

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **036740**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.12.15

(51) Int. Cl. **C07K 16/22 (2006.01)**

(21) Номер заявки
201491286

(22) Дата подачи заявки
2012.12.11

(54) **СПОСОБ УВЕЛИЧЕНИЯ ВЫСОТЫ АЛЬВЕОЛЯРНОГО ОТРОСТКА ПОСРЕДСТВОМ ПРИМЕНЕНИЯ АНТИТЕЛ К СКЛЕРОСТИНУ**

(31) **61/580,964**

(56) **WO-A1-2011128424**

(32) **2011.12.28**

WO-A2-2010100179

(33) **US**

US-A1-2010226928

(43) **2014.09.30**

WO-A2-2006119107

(86) **PCT/US2012/068975**

(87) **WO 2013/101451 2013.07.04**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ЭМДЖЕН ИНК.; ДЗЕ РИДЖЕНТС
ОФ ДЗЕ ЮНИВЕРСИТИ ОФ
МИЧИГАН (US)**

(72) Изобретатель:
**Кэ Хуа Чжу, Лю Минь, Джаннобайл
Уилльям В. (US)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к способу увеличения высоты альвеолярного отростка, включающему введение антитела к склеростину субъекту, нуждающемуся в этом.

B1

036740

036740 B1

Настоящая заявка заявляет приоритет относительно предварительной заявки США №61/580964, поданной 28 декабря 2011 года. Раскрытие приоритетной заявки включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Область техники

Настоящее изобретение в целом относится к способам применения ингибиторов склеростина для лечения потери костной массы альвеолярного отростка.

Включение материала, поданного в элэктронном виде, посредством ссылки

Включенный в качестве ссылки во всей своей полноте машинно-читаемый перечень нуклеотидных/аминокислотных последовательностей представлен одновременно с настоящей заявкой и обозначен следующим образом: ASCII (текстовый) файл с названием "46570_SeqListing.txt," 805989 байт, созданный 7 декабря 2012 г.

Включение посредством ссылки

Следующие заявки включены в данное описание во всей своей полноте посредством ссылки: заявка на патент США №11/410540, поданная 25 апреля 2006 года, которая заявляет приоритет относительно предварительной заявки на патент США №60/792645, поданной 17 апреля 2006 года, предварительной заявки на патент США №60/782244, поданной 13 марта 2006 года, предварительной заявки на патент США №60/776847, поданной 24 февраля 2006 года и предварительной заявки на патент США №60/677583, поданной 3 мая 2005 года; и заявка на патент США №11/411003 (опубликована как патент США №7592429), поданная 25 апреля 2006 года, которая заявляет приоритет относительно предварительной заявки на патент США №60/792645, поданной 17 апреля 2006 года, предварительной заявки на патент США №60/782244, поданной 13 марта 2006 года, предварительной заявки на патент США №60/776847, поданной 24 февраля 2006 года и предварительной заявки на патент США №60/677583, поданной 3 мая 2005 года. Следующие заявки также включены в данное описание посредством ссылки: заявка на патент США №12/212327, поданная 17 сентября 2008 года, которая заявляет приоритет относительно предварительной заявки на патент США №60/973024, поданной 17 сентября 2007 года; и заявка на патент США №12/811171, поданная 29 июня 2010 года, которая представляет собой заявку на национальной фазе США согласно 35 USC § 371 международной патентной заявки №PCT/US08/86864, поданной 15 декабря 2008 года, которая заявляет приоритет относительно предварительной заявки на патент США №61/013917, поданной 14 декабря 2007 года.

Уровень техники

Известно, что периодонтальные инфекции и воспаления десен являются основными причинами периодонтальных заболеваний. И те и другие представляют собой хронические воспалительные заболевания, и по мере их прогрессирования разрушается периодонт и уменьшается альвеолярный отросток из-за резорбции кости, приводящей в некоторых случаях к потере поддержки зубов. Кроме того, альвеолярный отросток может стать дефектным из-за отверстий, вызванных хирургическим лечением или апикальными повреждениями от прогрессирующего кариеса зубов.

