали дексаметазон в их питьевой воде, а также получали либо PBS, либо контрольное антитело IgG, наблюдали значимую атрофию в икроножных мышцах и квадрицепсах (группы 5 и 6) по сравнению с группой без заболевания (группой 1). У животных, обработанных как дексаметазоном, так и Ab1 в количестве 20 мг/кг/нед. (группа 7), но не 2 мг/кг/нед., наблюдали значимое различие в показателях массы мышц по сравнению с любой из обработанных дексаметазоном контрольных групп (групп 5 и 6). Кроме того, у мышей, обработанных как дексаметазоном, так и антителом Ab1 в количестве 20 мг/кг/нед. (группа 7), не наблюдали значимого различия в показателях массы икроножной мышцы и квадрицепса по сравнению с контрольной группой без заболевания (группой 1). Различия средних процентов массы мышц каждой группы по сравнению со средней массой мышц контрольной группы (группа 1, PBS и вода) показано на фиг. 12C-12D. Проценты уменьшения массы икроножной мышцы, индуцированного обработкой дексаметазоном в группах PBS и контр. IgG, составляли соответственно 16,5 и 18,9%. В отличие от этого, у животных, которых обрабатывали как дексаметазоном, так и 20 мг/кг/нед. Ab1, было только 4,0% уменьшение массы икроножной мышцы, которое не было статистически отличным от контрольной группы без заболевания (группы 1). Несмотря на то, что у животных, которых обрабатывали как дексаметазоном, так и 2 мг/кг/нед. Ab1 (группы 8), было только 10% уменьшение массы икроножной мышцы, уменьшение массы мышцы для этой группы не было статистически отличным от уменьшений для контрольных групп PBS и IgG (групп 5 и 6). Аналогичные результаты наблюдали для квадрицепса (фиг. 12D).

Обработка Ab1 в модели развития индуцированной иммобилизацией атрофии мышц.

С учетом способности антитела Ab1 к миостатину наращивать массу мышц у здоровых SCID-мышей, исследовали, может ли обработка посредством Ab1 также защищать животных от обработок, которые индуцируют атрофию мышц. Создавали модель дисфункциональной атрофии путем иммобилизации правой ноги мышей на две недели. Иммобилизация правой ноги со ступней в согнутом положении за этот период времени могла вызывать значимые уменьшения массы отдельных мышц задней конечности. В следующем эксперименте животных обрабатывали различными дозами Ab1 для определения степени, с которой оно защищает животных от такой индуцированной иммобилизацией атрофии мышц.

Таблица 13. Группы обработки для исследования на модели индуцированной иммобилизацией атрофии

Группа обработки	Иммобилизация	Доза тестируемого изделия	Кол-во доз в неделю	Общая доза в неделю	ID животных
1	Без иммобилизации	Контрольный PBS	2	0	1-10
2	Без иммобилизации	Контрольный IgG (10 мг/кг)	2	20 мг/кг/нед.	11-20
3	Без иммобилизации	Ab1 (10 мг/кг)	2	20 мг/кг/нед.	21-30
4	Без иммобилизации	Ab1 (1 мг/кг)	2	2 мг/кг/нед.	31-40
5	Иммобилизованная	Контрольный PBS	2	0	51-60
6	Иммобилизованная	Контрольный IgG (10 мг/кг)	2	20 мг/кг/нед.	61-70
7	Иммобилизованная	Ab1 (10 мг/кг)	2	20 мг/кг/нед.	71-80
8	Иммобилизованная	Ab1 (1 мг/кг)	2	2 мг/кг/нед.	81-90

В этом исследовании восемь групп по десять самцов мышей (C57BL/6) были вовлечены в исследование в возрасте 14,5 недель. Начиная с 0-го дня исследования, мышей помещали под анестезию и накладывали иммобилизующий аппарат на правую заднюю конечность со ступней в согнутом положении (группы 5-8). Контрольные группы (группы 1-4) также помещали под анестезию, но на заднюю конечность не помещали никакого иммобилизующего аппарата. Тестируемые изделия вводили внутривенной (IV) инъекцией (10 мл/кг) дважды в неделю на 0-, 3-, 7- и 10-й дни. Тестируемые изделия и дозы были следующими: PBS (группы 1 и 5), 10 мг/кг контр. IgG (группы 2 и 6), 10 мг/кг Ab1 (группы 3 и 7) и 1 мг/кг Ab1 (группы 4 и 8). Группы обработки описаны в табл. 13. Массу тела измеряли по меньшей мере дважды в неделю на протяжении всего периода исследования. Параметры состава массы тела (масса жира, масса нежировых тканей и содержание воды) измеряли с помощью Echo MRI (QNMР) на -1-, 7- и 14-й дни. Через 14 дней после первой дозы антитела животных умерщвляли путем передозировки CO₂ и собирали кровь с помощью сердечной пункции для получения плазмы.

Кроме того, выделяли и взвешивали различные ткани. Собирали следующие мышцы: икроножную, камбаловидную, подошвенную, переднюю большеберцовую и квадрицепс (прямую мышцу бедра). Для анализа собирали данные по массе отдельных мышц с правой задней конечности животных. Другими собираемыми тканями были сердечная, жировая и селезенка. Все ткани взвешивали, а затем замораживали, за исключением икроножных мышц, которые фиксировали в формалине для гистологического анализа.

Результаты.

В этом эксперименте тестировали, может ли обработка мышей антителом Ab1 к миостатину защитить мышечную массу от дисфункциональной атрофии мышц, индуцированной иммобилизацией правой задней конечности. В ходе данного исследования два раза в неделю измеряли массу тела, а массу нежировых тканей измеряли с помощью QNMР на -1-, 7- и 14-й дни. Данные по среднему проценту изменения массы и среднему проценту изменения массы нежировых тканей у животных в контрольной группе без заболевания (группе 1) и в группах, в которых иммобилизовали на две недели (группах 5-8), показаны на фиг. 13. Иммобилизация правой задней конечности не оказывала никаких негативных эффектов на увеличение массы тела (фиг. 13А), а любые различия в массе нежировых тканей в группах были незначимыми (фиг. 13В).

В конце двухнедельного исследования иссекали и взвешивали отдельные мышцы. Данные по массе

для двух мышц (икроножной и квадрицепсу) представлены графически на фиг. 14A, 14B). У животных, у которых была иммобилизована их нога, а также получали либо PBS, либо контрольное антитело IgG, наблюдали значимую атрофию в икроножных мышцах и квадрицепсах (группы 5 и 6) по сравнению с группой без иммобилизации (группой 1). У животных, которые были как иммобилизованы, так получали дозу Ab1 в количестве 20 мг/кг/нед. (группа 7), но не 2 мг/кг/нед., наблюдали значимое различие показателей массы мышц по сравнению с любой из иммобилизованных контрольных групп (групп 5 и 6). Кроме того, у иммобилизованных мышцей, которых обрабатывали антителом Ab1 в количестве 20 мг/кг/нед. (группа 7), не наблюдали значимого различия в показателях массы икроножной мышцы и квадрицепса по сравнению с контрольной группой без иммобилизации (группой 1). Различия средних процентов массы мышц каждой группы по сравнению со средней массой мышц контрольной группы без иммобилизации (группы 1) показано на фиг. 14C, 14D. Проценты уменьшения массы икроножной мышцы, индуцированного иммобилизацией в группах PBS и контр. IgG, составляли соответственно 22,8 и 23,5%. В отличие от этого, иммобилизованные мыши, которых обрабатывали 20 мг/кг/нед. Ab1, имели только 10,0% уменьшение массы икроножной мышцы. Было обнаружено, что эта разница является статистически значимой по сравнению с иммобилизованными контрольными группами, которые получали PBS и контр. антитело IgG (группами 5 и 6). Уменьшение массы мышц для иммобилизованных мышцей, обработанных посредством 2 мг/кг/нед. Ab1, не было статистически отличным по сравнению с уменьшением для контрольных групп PBS и IgG (групп 5 и 6). Аналогичные результаты наблюдали для квадрицепса (фиг. 14D).

Доменная структура промиостатина и латентного миостатина с указанными сайтами расщепления протеазами показана на фиг. 16A. На фиг. 16B показан пример частично расщепленного пропротеинового конвертазой промиостатина после разгона на электрофорезе в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия. В восстановительных условиях бэнды белка состояли из мономера промиостатина (~50 кДа), продомена (~37 кДа) и фактора роста (12,5 кДа).

Ab1 специфически связывается с промиостатином и латентным миостатином без наблюдаемого связывания с другими представителями суперсемейства TGF β , прежде всего с соответствующими формами GDF11 (фиг. 17A). Ab1 вводили высокой концентрацией (50 мкг/мл) в наконечники Forte-Bio BLI, покрытые указанным антигеном, и измеряли показатели скорости ассоциации и диссоциации для получения примерного значения K_d . Величина ответа биосенсора, указывающая на событие связывания, графически представлена черными столбцами, а расчетная K_d обозначена оранжевым. Кроме того Ab1 блокировал активацию промиостатина, но не proGDF11 (фиг. 17B).

Исследование дозозависимого эффекта на SCID с Ab1, Ab2, Ab4 и Ab6.

В предыдущих исследованиях *in vivo* с Ab1 было продемонстрировано, что Ab1 может увеличивать массу мышц у здоровых животных, а также предупреждать дистрофию мышечной ткани в мышечных моделях атрофии мышц (индуцированной дексаметазоном и иммобилизацией атрофии). В ходе попыток разработки антитела были выявлены три антитела с *in vitro* характеристиками, которые превосходили таковые у Ab1. В ходе данного исследования у SCID мышцей сравнивали активность *in vivo* этих антител в трех различных дозах с уже установленной активностью Ab1.

14 групп из 8 самцов SCID мышцей получали введение тестируемого изделия путем внутривенной (IV) инъекции (10 мл/кг) два раза в неделю на 0-, 3-, 7-, 10-, 14-, 17-, 21- и 24-й дни. Дозы тестируемых изделий были следующими: Ab1, Ab2, Ab4 и Ab6 давали в 3 различных дозах (10, 1 и 0,25 мг/кг), а контр. антитело IgG давали в количестве 10 мг/кг. Группы обработки описаны в табл. 14. Возраст животных в начале исследования составлял 10 недель. Массу тела измеряли два раза в неделю на протяжении всего периода исследования в соответствии с днями введения дозы. Параметры состава массы тела (масса жира, масса нежировых тканей и содержание воды) измеряли с помощью Echo MRI (QNMRI) на 0-, 7-, 14-, 21- и 28-й дни. Через 28 дней после первой дозы антитела животных умерщвляли путем передозировки CO₂ и собирали кровь с помощью сердечной пункции для получения плазмы.

Кроме того, выделяли и взвешивали различные ткани. Собирали следующие мышцы: икроножную, камбаловидную, переднюю большеберцовую, квадрицепс (прямую мышцу бедра), длинный разгибатель пальцев и диафрагму. Мышцы иссекали как с правой, так и с левой ноги исследуемых мышцей. Для анализа значения массы отдельных мышц с обеих ног объединяли и рассчитывали среднюю массу мышцей в граммах. Собирали и другие ткани: сердце, почку, селезенку, печень и жировую ткань. Все ткани взвешивали, а затем замораживали, за исключением левых икроножных мышцей, которые фиксировали в формалине для гистологического анализа.

Таблица 14. Группы обработки для исследования дозозависимого эффекта на модели

Группа обработки	Доза тестируемого изделия	Кол-во	Общая доза в	ID
		доз в неделю	неделю	
1	Контрольный PBS	2	0	1-8
	Контрольный IgG (10 мг/кг)	2	20 мг/кг/нед.	9-16
2	Ab1 (10 мг/кг)	2	20 мг/кг/нед.	17-24
3	Ab1 (1 мг/кг)	2	2 мг/кг/нед.	25-32
4	Ab1 (0,25 мг/кг)	2	0,5 мг/кг/нед.	33-40
5	Ab2 (10 мг/кг)	2	20 мг/кг/нед.	41-48
6	Ab2 (1 мг/кг)	2	2 мг/кг/нед.	49-56
7	Ab2 (0,25 мг/кг)	2	0,5 мг/кг/нед.	57-64
8	Ab4 (10 мг/кг)	2	20 мг/кг/нед.	65-72
9	Ab4 (1 мг/кг)	2	2 мг/кг/нед.	73-80
10	Ab4 (0,25 мг/кг)	2	0,5 мг/кг/нед.	81-88
11	Ab6 (10 мг/кг)	2	20 мг/кг/нед.	89-96
12	Ab6 (1 мг/кг)	2	2 мг/кг/нед.	97-104
13	Ab6 (0,25 мг/кг)	2	0,5 мг/кг/нед.	105-112

Данные по средним процентам изменения массы нежировых тканей (начиная с 0-го дня) для животных, обработанных наполнителем (PBS), контрольным IgG и различными дозами Ab1, Ab2, Ab4 и Ab6, показаны на фиг. 15. Животные, обработанные Ab1, Ab2, Ab4 и Ab6 с уровнем дозы 20 мг/кг/нед., имели значимые увеличения массы нежировых тканей на 21- и на 28-й день исследования по сравнению с животными, обработанными контрольным IgG и наполнителем (PBS). Животные, обработанные Ab1 и Ab2 с уровнем дозы 2 мг/кг/нед., также имели значимые изменения в массе нежировых тканей на 21- и 28-й день исследования. Значимые изменения в массе нежировых тканей от контрольных групп у животных, обработанных Ab1, Ab2, Ab4 и Ab6 с уровнем дозы 0,5 мг/кг/нед., отсутствовали.

В конце исследования (28-й день) собирали и взвешивали мышцы. Показатели массы для квадрицепса (прямой мышцы бедра) и икроножных мышц представлены графически на фиг. 18А и 18В. Животные, обработанные Ab1, Ab2, Ab4 и Ab6 с уровнем дозы 20 мг/кг/нед., имели значимые увеличения массы икроножной мышцы и квадрицепса (прямой мышцы бедра) по сравнению с обработанными наполнителем (PBS) животными. Животные, обработанные Ab2 и Ab4 с уровнем дозы 2 мг/кг/нед., также имели значимые изменения показателей массы икроножной мышцы. Животные, обработанные посредством Ab2 с уровнем дозы 2 мг/кг/нед., также имели значимые изменения показателей массы квадрицепса (прямой мышцы бедра). Значимые изменения в массе мышц от контрольных групп у животных, обработанных Ab1, Ab2, Ab4 и Ab6 с уровнем дозы 0,5 мг/кг/нед., отсутствовали. Проценты различия показателей массы икроножной мышцы и квадрицепса (прямой мышцы бедра) (по сравнению с группой наполнителя) у животных, обработанных различными дозами Ab1, Ab2, Ab4 и Ab6, приведены на фиг. 18С.

Продолжительность исследования действия с Ab1 на SCID мышах.

Тестировали способность Ab1 увеличивать массу нежировых тканей у SCID мышей после однократной дозы и после 3 недельных доз. Семь групп из восьми самцов SCID мышей получали введение тестируемого изделия путем внутрибрюшинной (IP) инъекции (10 мл/кг) либо один раз в 0-й день (группы 1-4), либо один раз в неделю в 0-, 7- и 14-й дни (группы 5-7). См. табл. 15. Антитела (контрольное IgG, Ab1 и AbMyo) вводили дозой 10 мг/кг. Возраст животных в начале исследования составлял 10-11 недель. Массу тела измеряли два раза в неделю на протяжении всего периода исследования, в соответствии с днями введения дозы. Параметры состава массы тела (масса жира, масса нежировых тканей и содержание воды) измеряли с помощью Echo MRI (QNMР) на 0-, 7-, 14- и 21-й дни.

Таблица 15. Группы обработки и частота введения доз

Группа обработки	Тестируемое изделие	Доза (мг/кг)	Частота введения доз
1	Контрольный PBS	0	Один раз
2	Контр. IgG	10	Один раз
3	Ab1	10	Один раз
4	AbMyo	10	Один раз
5	Контр. IgG	10	Один раз в неделю
6	Ab1	10	Один раз в неделю
7	AbMyo	10	Один раз в неделю

Данные по среднему проценту изменения массы нежировых тканей для животных, обработанных наполнителем (PBS), контрольным IgG, Ab1, AbMyo, показаны на фиг. 19. Данные выражены как изменение массы нежировых тканей, начиная с 0-го дня исследования. Через 21 день после однократной дозы тестируемого изделия животные, обработанные посредством Ab1 (группа 3), имели значимые увеличения массы нежировых тканей (по сравнению с контрольными животными IgG - группа 1), которые были неотличимы от изменений массы нежировой ткани после 3 доз Ab1 (группа 6). Эти изменения массы нежировых тканей также были сопоставимы с изменениями, наблюдаемыми у животных, которых обрабатывали однократной дозой (группа 4) или 3 еженедельными дозами (группа 7) AbMyo.

Пример 3.

Химические/фармацевтические знания.

Ab2 представляет собой гуманизированное моноклональное антитело подтипа IgG₄, у которого серии заменен пролином в положении 228. Это дает шарнирную последовательность по типу IgG₄ и сводит к минимуму неполное образование межцепочечных дисульфидных мостиков, что характерно для IgG₄. Полная аминокислотная последовательность тяжелых и легких цепей Ab2 показана ниже. Определяющие комплементарность участки (CDR) подчеркнуты. Выделенная жирным последовательность NST: сайт N-связанного гликозилирования консенсусной последовательности; выделенные жирным последовательности DP являются потенциальными сайтами расщепления; выделенные жирным последовательности NX, где X может быть S, T или G, являются потенциальными сайтами дезамидирования; выделенные жирным последовательности DX, где X может быть G, S, T или SDG, являются потенциальными сайтами изомеризации; выделенные жирным метионины являются потенциальными сайтами окисления метионина; выделенная жирным Q является ожидаемой N-концевой пироглутаминовой кислотой (фиг. 21A, 21B).

С помощью молекулярного моделирования Ab1 было выявлено несколько потенциальных сайтов посттрансляционных модификаций. Два аспарагина в легкой цепи и семь аспарагинов в тяжелой цепи подвержены дезамидированию. Два из этих остатков локализованы в CDR-участках тяжелой цепи.

Нативные mAb IgG₄ могут иметь неполное образование дисульфидных мостиков между тяжелыми цепями, причем две полумолекулы (каждая из которых содержит одну тяжелую и одну легкую цепь) удерживаются в интактной структуре антитела посредством нековалентных взаимодействий. Молекулы IgG₄ могут быть подвержены обмену полумолекулами *in vitro* и *in vivo*, а уровень полумолекул должен быть постоянным во всех производственных партиях. Замена Ser на Pro в остоле структуры IgG₄ дает в результате IgG₄-подобную шарнирную последовательность, что обеспечивает образование межцепочечных дисульфидных связей и заметную стабилизацию структуры антитела. Целостность и стабильность

шарнирного участка контролировали во время разработки посредством расширенной диагностики с использованием таких анализов, как капиллярный электрофорез в невозстановительных условиях и количественное определение свободных сульфгидрилов. Возможность обмена цепями отслеживали *in vivo*.

Результаты.

Настоящее изобретение относится к антителу, специфическому к про-/латентному миостатину, которое блокирует активацию промиостатина и/или латентного миостатина. Введение такого блокирующего активацию антитела здоровым мышам увеличивало массу нежировых тканей организма и размер мышц, при этом была необходима лишь однократная доза для поддержания усиливающего мышцы эффекта на протяжении 1-месячного периода. Кроме того, введение антител защищало здоровых мышей от атрофии мышц в двух отдельных моделях атрофии мышц. Из этих данных видно, что блокировка активации миостатина способствовала устойчивому росту мышц и предотвращала атрофию мышц *in vivo*, а также представляла собой альтернативный механизм терапевтических вмешательств в случае атрофии мышц.

Пример 4.

Анализ про- и латентного миостатина при атрофии мышц.

Проводили вестерн-блоттинг для определения наличия про- и латентного миостатина в мышечной ткани и в кровотоке при атрофии мышц, а также при нормальных условиях. Стандартная модель атрофии мышц предусматривала обработку мышей 2,5 мг/кг/неделя дексаметазоном (вводили в питьевой воде), а спустя 2 недели обработки собирали мышцы и плазму. Эта модель регулярно приводила к 15-25% уменьшению массы мышц в ходе обработки. Одновременно собирали контрольную мышцу и плазму у мышей, которых не подвергали обработке дексаметазоном. Прямую мышцу бедра, переднюю большеберцовую мышцу и камбаловидную мышцу иссекали, замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C до необходимости использования. Получали мышечные лизаты путем измельчения с последующим лизисом в T-PER-буфере, дополненном ингибиторами протеаз и фосфатаз. Плазму собирали стандартными способами и хранили при -80°C.

Несколько образцов, содержащих белок в равных концентрациях, разделяли на PAGE-гелях и переносили при помощи вестерн-блоттинга на PVDF-мембрану. В случае мышечных лизатов на гель загружали 10-50 нг общего белка. Плазму разводили 1:10 в PBS и 10 мкл каждого образца загружали на гель. В качестве размерных стандартов на гель также загружали 0,1-1 нг рекомбинантного про- и/или латентного миостатина. Выявление миостатинового белка осуществляли с применением антитела, распознающего продомен миостатина (AF1539, R&D Systems). Из результатов этого анализа было видно, что промиостатин был преобладающей формой в мышце, тогда как латентный миостатин был первичной формой в плазме (фиг. 25). Кроме того, было продемонстрировано, что у мышей с индуцированной дексаметазоном атрофией мышц уровень промиостатина увеличивался в ткани мышц, а уровень латентного миостатина уменьшался в плазме.

Для подтверждения этих результатов повторяли вестерн-блоттинг с применением флуоресцентного мечення и детекции (Azure Biosystems). Проводили количественное определение относительных уровней каждой из форм миостатина в плазме и в прямых мышцах бедра и передней большеберцовой мышце от нормальных и обработанных дексаметазоном мышей. Эти данные подтверждали описанные выше результаты, демонстрируя 2-2,5-кратное увеличение уровня промиостатина в обеих мышцах и 2,3-кратное уменьшение уровня латентного миостатина в плазме (фиг. 26).

Исходя из этих данных, была представлена модель потока миостатина в нормальной и пораженной мышце. Как было продемонстрировано, в нормальной мышце (фиг. 28A) промиостатин вырабатывается в мышце и превращается в латентный миостатин путем расщепления фуриновой протеазой, которое может происходить либо внутри, либо снаружи клетки (Anderson et al., 2008). Некоторая доля латентного миостатина в мышце затем высвобождается в кровоток, образуя циркулирующий пул латентного миостатина. При атрофии мышц увеличивается выработка активного фактора роста миостатин, что приводит к атрофии мышц. Полагали, что такое увеличение вызвано повышением уровней промиостатина в мышце и увеличенным превращением латентного миостатина в активный фактор роста (фиг. 28B). Представленные здесь данные напрямую подтверждали первую стадию этой модели, на которой наблюдали повышенный уровень промиостатина в мышце. Данные также подтверждали вторую стадию, поскольку наблюдали уменьшенную массу мышц у обработанных дексаметазоном мышей, что свидетельствовало об увеличенной выработке зрелого миостатина без сопутствующего увеличения уровня латентного миостатина в мышце. Соответственно, уровень миостатина в плазме уменьшался, что свидетельствовало об увеличенном превращении в зрелый миостатин.

Пример 5.

Иммунопреципитация из мышинной сыворотки и мышечной ткани.

Иммунопреципитацию проводили для определения наличия промиостатина в кровотоке и для исследования связывания Ab2 и AbMyo с эндогенными предшественниками миостатина в сыворотке крови и мышце. Ab2 распознавало основную форму миостатина в мышце. Из представленных на фиг. 27 результатов видно, что пул сывороточного промиостатина осаждался посредством Ab2, что свидетельствовало о наличии внеклеточного промиостатина *in vivo*. Помимо связывания с промиостатином, латентным

миостатином и другими частично процессированными формами миостатина в сыворотке крови, Ab2 способствовал иммунопреципитации промиостатина из мышечных экстрактов. В отличие от этого, AbMyo эффективно связывалось с латентным миостатином и с частично процессированными предшественниками в сыворотке крови, без детектируемых взаимодействий с промиостатином в мышцах. С учетом того, что мышца является местом, где происходит передача сигнала с участием миостатина, это может обеспечить важные преимущества для понимания механизма действия Ab2.

Лизат гомогенизированных мышц получали следующим образом: замороженные квадрицепсы мышцей измельчали с применением измельчителя CryoPrep (Covaris, Уоборн, Массачусетс). Затем измельченную мышцу ресуспендировали до концентрации 50 мг/мл в буфере M-Per (ThermoFisher Scientific) с 1× коктейлем ингибиторов протеаз и фосфатаз Halt™ без ЭДТА (ThermoFisher Scientific). Затем ткань размельчали с помощью пластикового пестика (Bio-Plas, кат. № 4030-PB) и дополнительно гомогенизировали повторным пипетированием с помощью обрезанного наконечника пипетки. Затем образцы мышц инкубировали 30 мин при 4°C с вращением с доннышка на крышку и обратно. Наконец, образцы центрифугировали на 16100g в течение 10 мин для осаждения нерастворимой фракции. Растворимую фракцию отсасывали и применяли в последующих экспериментах.

Для иммунопреципитации антитела Ab2, контр. IgG или AbMyo ковалентно конъюгировали с агарозными гранулами с применением набора для совместной иммунопреципитации Thermo Scientific Pierce™ Co-Immunoprecipitation Kit согласно техническим документам от производителя. 75 мкг каждого антитела конъюгировали с 50 мкл суспензии гранул и в ходе каждой иммунопреципитации использовали 30 мкг антитела. Иммунопреципитацию проводили против 3 мл объединенной нормальной мышшиной сыворотки крови (Bioreclamation) или 1,05 мл гомогенизированного растворимого мышшиного квадрицепса, полученного, как описано выше. Конъюгированные с антителом гранулы и образцы инкубировали при 4°C с перемешиванием с доннышка на крышку и обратно в течение ночи. После инкубации гранулы извлекали путем пропускания всего объема образца через центробежные фильтры, включенные в набор для совместной иммунопреципитации, с применением вакуумного коллектора QIAvac 24 Plus. (Qiagen) Затем гранулы промывали 3× 200 мкл буфера для IP лизиса/промывания и один раз 100 мкл 1× кондиционирующего буфера в соответствии с документацией набора. Элюирования проводили посредством 50 мкл буфера для элюирования в течение пяти минут, а затем смешивали с 5 мкл 1 М Триса, pH 9,5, в пробирке для сбора.

Разновидности миостатина, осажденные тестируемыми антителами, визуализировали с помощью Вестерн-блоттинга с использованием AF1539, (R&D systems) ab124721, (Abcam) IgG осли к антителам овцы Alexa Fluor® 680 AffiniPure (H + L), (Jackson ImmunoResearch) и IgG осли к антителам кролика IRDye® 800CW (H + L) (LI-COR Biosciences) Thermo Scientific. Блокирующий буфер SEA BLOCK использовали для инкубаций с блокирующими и первичными антителами.

Пример 6.

Увеличенная масса мышц и измененная экспрессия миостатинового белка у крыс, обработанных посредством Ab2.

Схема исследования.