Краткое описание изобретения

Изобретение направлено на способы использования ингибитора склеростина для увеличения альвеолярного отростка. В одном аспекте в настоящем документе описан способ лечения потери костной массы альвеолярного отростка у субъекта включающий введение ингибитора склеростина (например, антигена или фрагмента антигена к склеростину) в количестве, эффективном для уменьшения расстояния между цементно-эмалевой границей и гребнем альвеолярного отростка, опционально в дозе от около 5 мг до около 1000 мг в неделю. В одном варианте реализации ингибитор склеростина вводят два раза в неделю в течение всего периода лечения. В другом варианте реализации ингибитор склеростина вводят один раз в неделю в течение всего периода лечения.

Период лечения может составлять по меньшей мере около 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 7 недель, 8 недель, 9 недель, 10 недель, 11 недель, 12 недель, 3 месяца, 13 недель, 14 недель, 15 недель, 16 недель, 4 месяца, 17 недель, 18 недель, 19 недель, 20 недель, 5 месяцев, 21 неделю, 22 недели, 23 недели, 24 недели, 6 месяцев, 25 недель, 26 недель, 27 недель 28 недель, 7 месяцев, 29 недель, 30 недель, 31 неделю или дольше (например, 8 месяцев, 9 месяцев, 10 месяцев, 11 месяцев, 1 год, 15 месяцев, 18 месяцев или дольше). В некоторых вариантах реализации период лечения составляет около 6-12 недель. В некоторых вариантах реализации период лечения составляет 4-12 недель или около 1-3 месяцев. В некоторых вариантах реализации период лечения составляет около 12-20 недель или около 3-5 месяцев. В некоторых вариантах реализации период лечения составляет около 20-32 недель или около 5-8 месяцев. В некоторых вариантах реализации период лечения составляет около 24-36 недель или около 6-9 месяцев. В некоторых вариантах реализации период лечения составляет не более чем около 28 недель. В некоторых вариантах реализации период лечения составляет около 1 год. В некоторых или любых вариантах реализации период лечения составляет не более, чем около 18 месяцев.

В некоторых или любых вариантах реализации через шесть недель после начала лечения расстояние между цементно-эмалевой границей и гребнем альвеолярного отростка уменьшается по меньшей мере на 10% (например по меньшей мере на 10% по меньшей мере на 20% по меньшей мере на 30% по меньшей мере на 40% по меньшей мере на 50% по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70% по

меньшей мере на 80% по меньшей мере на 90% или больше) по сравнению с расстоянием до начала лечения. В некоторых или любых вариантах реализации через шесть недель после начала лечения расстояние между цементно-эмалевой границей и гребнем альвеолярного отростка уменьшается по меньшей мере на 10% (например по меньшей мере на 10% по меньшей мере на 20% по меньшей мере на 30% по меньшей мере на 40% по меньшей мере на 50% по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70% по меньшей мере на 80% по меньшей мере на 90% или больше) по сравнению с контрольным субъектом (т.е. субъектом с запущенным периодонтальным заболеванием, не получавшим лечение ингибитором склеростина). В некоторых вариантах реализации через шесть недель после начала лечения расстояние между цементно-эмалевой границей и гребнем альвеолярного отростка восстанавливается до состояния, предшествовавшего заболеванию.

В некоторых вариантах реализации через шесть недель после начала лечения расстояние между цементно-эмалевой границей и гребнем альвеолярного отростка составляет менее чем или равно около 2 мм (например, около 2 мм, около 1,9 мм, около 1,8 мм, около 1,7 мм, около 1,6 мм, около 1,5 мм, около 1,4 мм, около 1,3 мм, около 1,2 мм, около 1,1 мм или около 1 мм).