Семи-восьминедельным самкам крыс линии Спраг Додли вводили однократную внутривенную дозу либо Ab2 (10 мг/кг), либо нефункционального контрольного человеческого антитела IgG (10 мг/кг), либо эквивалентный объем фосфатно-солевого буферного раствора (PBS). В ходе исследования собирали сыворотку крови у 3 крыс в группе через 4, 48 ч, 7, 14, 21 и 28 дней после введения дозы. Сбор производили стандартными способами, а образцы хранили при -80°C. Массу нежировых тканей измеряли с помощью количественного ядерно-магнитного резонанса (qNMR) на исходном уровне (перед введением дозы на 0-й день) и на 7-, 14-, 21- и 28-й дни (8 крыс/группа), а в конце исследования (28-й день) собирали скелетные мышцы (прямую мышцу бедра, переднюю большеберцовую мышцу и камбаловидную), их взвешивали и подвергали быстрой заморозке в жидком азоте для хранения при -80°C.

Результаты.

Воздействие лекарственного средства измеряли в образцах сыворотки крови с помощью ИФА, специфичного к человеческому IgG, с известными количествами каждого лекарственного средства, используемого в качестве эталонного стандарта. Как показано на фиг. 29, через 4 ч после инъекции как антитело Ab2, так и контрольное IgG детектировались в сыворотке крови крысы. По мере прохождения исследования для Ab2 наблюдали повышенные уровни циркулирующего лекарственного средства относительно контрольного IgG, со средним значением 17,1 мкг/мл лекарственного средства в сыворотке крови в конце исследования.

Фармакодинамические эффекты обработки посредством Ab2 оценивали как путем измерения массы нежировых тканей (с помощью qNMR) в процессе исследования, так и путем определения массы иссеченной мышцы в конце исследования. На фиг. 30A показаны результаты измерения массы нежировых тканей в ходе исследования, причем у крыс, обработанных посредством Ab2, наблюдали явное увеличение массы нежировых тканей по сравнению с крысами, обработанными посредством PBS или человеческим контрольным антителом IgG. В конце исследования (28 дней) измеряли массу мышц путем сбора и

взвешивания целых скелетных мышц. Как показано на фиг. 30B, у крыс, обработанных посредством Ab2, наблюдали увеличение на 14 и 11% значений массы соответственно прямой мышцы бедра и передней большеберцовой мышцы. Совместно эти данные свидетельствовали, что обработка крыс однократной дозой Ab2 приводила к продолжительным увеличениям массы мышц.

Относительные уровни про- и латентного миостатина определяли с помощью количественного вестерн-блоттинга образцов мышечного лизата или сыворотки крови. Получали мышечные лизаты из подвергнутых быстрой заморозке образцов мышц путем измельчения с последующим лизисом в T-PER-буфере, дополненном ингибиторами протеаз и фосфатаз. После лизиса образцы, содержащие белок в равных концентрациях, разделяли на PAGE-гелях и переносили при помощи вестерн-блоттинга на PVDF-мембрану с низкой флуоресценцией. В случае мышечных лизатов на гель загружали 10-50 нг общего белка. Плазму разводили 1:10 в PBS и 10 мкл каждого образца загружали на гель. В качестве размерных стандартов на гель также загружали 0,1-1 нг рекомбинантного про- и/или латентного миостатина. Выявление миостатинового белка осуществляли с применением антитела, распознающего продоминантный латентного миостатина (AF1539, R&D Systems), с последующей детекцией посредством флуоресцентно меченного вторичного антитела. Во всех случаях вестерн-блоттинга анализировали минимум три образца на группу.

Обработка посредством Ab2 увеличивала уровни латентного миостатина в ~20 раз (фиг. 31A) в сыворотке крови крыс по сравнению с обработанными контрольным IgG крысами. Эти данные согласовывались с эффектами, наблюдаемыми с другими лекарственными средствами на основе антител, что отражало связывание мишени лекарственного средства в кровотоке. В мышце крыс (прямой мышце бедра) обработка посредством Ab2 приводила к 1,9-кратному увеличению (относительно обработанных контрольным IgG крыс) латентной формы миостатина. Не наблюдали никакого статистически значимого изменения промиостатина. Эти данные свидетельствовали, что Ab2 связывалось со своей мишенью, про-/латентным миостатином, и изменяло процессирование миостатина как в мышце, так и в кровотоке. Также наблюдали, что обработка посредством Ab2 увеличивала уровень латентного миостатина, но не промиостатина в мышце крыс (фиг. 31B).

Пример 7.

Увеличенная масса мышц и изменение экспрессии миостатинового белка у мышей, обработанных посредством Ab2, и сравнение с антителом сравнения к миостатину

Схема исследования.

Десятидневным самцам SCID мышей вводили однократную внутривенную дозу (5 мг/кг) либо Ab2, либо нефункционального контрольного человеческого антитела IgG, либо антитела сравнения (AbMyo), которое оказывало свое действие путем блокировки взаимодействия миостатина и рецептора. В ходе исследования собирали сыворотку крови и скелетную мышцу через 1, 4, 48 ч, 7, 14, 21, 28 и 56 дней после введения дозы. Сбор сыворотки производили стандартными способами, а образцы хранили при -80°C. Собирали скелетные мышцы (прямую мышцу бедра, переднюю большеберцовую мышцу и камбаловидную), их взвешивали и подвергали быстрой заморозке в жидком азоте для хранения при -80°C. Массу нежировых тканей измеряли с помощью количественного ядерно-магнитного резонанса (qNMR) на исходном уровне (перед введением дозы на 0-й день) и еженедельно на протяжении всего периода исследования.

Результаты.

В ходе исследования фармакодинамические эффекты обработки посредством Ab2 оценивали путем измерения массы нежировых тканей (с помощью qNMR). На фиг. 32 показаны результаты измерения массы нежировых тканей в ходе исследования, причем у мышей, обработанных посредством Ab2, наблюдали явное увеличение массы нежировых тканей по сравнению с мышцами, обработанными человеческим контрольным антителом IgG. В течение первых трех недель исследования у мышей, обработанных антителом сравнения (AbMyo), наблюдали увеличения массы нежировых тканей, эквивалентной показателям в группе Ab2. Тем не менее через 28 дней после введения дозы у мышей, обработанных посредством AbMyo, не сохранялась увеличенная масса нежировых тканей. В отличие от этого, у мышей в группе обработки посредством Ab2 сохранялась увеличенная масса нежировых тканей на протяжении всего периода исследования (56 дней). Эти данные свидетельствовали о том, что Ab2 имело более длительную продолжительность действия, чем AbMyo.

Воздействие лекарственного средства измеряли в образцах сыворотки крови с помощью ИФА, специфичного к человеческому IgG, с известными количествами каждого лекарственного средства, используемого в качестве эталонного стандарта. Как показано на фиг. 33, уже через 1 ч после инъекции в сыворотке крови детектировали как Ab2, так и антитело сравнения (AbMyo), а уровни >1 мкг/мл обоих антител можно было детектировать в течение всего периода исследования. Тем не менее Ab2 характеризуется значительно более длительным периодом полужизни и предполагаемой площадью под кривой (AUCINF), чем AbMyo, что свидетельствует о том, что при аналогичных дозах Ab2 характеризуется значительно большим воздействием, чем AbMyo.

Относительные уровни про- и латентного миостатина определяли с помощью количественного вестерн-блоттинга образцов мышечного лизата или сыворотки крови. Получали мышечные лизаты из под-

вергнутых быстрой заморозке образцов мышц путем измельчения с последующим лизисом в T-PER-буфере, дополненном ингибиторами протеаз и фосфатаз. После лизиса образцы, содержащие белок в равных концентрациях, разделяли на PAGE-гелях и переносили при помощи вестерн-блоттинга на PVDF-мембрану с низкой флуоресценцией. В случае мышечных лизатов на гель загружали 10-50 нг общего белка. Плазму разводили 1:10 в PBS и 10 мкл каждого образца загружали на гель. В качестве размерных стандартов на гель также загружали 0,1-1 нг рекомбинантного про- и/или латентного миостатина. Выявление миостатинового белка осуществляли с применением антитела, распознающего продомен латентного миостатина (AF1539, R&D Systems), с последующей детекцией посредством флуоресцентно меченного вторичного антитела. Во всех случаях вестерн-блоттинга анализировали минимум три образца на группу.

Миостатин в сыворотке измеряли у мышей, обработанных лекарственным средством, и в контролях с использованием флуоресцентного вестерн-блоттинга. Несмотря на увеличенное воздействие Ab2 в сыворотке крови, уровни латентного миостатина в сыворотке у мышей, обработанных как Ab2, так и AbMyo, были схожими (фиг. 34). Эти данные свидетельствовали о том, что уровни циркулирующего свободного лекарственного средства (не связанного с мишенью) в достаточной степени превышали уровень мишени, так что повышенное воздействие Ab2 в сыворотке крови не переходило к большим увеличениям циркулирующего латентного миостатина, в отличие от того, что наблюдали в случае с AbMyo.

Уровни миостатина в мышце (прямой мышце бедра) также оценивали с помощью флуоресцентного вестерн-блоттинга. Относительные уровни латентного миостатина и промиостатина измеряли в мышечных лизатах мышей с помощью флуоресцентного вестерн-блоттинга. Латентный миостатин был повышен как в обработанных посредством Ab2, так и в обработанных посредством AbMyo мышцах (фиг. 35A). Тем не менее повышение латентного миостатина в обработанных посредством AbMyo мышцах возвращается к исходному уровню к 28-му дню, тогда как уровни в обработанных посредством Ab2 мышцах остаются повышенными по меньшей мере до этого момента времени ($P < 0,003$ относительно обработки посредством AbMyo). Схожую тенденцию наблюдали с промиостатином (фиг. 35B), хотя различие не было статистически значимым ($P = 0,068$). Эти данные свидетельствовали о более длительной продолжительности действия Ab2 в месте действия лекарственного средства - скелетной мышце.

Пример 8.

Ab2 повышает выработку мышечного усилия.

В этом примере оценивали эффекты Ab2 на выработку мышечного усилия. Вкратце, самцам мышей C57BL/6J внутрибрюшинно вводили IgG (20 мг/кг), Ab2 с константным участком изотипа IgG₄ мыши (20 мг/кг) или PBS один раз в неделю в течение 4 недель ($n = 10$ на группу).

В конце исследования иссекали и взвешивали мышцы и измеряли мышечную деятельность длинного разгибателя пальцев (EDL) *in vitro* с помощью системы рычагов для исследования мышечной деятельности 305C (Aurora Scientific Inc., Aurora, CAN), снабженной ванной для горизонтальной перфузии. Мышцу помещали в ледяной физиологический буферный раствор и накладывали шов шелковой нитью на проксимальное сухожилие. Мышцу помещали в горизонтальную ванну системы рычагов для исследования мышечной деятельности 305C и перфузировали физиологическим буфером, насыщенным кислородом смесью 95% O₂/5% CO₂, и поддерживали при 37°C.

Швы привязывали к фиксированному упору с одной стороны, а плечо рычага - с другой. Подавали серию 1 и 100 Гц импульсов возбуждения (0,2 мс импульс, длительность 100 мс) с частотой 0,01 Гц через платиновые электроды, фланкирующие мышцы для обеспечения прочности швов и стабильности максимальной развиваемой силы. После стабилизации измеряли прямую стимуляцию мышц - силу относительно частоты. Платиновые проволочные электроды располагали проксимально и дистально относительно мышечного брюшка.

Напряжение при мышечном сокращении отслеживали с помощью 1 мс импульса и увеличивали напряжение до достижения максимальной силы. Затем производили серию стимулов с увеличением частоты стимуляции (1 мс импульс, продолжительность серии 250 мс): 1, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 150 Гц с последующей конечной стимуляцией на частоте 1 Гц.

Как показано на фиг. 36A, после 4 недель обработки посредством Ab2, масса и функциональность мышц увеличивались. Средняя масса EDL увеличивалась на 33%, а значения средней массы икроножной мышцы и квадрицепса увеличивались на 19%.

Как показано на фиг. 36B, способность производить максимальное усилие увеличивалась на 30% после 4 еженедельных доз Ab2.

Несмотря на то, что в настоящем документе были описаны и проиллюстрированы некоторые варианты осуществления настоящего изобретения, рядовые специалисты в настоящей области техники без труда предвидят ряд других средств и/или структур для осуществления функций и/или получения результатов и/или одного или нескольких из описанных в настоящем документе преимуществ, каждое из таких изменений и/или модификаций считают входящими в объем настоящего изобретения. В более общем плане специалисты в настоящей области техники легко поймут, что все описанные в настоящем документе параметры, размеры, материалы и конфигурации понимают как иллюстративные и что фактические параметры, размеры, материалы и/или конфигурации будут зависеть от конкретного применения

или применений, для которых используют идеи настоящего изобретения. Специалисты в настоящей области техники будут знать или смогут установить, с помощью постановки всего лишь рутинного эксперимента, многие эквиваленты описанным в настоящем документе конкретным вариантам осуществления настоящего изобретения. Поэтому следует понимать, что вышеприведенные варианты осуществления представлены лишь в качестве примера и что в объеме пунктов прилагаемой формулы изобретения и их эквивалентов настоящее раскрытие может быть осуществлено на практике иным образом, чем конкретно описано в документе и заявлено в формуле изобретения. Настоящее изобретение относится к каждому отдельному признаку, системе, изделию, материалу и/или способу, которые описаны в настоящем документе. Кроме того, в объем настоящего изобретения включена любая комбинация двух или более таких признаков, систем, изделий, материалов и/или способов, если такие признаки, системы, изделия, материалы и/или способы не являются взаимоисключающими.

Применяемые в контексте настоящего документа и формулы изобретения формы единственного числа, если явно не указано обратное, следует понимать как "по меньшей мере одно".