В некоторых или любых вариантах реализации высота альвеолярного отростка через шесть недель после начала лечения увеличивается по меньшей мере на 10% (например, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90% или больше) по сравнению с высотой альвеолярного отростка до начала лечения. В некоторых или любых вариантах реализации высота альвеолярного отростка через шесть недель после начала лечения увеличивается по меньшей мере на 10% (например, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90% или больше) по сравнению с контрольным субъектом (т.е. субъектом с запущенным периодонтальным заболеванием, не получавшим лечение ингибитором склеростина). В некоторых вариантах реализации высота альвеолярного отростка через шесть недель после начала лечения восстанавливается до состояния высоты альвеолярного отростка, предшествовавшего заболеванию.

В некоторых или любых вариантах реализации высота альвеолярного отростка через шесть недель после начала лечения увеличивается по меньшей мере на 0,1 мм (например, по меньшей мере около 0,1 мм, около 0,2 мм, около 0,3 мм, около 0,4 мм, около 0,5 мм, около 0,6 мм, около 0,7 мм, около 0,8 мм, около 0,9 мм, около 1 мм, около 1,5 мм, около 2 мм, около 2,5 мм, около 3 мм, около 3,5 мм, около 4 мм, около 4,5 мм, около 5 мм, около 5,5 мм, около 6 мм, около 6,5 мм, около 7 мм, около 7,5 мм, около 8 мм, около 8,5 мм, около 9 мм, около 9,5 или около 10 мм) или больше по сравнению с высотой альвеолярного отростка перед лечением или по сравнению с контрольным субъектом (т.е. субъектом с запущенным периодонтальным заболеванием, не получавшим лечение ингибитором склеростина).

В некоторых или любых вариантах реализации плотность костной ткани альвеолярного отростка через шесть недель после начала лечения увеличивается по меньшей мере на 10% (например, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90% или больше) по сравнению с плотностью костной ткани альвеолярного отростка перед лечением или по сравнению с контрольным субъектом (т.е. субъектом с запущенным периодонтальным заболеванием, не получавшим лечение ингибитором склеростина). В некоторых вариантах реализации плотность костной ткани альвеолярного отростка через шесть недель после начала лечения восстанавливается до состояния, предшествовавшего заболеванию.

В некоторых или любых вариантах реализации доля объема костной ткани альвеолярного отростка (ДОКТ) через шесть недель после начала лечения увеличивается по меньшей мере на 10% (например по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90% или больше) по сравнению с ДОКТ альвеолярного отростка перед лечением или по сравнению с контрольным субъектом (т.е. субъектом с запущенным периодонтальным заболеванием, не получавшим лечение ингибитором склеростина).

В некоторых или любых вариантах реализации способы, описанные в настоящем документе, могут дополнительно включать измерение минеральной плотности костной ткани альвеолярного отростка перед введением ингибитора склеростина (например, антитела или фрагмента антитела к склеростину) для идентификации субъектов, нуждающихся в лечении ингибитором склеростина. Субъектов с показателями плотности костной ткани альвеолярного отростка менее чем около 750 единиц Хаунсфилда (например, около 750 EX, около 700 EX, около 650 EX, около 600 EX, около 550 EX, около 500 EX, около 450 EX, около 400 EX или менее) идентифицируют как субъектов, нуждающихся в лечении антителом или фрагментом антитела к склеростину.

Потеря костной массы альвеолярного отростка для лечения при помощи способов, описанных в настоящем документе, включает, но не ограничиваясь перечисленным, потерю костной массы альвеолярного отростка, связанную с периодонтитом (например, запущенным периодонтальным заболеванием),

выпадением зуба, удалением зуба, ношением зубных протезов, хирургической стоматологией, остеомиелитом, лучевым некрозом кости, пороками развития (например, дефектами при рождении, такими как недостающие участки зубов, костей лицевого скелета или челюсти), дефектами пазух, неправильным относительным расположением или травмой (например, травматическим вывихом зуба или переломом челюсти). В некоторых вариантах реализации субъект, подлежащий лечению, страдает от запущенного периодонтита.