Применяемую в контексте настоящего документа и формулы изобретения фразу "и/или" следует понимать как означающую "любой из или оба" соединенных таким образом элемента, т.е. элемента, которые в некоторых случаях присутствуют совместно, а в других случаях присутствуют раздельно. Не обязательно могут присутствовать другие элементы, отличные от элементов, конкретно определенных в предложении с "и/или", независимо от того, связаны они или не связаны с теми элементами, которые конкретно указаны, если явно не указано иное. Таким образом, в качестве неограничивающего примера отсылка к "А и/или В" при использовании в сочетании с открытой формулировкой, например "включающий", может относиться в соответствии с одним вариантом осуществления к А без В (необязательно включая отличные от В элементы); в соответствии с другим вариантом осуществления - к В без А (необязательно включая отличные от А элементы); в соответствии с еще одним вариантом осуществления как к А, так и к В (необязательно включая другие элементы) и т. д.

Применяемый в контексте настоящего документа и формулы изобретения термин "или" следует понимать как имеющее такое же значение, что и "и/или", которое приведено выше. Например, при разделении элементов в перечне "или" или "и/или" следует истолковывать как включительные, т.е. включение по меньшей мере одно, но также включая более одного из ряда или перечня элементов, и, необязательно, дополнительные не приведенные в перечне элементы. Лишь термины, явно обозначенные противоположным образом, такие как "лишь один из" или "только один из", или в случае формулы изобретения "состоящие из", будут обозначать включение только одного элемента из ряда или перечня элементов. В общем случае применяемый в контексте настоящего документа термин "или" следует истолковывать как указание на исключительные альтернативы (т.е. "одно или другое, но не оба"), если ему предшествуют условия исключительности, такие как "любой из", "один из", "лишь один из" или "только один из". "Фактически состоящий из" при использовании в формуле изобретения будет иметь свое обычное значение, которое используют в области патентного права.

Применяемую в контексте настоящего описания и формулы изобретения фразу "по меньшей мере один" в отношении перечня из одного или нескольких элементов следует понимать как означающую по меньшей мере один элемент, выбранный из любого одного или нескольких элементов в перечне элементов, но необязательно включающую по меньшей мере один из абсолютно всех элементов, которые конкретно указаны в перечне элементов, и не исключаящую каких-либо сочетаний элементов в перечне элементов. Это определение также предусматривает, что необязательно могут присутствовать элементы, отличные от элементов, конкретно указанных в перечне элементов, к которому относится фраза "по меньшей мере один", независимо от того, связаны ли они или нет с такими конкретно указанными элементами. Так, в качестве неограничивающего примера "по меньшей мере один из А и В" (или, что эквивалентно, "по меньшей мере один из А или В", или, что эквивалентно, "по меньшей мере один из А и/или В") может обозначать, в соответствии с одним вариантом осуществления, по меньшей мере один, необязательно включая более одного, А, но без В (и необязательно включая в себя отличные от В элементы); в соответствии с другим вариантом осуществления по меньшей мере один, необязательно включая более одного, В, но без А (и необязательно включая в себя отличные от А элементы); в соответствии с еще одним вариантом осуществления по меньшей мере один, необязательно включая более одного, А и по меньшей мере один, необязательно включая более одного, В (и необязательно включающий другие элементы); и т. д.

В формуле изобретения, а также в приведенном выше описании все переходные фразы, такие как "охватывающий", "включающий", "несущий", "имеющий", "содержащий", "вовлекающий", "удерживающий" и т.д., следует понимать как открытые, т.е. означающие включение, но без ограничения. Только переходные фразы "состоящий из" и "фактически состоящий из" должны быть соответственно закрытыми или полужакрытыми переходными фразами, как указано в Руководстве по патентной экспертизе Патентного ведомства США, раздел 2111.03.

Применение порядковых терминов, таких как "первый", "второй", "третий" и т.д. в пунктах формулы изобретения для модификации элемента пункта формулы изобретения само по себе не означает какой-либо приоритет, предпочтение или порядок одного элемента пункта формулы изобретения относи-

тельно другого или означает временный порядок, в котором выполняют действия способа, но их используют лишь в качестве обозначений, проводящих различие одного элемента пункта формулы изобретения, имеющего определенное название, от другого элемента, имеющего такое же название (но в случае применения порядкового термина) для того, чтобы различать такие элементы пункта формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с про-/латентным миостатином и содержит вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 25, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 31.

2. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1, причем антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 50.

3. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1 или 2, причем антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 51.

4. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с про-/латентным миостатином и содержит

вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность CDRH1, содержащую SEQ ID NO: 1, последовательность CDRH2, содержащую SEQ ID NO: 6, и последовательность CDRH3, содержащую SEQ ID NO: 11; и

вариабельный участок легкой цепи, содержащий последовательность CDRL1, содержащую SEQ ID NO: 14, последовательность CDRL2, содержащую SEQ ID NO: 20, и последовательность CDRL3, содержащую SEQ ID NO: 23.

5. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.4, причем вариабельный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 26.

6. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.4 или 5, причем вариабельный участок легкой цепи содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 32.

7. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.4, причем вариабельный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 27.

8. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.4 или 7, причем вариабельный участок легкой цепи содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 33.

9. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с про-/латентным миостатином и содержит

вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность CDRH1, содержащую SEQ ID NO: 1, последовательность CDRH2, содержащую SEQ ID NO: 8, и последовательность CDRH3, содержащую SEQ ID NO: 11; и

вариабельный участок легкой цепи, содержащий последовательность CDRL1, содержащую SEQ ID NO: 16, последовательность CDRL2, содержащую SEQ ID NO: 20, и последовательность CDRL3, содержащую SEQ ID NO: 23.

10. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.9, причем вариабельный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 28.

11. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.9 или 10, причем вариабельный участок легкой цепи содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 34.

12. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.9, причем вариабельный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 29.

13. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.9 или 12, причем вариабельный участок легкой цепи содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 35.

14. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-13, причем антитело или антигенсвязывающий фрагмент:

- (i) представляет собой человеческое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент;
- (ii) содержит константный домен IgG₄ или
- (iii) содержит константный домен IgG₄, имеющий замену в остоле Ser на Pro, которая дает IgG₄-подобный шарнир и обеспечивает образование межцепочечных дисульфидных связей.

15. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-14, причем антитело или антигенсвязывающий фрагмент:

- (i) не связывается со зрелым миостатином;
- (ii) ингибирует протеолитическое образование зрелого миостатина с участием толлоидной протеазы;
- (iii) ингибирует протеолитическую активацию про-/латентного миостатина в зрелый миостатин;
- (iv) является перекрестно-реактивным с человеческим и мышинным про-/латентным миостатином и/или

(v) не связывается с GDF11 или активином.

16. Способ снижения активации рецептора миостатина в клетках, присутствующих в среде, содержащей про-/латентный миостатин, причем способ предусматривает доставку в среду антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-15 в количестве, эффективном для ингибирования про-теолитической активации про-/латентного миостатина.

17. Способ лечения субъекта, имеющего или подверженного риску развития заболевания, ассоциированного с про-/латентным миостатином, выбранного из миопатии, и заболевания или состояния, связанного с метаболическим нарушением и/или конституцией организма, причем способ предусматривает введение субъекту антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-15 в количестве, эффективном для лечения указанных миопатии, заболевания или состояния.

18. Способ по п.17, причем

миопатия представляет собой или ассоциирована с мышечной атрофией, первичной миопатией, вторичной миопатией, амиотрофическим боковым склерозом, спинальной мышечной атрофией (SMA), мышечной дистрофией, андрогенной недостаточностью, метаболической миопатией, приобретенной миопатией, врожденной миопатией, миозитом, оссифицирующим миозитом, рабдомиолизом, миоглобинурией, дисфункциональной атрофией и/или кахексией и/или

заболевание или состояние, связанное с метаболическим нарушением и/или конституцией организма, представляет собой или ассоциировано с ожирением, синдромом Прадера-Вилли, сахарным диабетом II типа и/или анорексией.

19. Способ по п.17 или 18, причем

первичная миопатия включает дисфункциональную атрофию;

вторичная миопатия включает денервацию, генетическую мышечную слабость или кахексию;

мышечная дистрофия включает мышечную дистрофию Дюшенна, мышечную дистрофию Беккера, фациоскапулохумеральную (FSH) мышечную дистрофию или тазово-плечевую мышечную дистрофию;

метаболическая миопатия включает болезнь накопления гликогена или нарушение накопления липидов;

приобретенная миопатия включает миопатию, индуцированную внешним веществом;

врожденная миопатия включает сцепленную с X-хромосомой миотубулярную миопатию, аутосомно-доминантную центроядерную миопатию, аутосомно-рецессивную центроядерную миопатию, прогрессирующую врожденную нитеобразную миопатию или врожденную миопатию с диспропорцией волокон;

миозит включает дерматомиозит, полимиозит или миозит с включенными тельцами;

дисфункциональная атрофия ассоциирована с переломом шейки бедра, элективной заменой сустава, критическим состоянием при миопатии, повреждением спинного мозга (SCI) или инсультом и/или

кахексия ассоциирована с почечной недостаточностью, СПИДом, состоянием при сердечной недостаточности, злокачественной опухолью или старением.

20. Способ по любому из пп.17-19, причем указанная миопатия, заболевание или состояние представляют собой или ассоциирована(о) с ожирением, андрогенной недостаточностью, мышечной атрофией, SMA, и/или SCI.

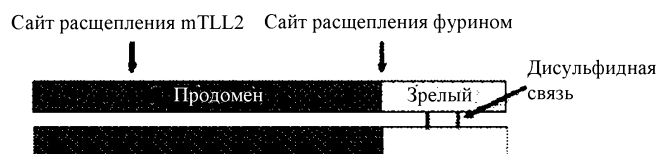
21. Способ по любому из пп.17-20, причем лечение увеличивает мышечную массу у субъекта.

22. Способ по любому из пп.17-21, причем лечение предупреждает дистрофию мышечной ткани и/или уменьшает атрофию мышц у субъекта.

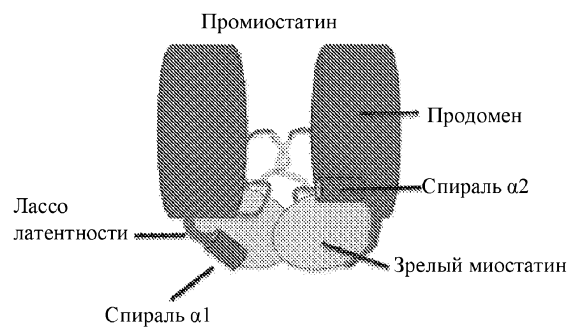
23. Фармацевтическая композиция для лечения заболевания, ассоциированного с про-/латентным миостатином, выбранного из миопатии, и заболевания или состояния, связанного с метаболическим нарушением и/или конституцией организма, содержащая антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-15 и фармацевтически приемлемый носитель.

24. Нуклеиновая кислота, кодирующая антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-15.

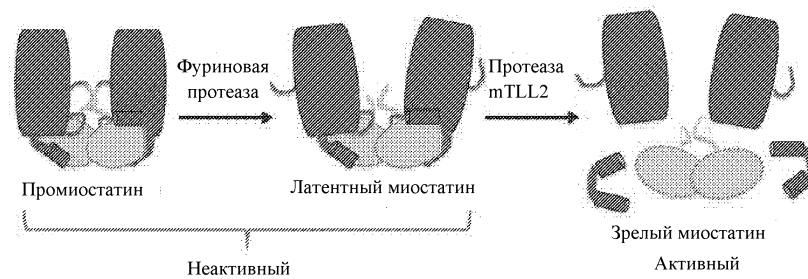
25. Нуклеиновая кислота по п.24, причем нуклеиновая кислота содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 39, кодирующую переменный участок тяжелой цепи, и последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 45, кодирующую переменный участок легкой цепи.



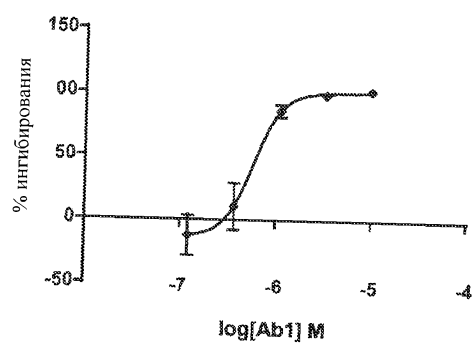
Фиг. 1А



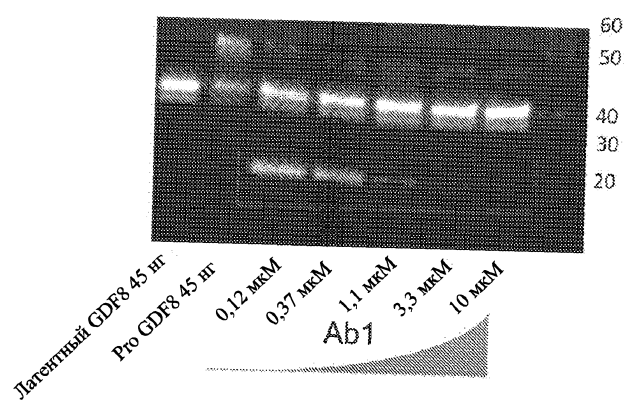
Фиг. 1В



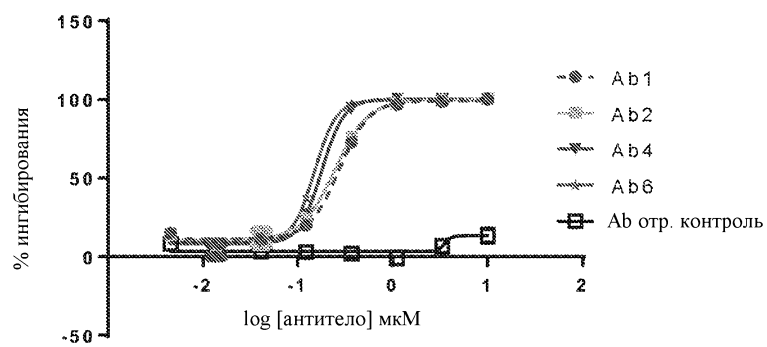
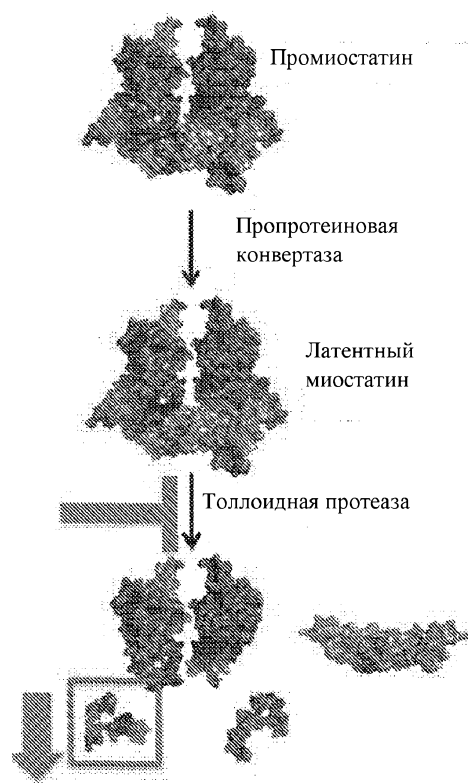
Фиг. 2



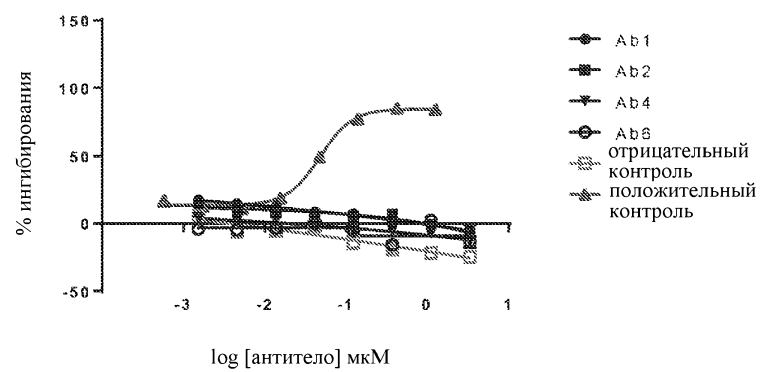
Фиг. 3А



Фиг. 3В

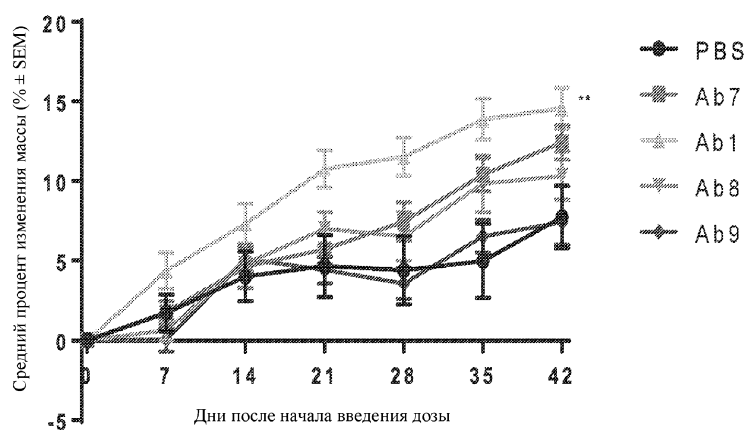


Фиг. 4

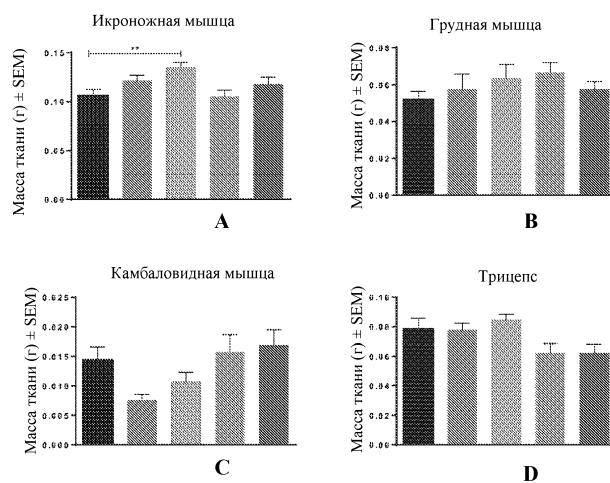


Фиг. 5

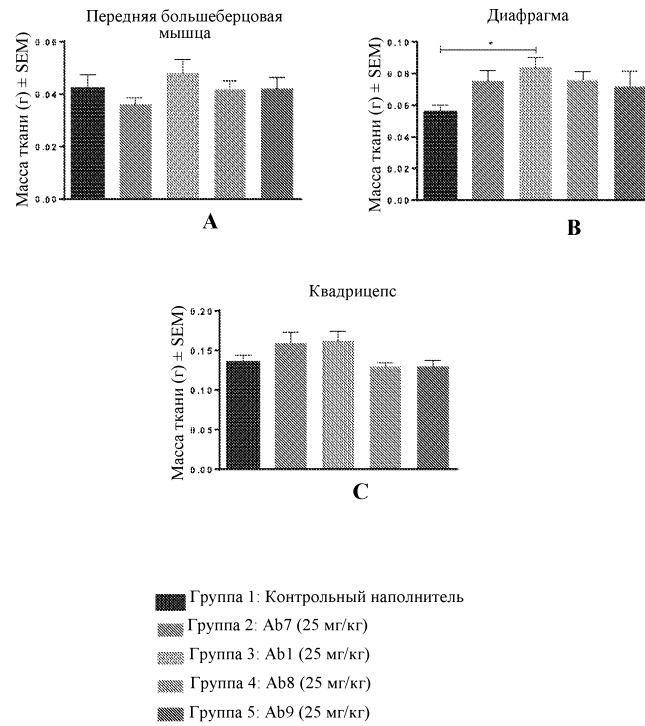
Средний процент изменения массы



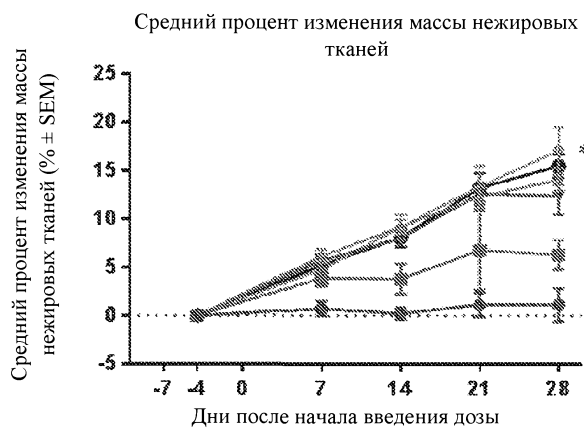
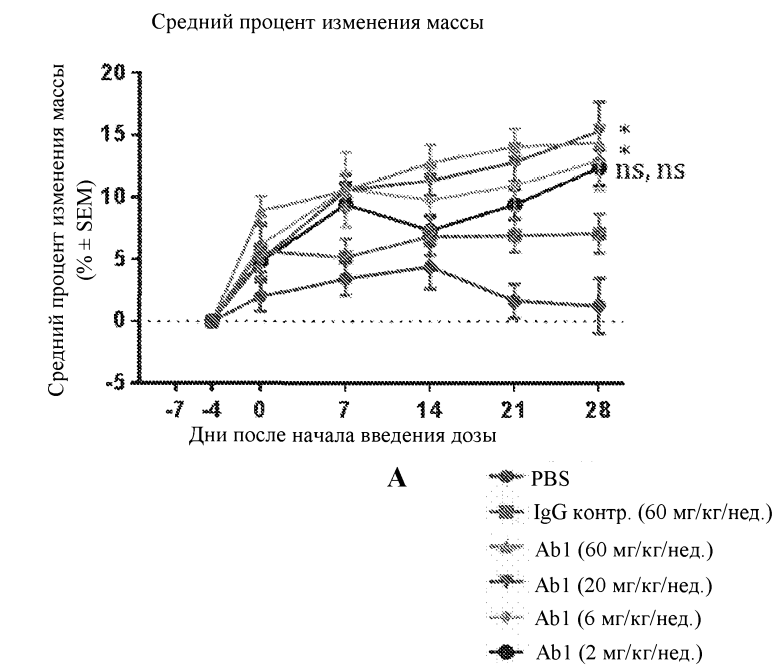
Фиг. 6