В некоторых вариантах реализации потеря костной массы альвеолярного отростка создается посредством удаления участков кости, содержащих опухоль (например, доброкачественную опухоль). Типичные примеры доброкачественных опухолей костей включают, но не ограничиваясь перечисленным, остеому, остеонидную остеому, остеобластому, остеохондрому, энхондрому, хондромиксоидную фиброму, аневризматическую кисту кости, однокамерную кисту кости, фиброзную дисплазию кости и гигантоклеточную опухоль кости.

В некоторых или любых вариантах реализации ингибитор склеростина (например, антитело или фрагмент антитела к склеростину) вводят в комбинации с использованием материалов, которые поддерживают возобновление роста кости, таких как костный трансплантат, костная мука, костная стружка, деминерализованный костный матрикс, костные каркасы, протез, металлические стабилизаторы или костные каркасные вещества, содержащие один или больше заменителей костного трансплантата на основе полимеров, керамики, цемента и фосфатов кальция. В данной области техники известны многие вариации таких материалов.

В некоторых или любых вариантах реализации способ включает назначение субъекту принятого стандарта оказания медицинской помощи для лечения периодонтального заболевания перед введением ингибитора склеростина (например, антитела или фрагмента антитела к склеростину). Например, в некоторых вариантах реализации принятый стандарт оказания медицинской помощи для лечения периодонтального заболевания представляет собой лекарственное средство, включая, но не ограничиваясь перечисленным, Периостат® и/или химически модифицированный тетрациклин-3 (ХМТ-3). В некоторых вариантах реализации принятый стандарт оказания медицинской помощи включает ирригацию ротовой полости и/или удаление зубного камня и над- и/или под-десневую санацию (например, удаление микробного налета и камней) пораженной области у субъекта. В некоторых вариантах реализации принятый стандарт оказания помощи включает выполнение ирригации ротовой полости и/или удаление зубного камня и санацию пораженной области в комбинации с назначением Периостата и/или ХМТ-3 перед введением ингибитора склеростина. В некоторых вариантах реализации способ включает назначение принятого стандарта оказания медицинской помощи одновременно с введением ингибитора склеростина. В других вариантах реализации принятый стандарт оказания медицинской помощи назначают последовательно. Например, принятый стандарт оказания медицинской помощи может быть назначен за 1 день, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 6 недель, 8 недель, 10 недель, 12 недель или больше перед введением ингибитора склеростина субъекту. В предпочтительных вариантах реализации перед введением ингибитора склеростина прогрессирование периодонтального заболевания у субъекта замедляется, останавливается или получает обратное развитие.

В некоторых или любых вариантах реализации способ дополнительно включает введение антибиотика, такого как антибиотик, выбранный из группы, состоящей из амоксициллина, тетрациклина гидрохлорида, доксициклина, миноциклина, азитромицина, рокситромицина, моксифлоксацина, ципрофлоксацина и метронидазола. В некоторых вариантах реализации способ включает введение субъекту антибиотика перед введением или после введения субъекту ингибитора склеростина. В других вариантах реализации способ включает введение антибиотика субъекту одновременно с введением ингибитора склеростина.