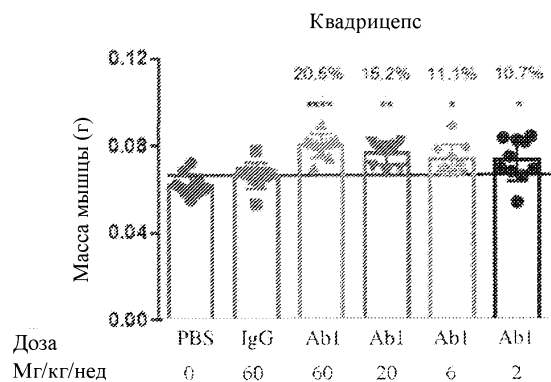
Фиг. 7



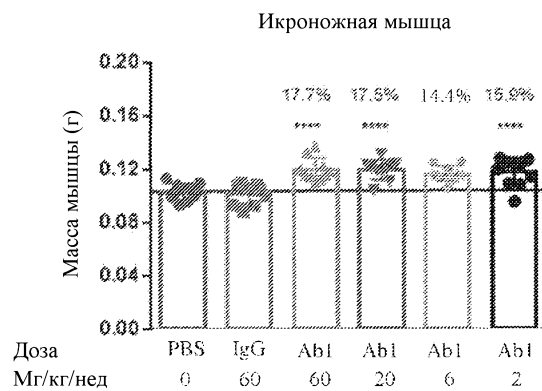
Фиг. 8



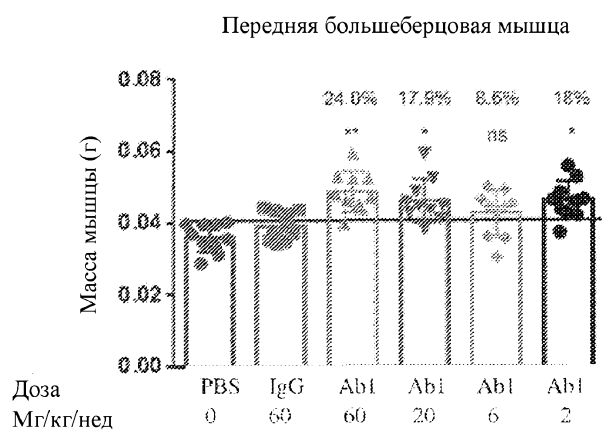
Фиг. 9



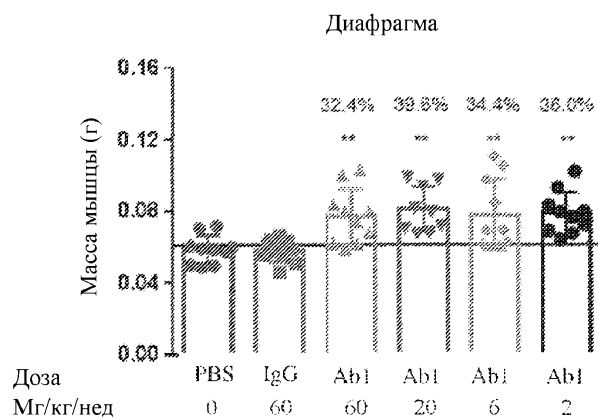
Фиг. 10А



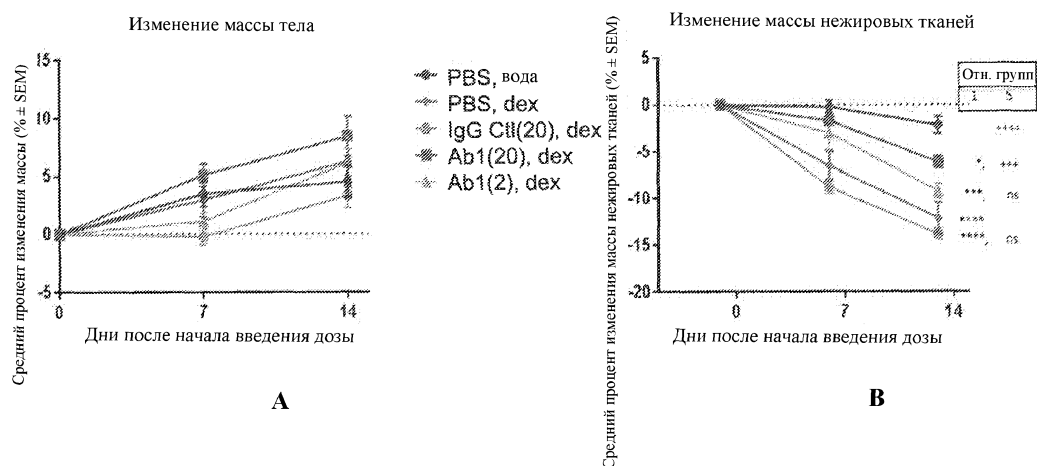
Фиг. 10В



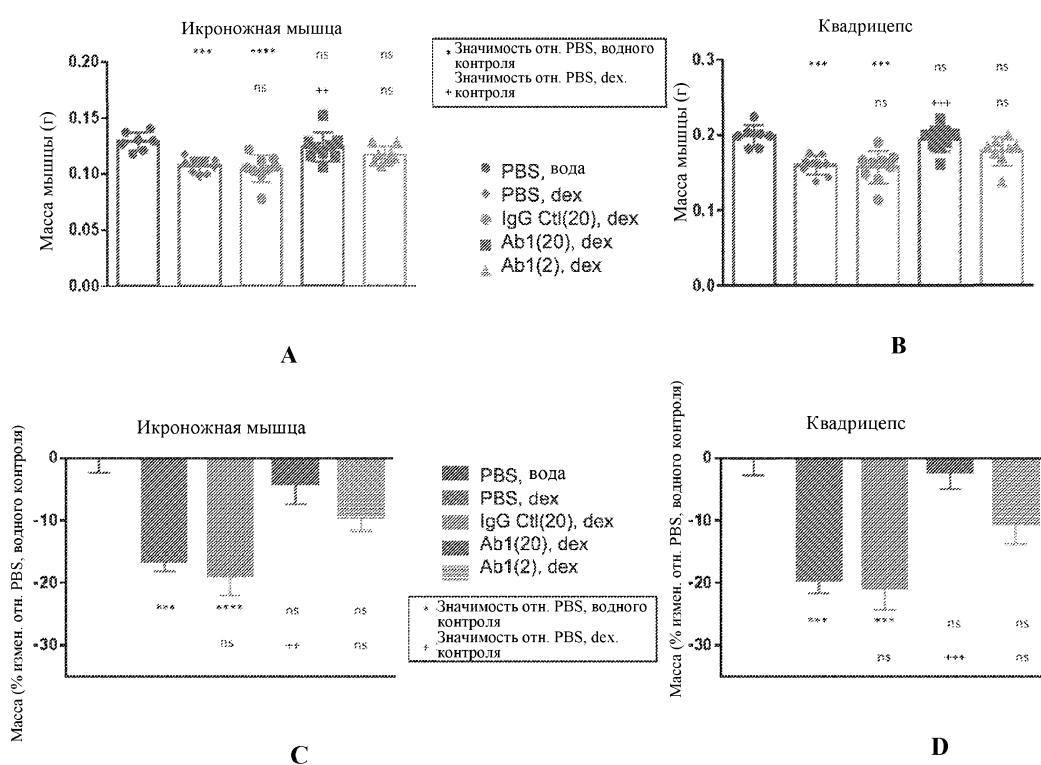
Фиг. 10С



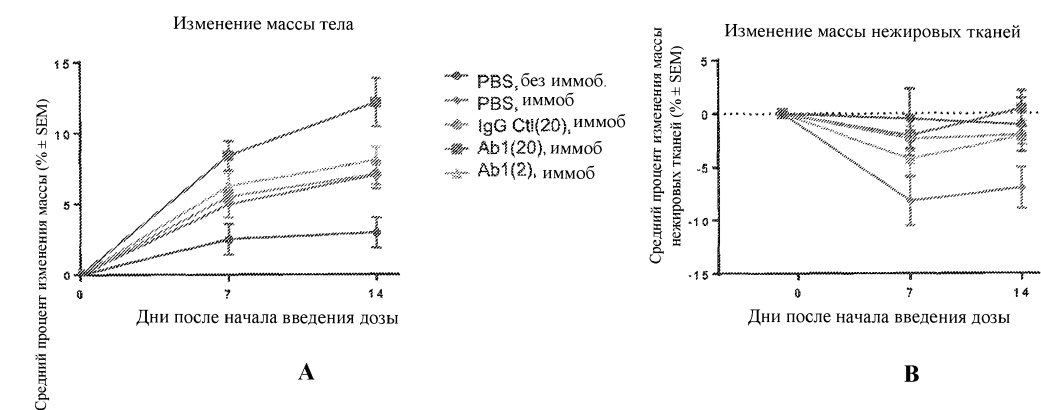
Фиг. 10D



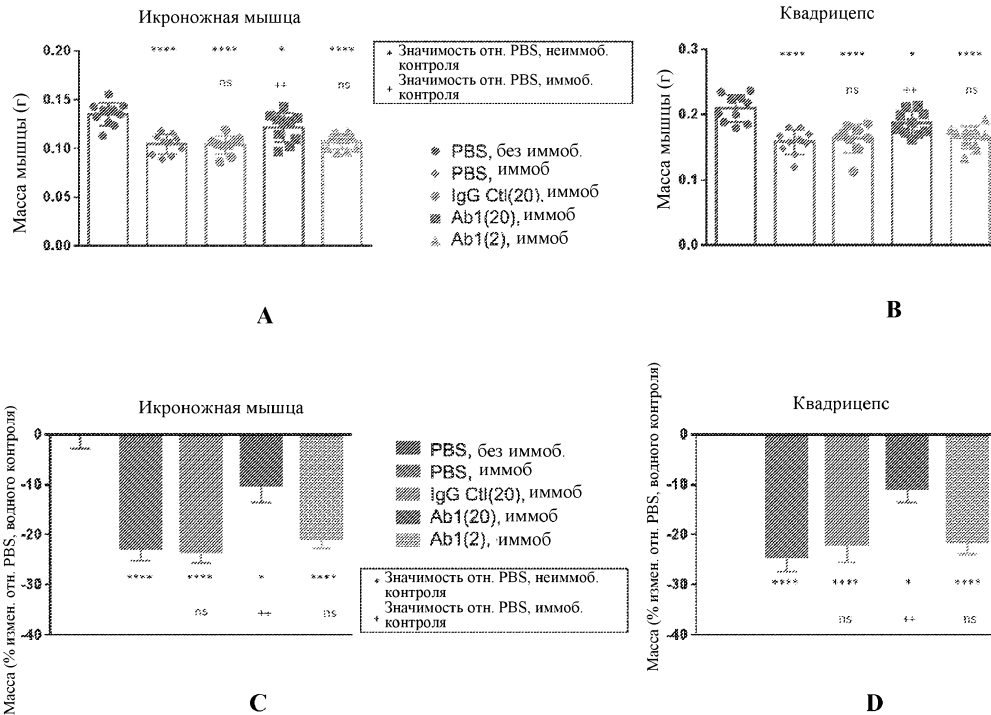
Фиг. 11



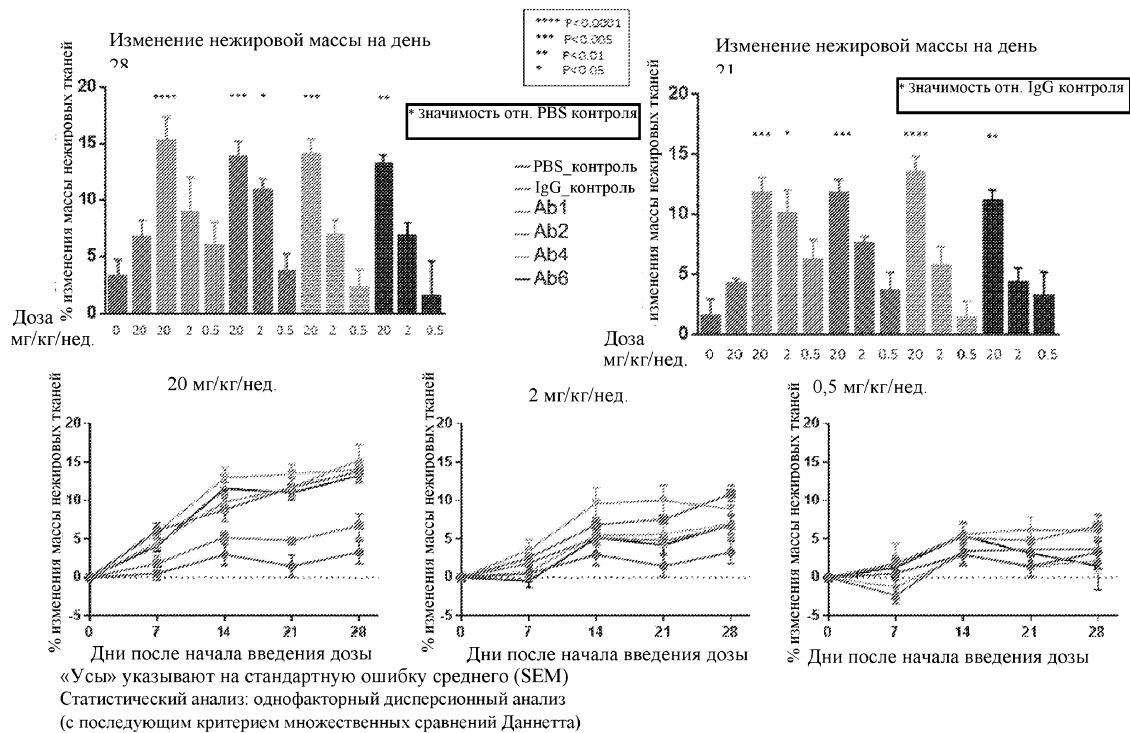
Фиг. 12



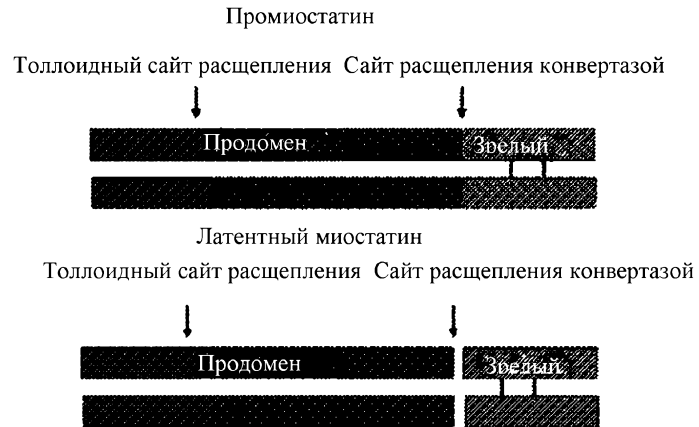
Фиг. 13



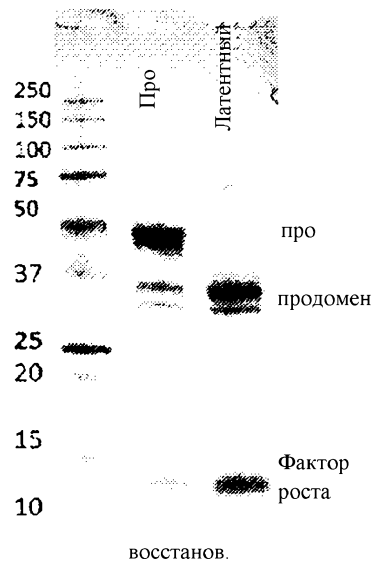
Фиг. 14



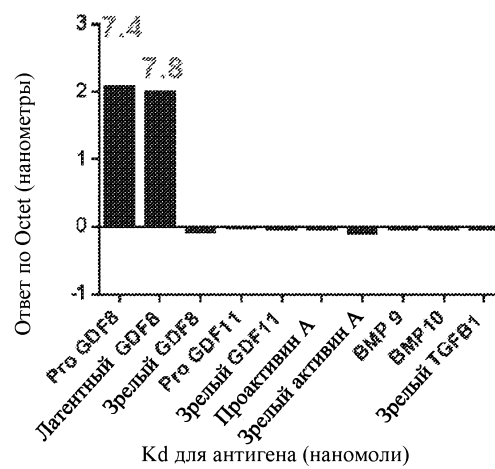
Фиг. 15



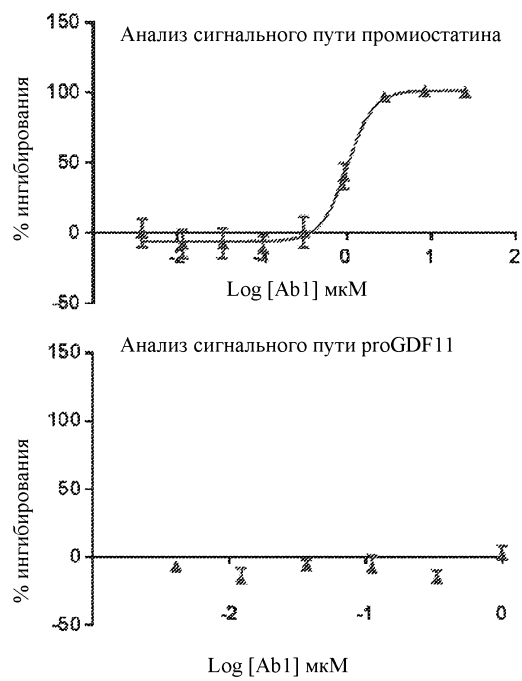
Фиг. 16А



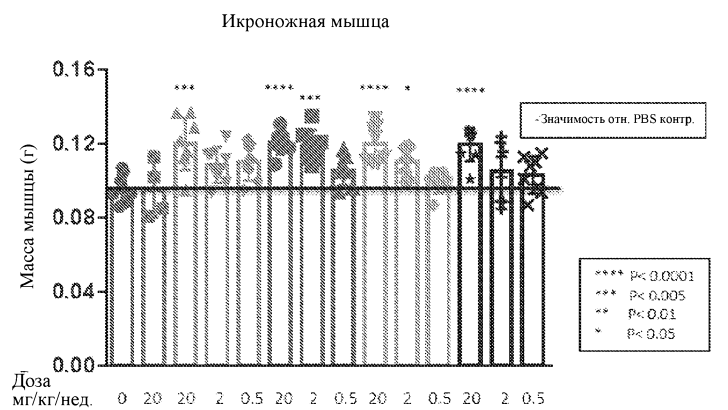
Фиг. 16В



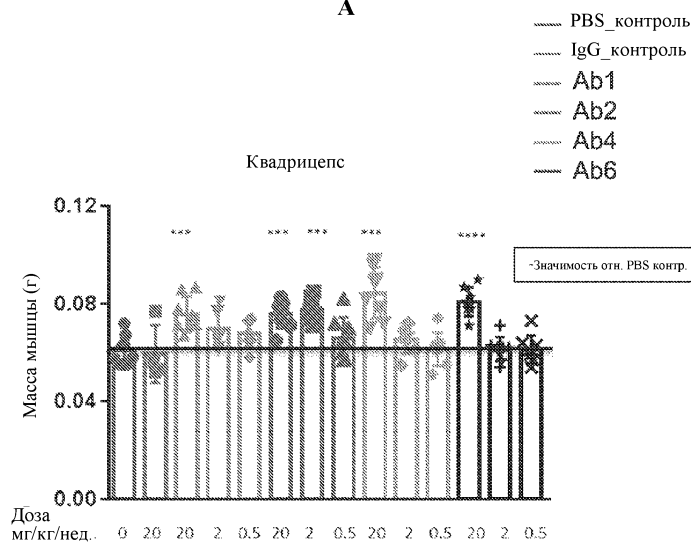
Фиг. 17А



Фиг. 17В



А

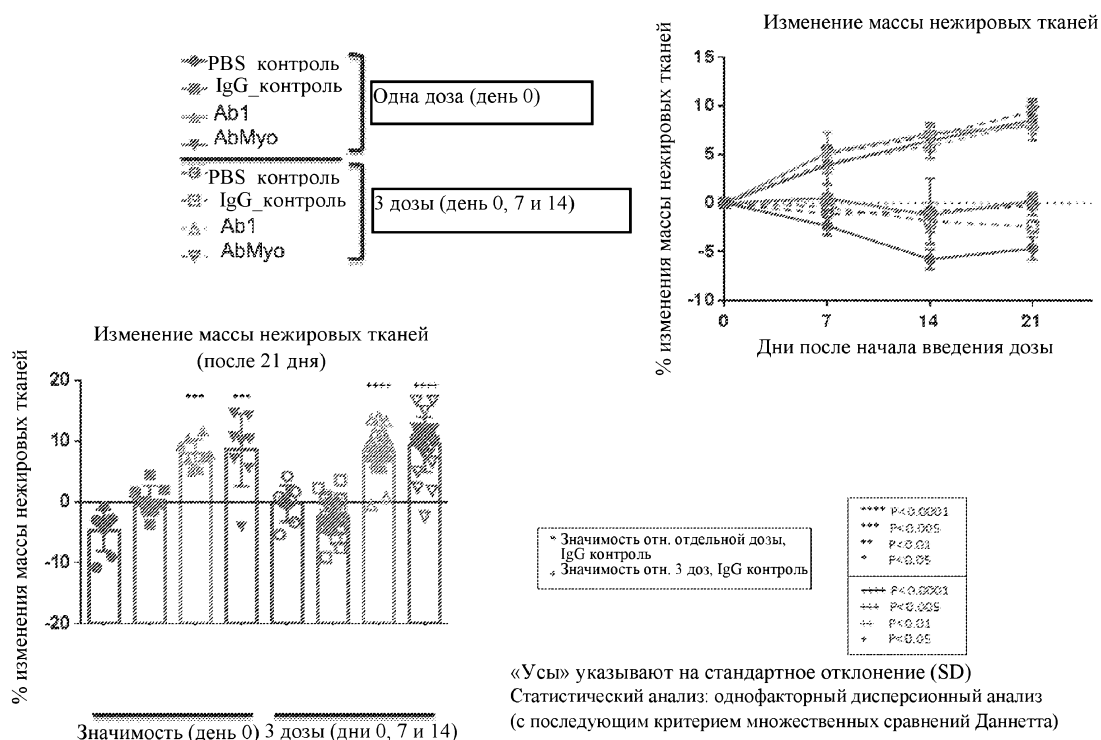


В

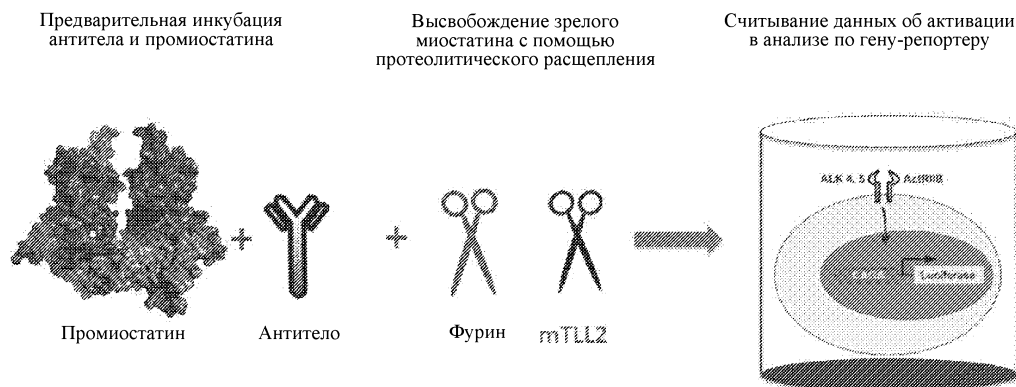
Мышца	Ab	PBS_контр.	20 мг/кг/нед.	2 мг/кг/нед.	0,5 мг/кг/нед.
Икроножная	Ab1	0	25,1	13,0	14,9
Икроножная	Ab2	0	25,6	24,0	9,8
Икроножная	Ab4	0	25,0	15,0	3,1
Икроножная	Ab6	0	24,8	9,3	7,4
Квадрицепс	Ab1	0	23,9	13,9	10,8
Квадрицепс	Ab2	0	23,9	26,1	7,6
Квадрицепс	Ab4	0	37,8	6,4	0,2
Квадрицепс	Ab6	0	32,0	0,4	0,2

С

Фиг. 18



Фиг. 19



Фиг. 20

```

1 QVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYY 60
61 AAGSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLLVRFLEWSHYGMDVWGGQT 120
121 TVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP 180
181 AVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGKTYTCNVDRKPSNTKVDKRVESKYGPCCPCPAPEF 240
241 LGGPSVFLFPPKPKDLMISRTPVTCVVDVSQEDPEVQFNNWYVDGVEVHNAKTKPREE 300
301 QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPS 360
361 QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFFLYSRLTVDK 420
421 SRWQEGNVFSCGVMEALHNHYTQKSLSLSLG 452

```

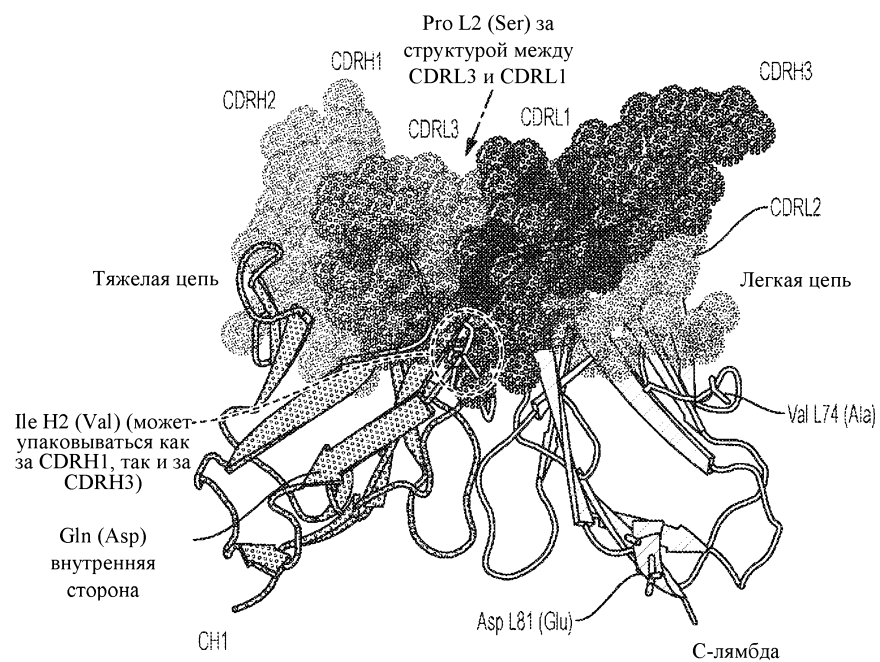
Фиг. 21A

```

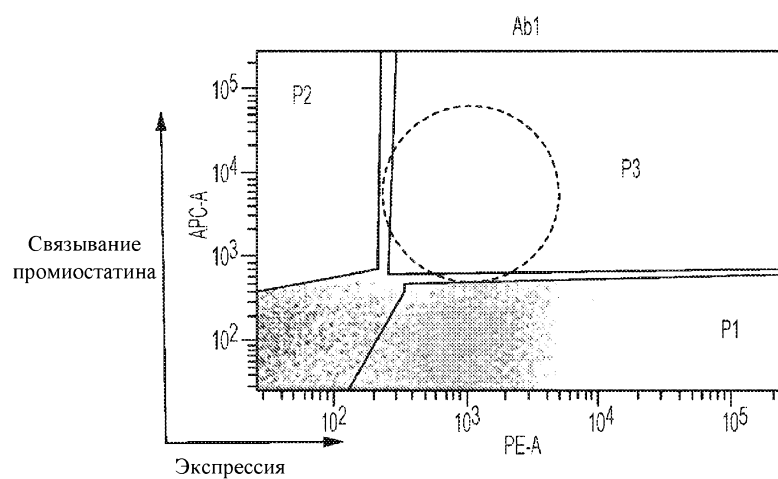
1 QSVLTQPPSASGTPGQRTTSCSGSSNIGSNTVHWYQQLPCTAPKLLIYSDNQRPSGVP 60
61 DRFGSGKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDNLNGVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTL 120
121 FPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSSPVKAGVETTTPSKQSNKRYAASSY 180
181 LLSLTPEQWKSHRYSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS 215

```

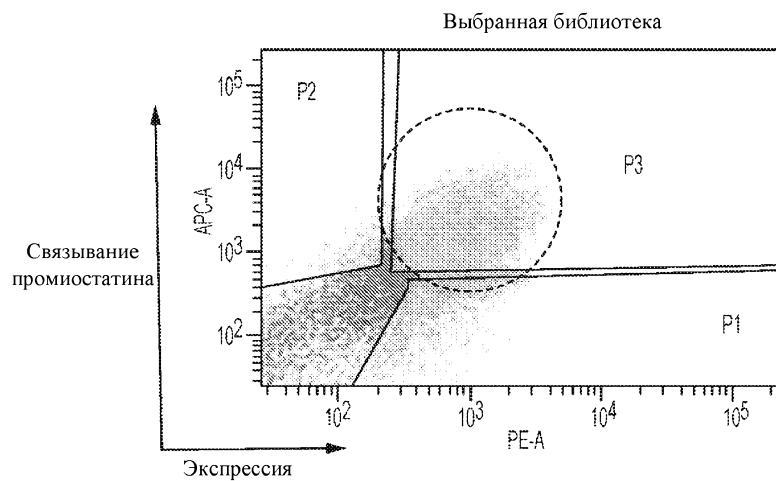
Фиг. 21B



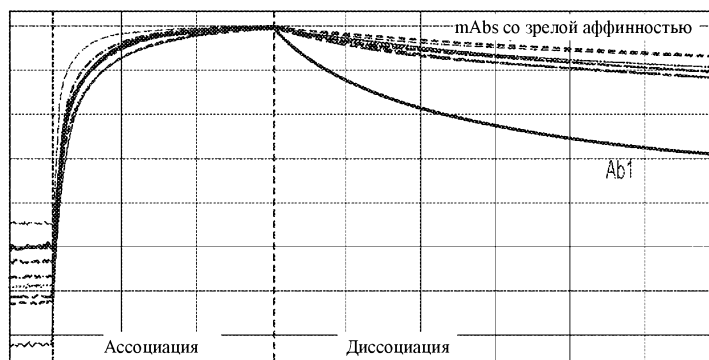
Фиг. 22



Фиг. 23А



Фиг. 23В



Топ 12 клонов, выбранных для дальнейшего анализа харак-к

Ab1: 4,8 нМ

Ab4: 0,47 нМ в 10 раз улучшенная

Ab6: 0,48 нМ в 10 раз улучшенная

mAb с лучшей зрелой аффинностью: <10 пМ > в 480 раз улучшенная

Фиг. 23С

	Каркас 1	CDR1	Каркас 2
Ab1	QIQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAAS	<u>GFTFSSYGMH</u>	WVRQAPEGKLEWVA
Ab3	QIQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAAS	<u>GFAFSSYGMH</u>	WVRQAPEGKLEWVA
Ab5	QIQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAAS	<u>GFAFSSYGMH</u>	WVRQAPEGKLEWVA
	CDR2	Каркас 3	
Ab1	<u>VISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR</u>		
Ab3	<u>VISYDGSIKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR</u>		
Ab5	<u>VISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR</u>		
	CDR3	Каркас 4	
Ab1	<u>DLLVRFLEWSHYGMDVWGQGT</u>	TVTVSS	
Ab3	<u>DLLVRFLEWSHKYGMDVWGQGT</u>	TVTVSS	
Ab5	<u>DLLVRFLEWSHKYGMDVWGQGT</u>	TVTVSS	

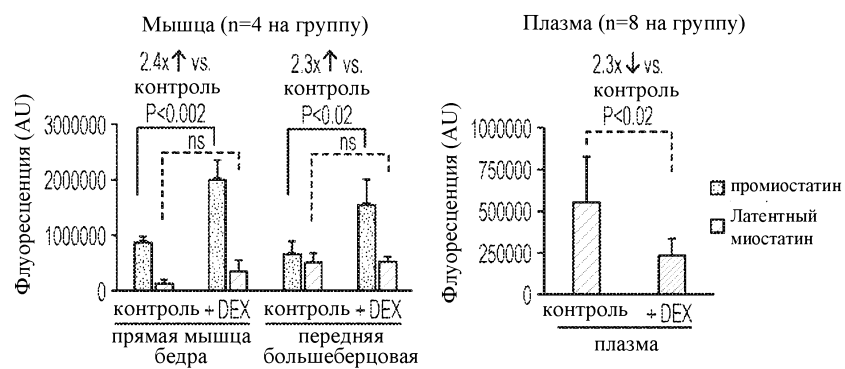
Фиг. 24А

	Каркас 1	CDR1	Каркас 2
Ab1	QPVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSS	<u>SNIGSNTVHWYQQLPGTA</u>	PKLIY
Ab3	QPVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGST	<u>SNIGSNTVHWYQQLPGTA</u>	PKLIY
Ab5	QPVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSS	<u>SNIGCNTVHWYQQLPGTA</u>	PKLIY
	CDR2	Каркас 3	
Ab1	<u>SDNQRP</u>	SGVPDRFSGSKSGTSASLVISGLQSDDEADYYC	
Ab3	<u>SDNQRP</u>	SGVPDRFSGSKSGTSASLVISGLQSDDEADYYC	
Ab5	<u>SDNQRP</u>	SGVPDRFSGSKSGTSASLVISGLQSDDEADYYC	
	CDR3	Каркас 4	
Ab1	<u>AAWDDSLNGV</u>	FGGGTKITVL	
Ab3	<u>AAWDESLNGV</u>	FGGGTKITVL	
Ab5	<u>AAWDESLNGV</u>	FGGGTKITVL	

Фиг. 24В

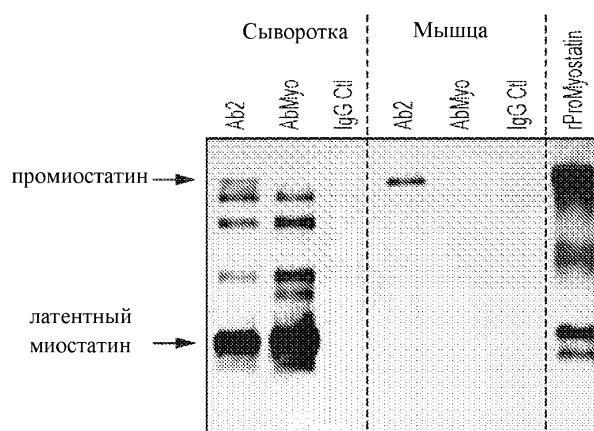


Фиг. 25

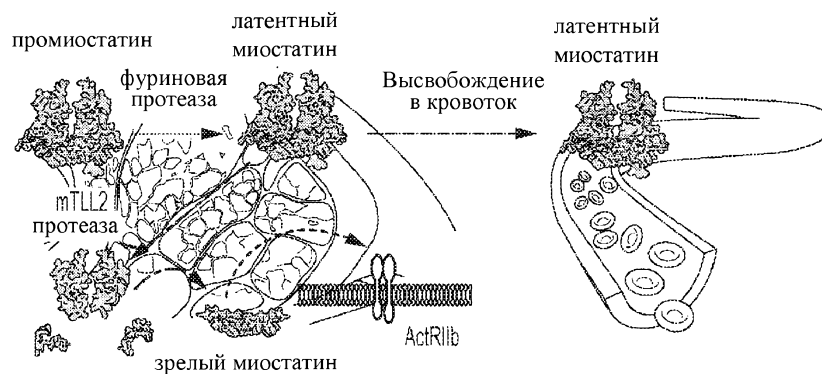


Фиг. 26

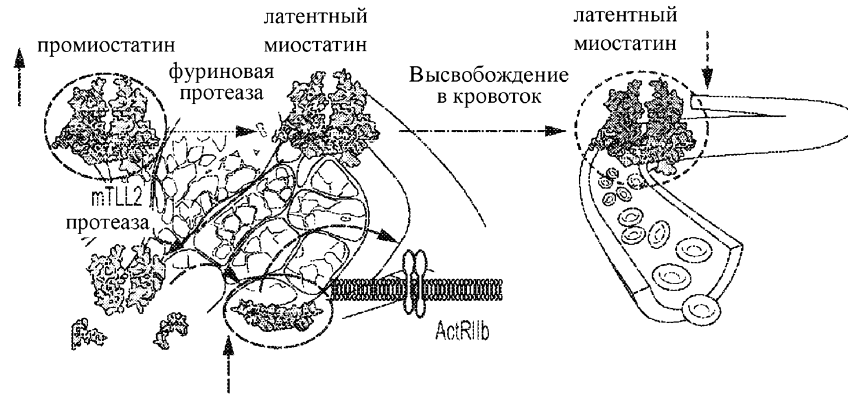
Иммунопреципитации



Фиг. 27



Фиг. 28А



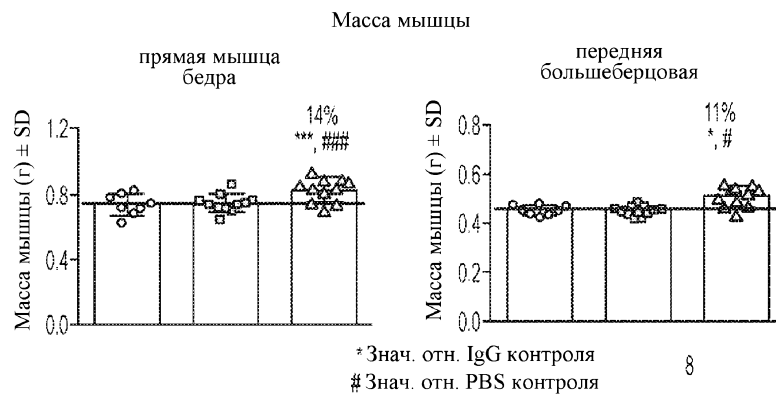
Фиг. 28В



Фиг. 29



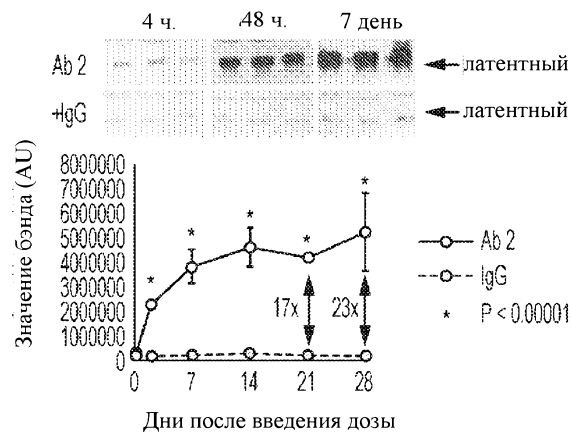
Фиг. 30А



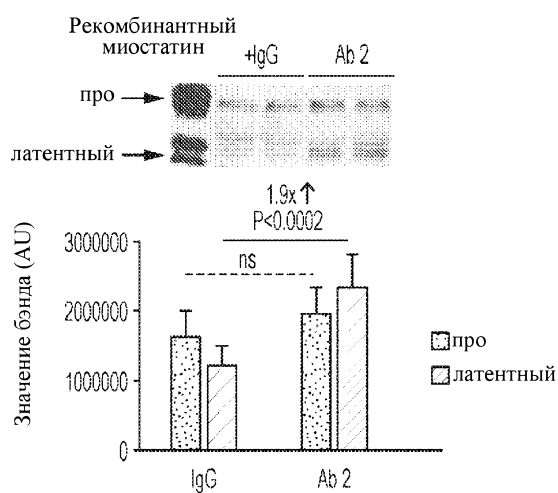
* Знач. отн. IgG контроля

Знач. отн. PBS контроля

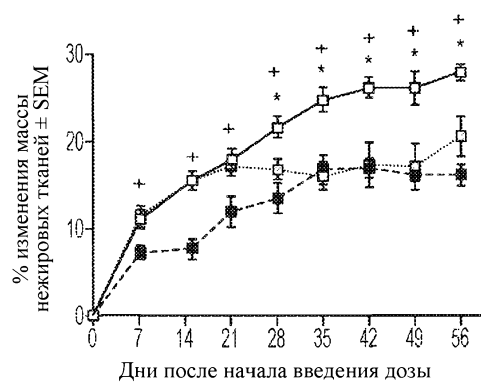
Фиг. 30В



Фиг. 31А

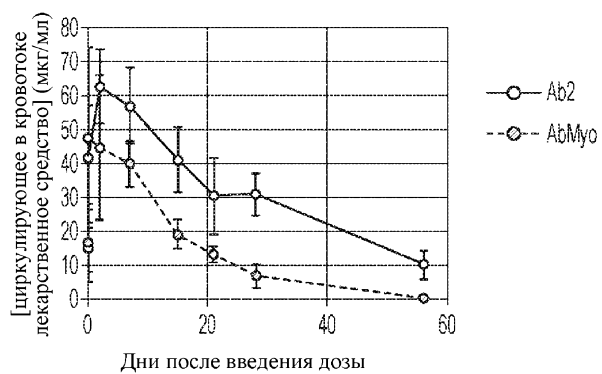


Фиг. 31В

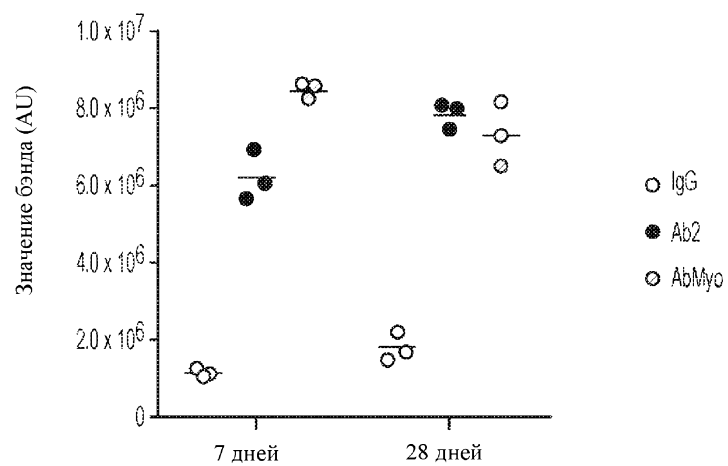


—□— Ab2
 -■- IgG контр. (5 мг/кг)
 AbMyo
 * P < 0.01 (Ab2 vs. AbMyo)
 + P < 0.01 (Ab2 vs. IgG)

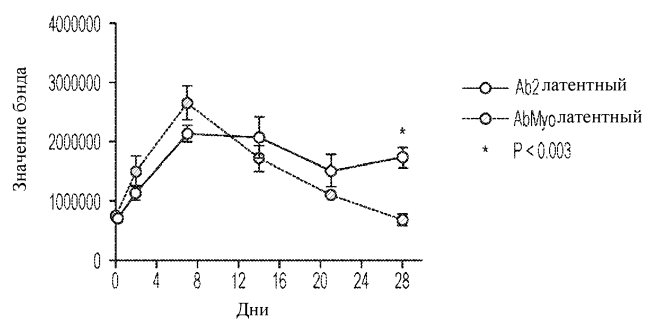
Фиг. 32



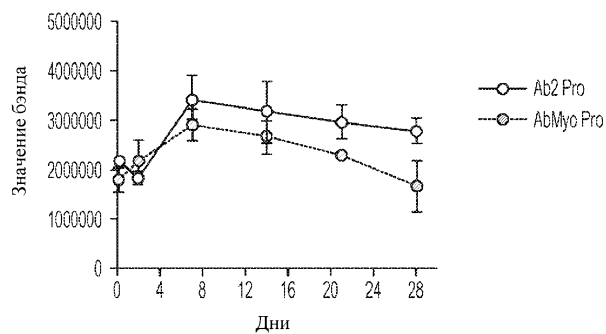
Фиг. 33



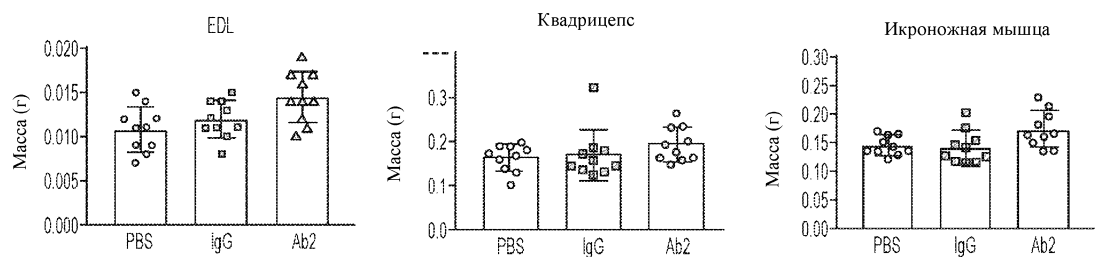
Фиг. 34



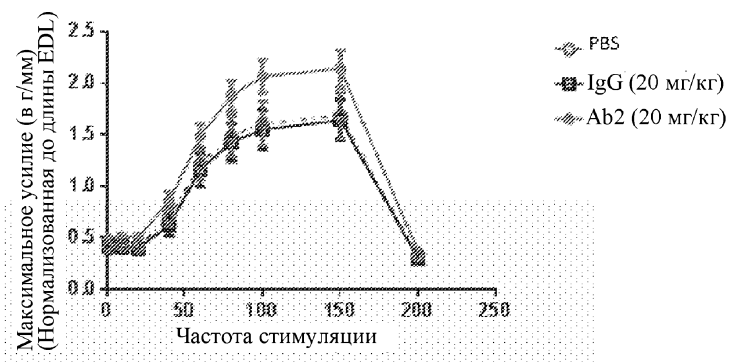
Фиг. 35А



Фиг. 35В



Фиг. 36А



Фиг. 36В