В некоторых или любых вариантах реализации способ дополнительно включает введение второго лекарственного средства для укрепления кости для лечения сниженной минеральной плотности костной ткани или перелома кости. В данной области техники известны многие лекарственные средства этого типа. В некоторых вариантах реализации лекарственное средство для укрепления кости выбирают из группы, состоящей из антирезорбтивного лекарственного средства, костеобразующего средства, модулятора эстрогенового рецептора (включая, но не ограничиваясь перечисленным, ралоксифен, базедоксифен и лазофосифен) и лекарственного средства, обладающего ингибирующим действием на остеокласты. В некоторых вариантах реализации второе средство для укрепления кости выбирают из группы, состоящей из бисфосфоната (включая, но не ограничиваясь перечисленным, алендронат натрия (ФОСАМАКС®), ризедронат, ибандронат натрия (БОНИВА®) и золедроновую кислоту (РЕКЛАСТ®)), эстрогена или аналога эстрогена, источника кальция, Тиболона, кальцитонина, кальцитриола и гормональной заместительной терапии. В некоторых вариантах реализации второе средство для укрепления кости включает, но не ограничиваясь перечисленным, паратиреоидный гормон (ПТГ) или его пептидный фрагмент, ПТГ-связанный белок (ПТГсб), костный морфогенетический белок, остеогенин, NaF, агонист ПГЕ₂, статин, ингибитор или антитело к DKK1, антитело к лиганду RANK (RANKL) (например, ПРОЛИА®) или ингибитор RANKL, ранелат стронция, витамин D, или производное витамина D или его имитатор. В некото-

рых вариантах реализации второе средство для укрепления кости представляет собой Фортео® (терипаратид или аналог рекомбинантного человеческого паратиреоидного гормона (1-34)) или Преотакт® (паратиреоидный гормон). В некоторых или любых вариантах реализации средство для укрепления кости представляет собой Протелос®.

В некоторых вариантах реализации второе средство для укрепления кости вводят одновременно с ингибитором склеростина (например, в течение отрезка времени в рамках периода лечения). В других вариантах реализации второе средство для укрепления кости вводят в течение отрезка времени после окончания периода лечения ингибитором склеростина (т.е. в течение поддерживающего периода). В таких вариантах реализации второе средство для укрепления кости вводят в течение поддерживающего периода, составляющего от около 1 недели до около 5 лет.

Способ может дополнительно включать введение в дальнейшем одного или большего количества ингибиторов склеростина, эффективных для поддержания минеральной плотности костной ткани, опционально в течение поддерживающего периода, составляющего по меньшей мере около 12 недель, 6 месяцев, 1 года, 2 лет, 3 лет, 4 лет, 5 лет или дольше (например, на протяжении всей продолжительности жизни субъекта) после окончания периода лечения.

Планы лечения периодонтального заболевания после завершения активного лечения могут также включать последующую поддерживающую терапию. Виды последующей поддерживающей терапии включают, но не ограничиваются перечисленным механическую санацию, усиление гигиены полости рта (например, регулярные профессиональные чистки, ежедневная чистка зубной щеткой и зубной нитью) и введение антибиотиков.

В любом из вариантов реализации, раскрытых в настоящем документе, ингибитор склеростина представляет собой опционально средство, связывающее склеростин (например, антитело или фрагмент антитела к склеростину). Конкретно предусматривается применение средства, связывающего склеростин, раскрытого в публикации патента США №2007/0110747 в любом из раскрытых в настоящем документе способов или для приготовления лекарственных средств для введения согласно любому из раскрытых в настоящем документе способов. Одну или больше доз ингибитора склеростина вводят в количестве и в течение времени, эффективных для лечения потери костной массы альвеолярного отростка. В различных вариантах реализации субъекту (например, субъекту, являющемуся человеком) вводят одну или больше доз, содержащих от около 50 миллиграммов до около 1000 миллиграммов ингибитора склеростина в неделю. Например, доза ингибитора склеростина (например, антитела или фрагмента антитела к склеростину) может содержать по меньшей мере около 5 мг, 15 мг, 25 мг, 50 мг, около 60 мг, около 70 мг, около 80 мг, около 90 мг, около 100 мг, около 120 мг, около 150 мг, около 200 мг, около 240 мг, около 250 мг, около 280 мг, около 300 мг, около 350 мг, около 400 мг, около 420 мг, около 450 мг, около 500 мг, около 550 мг, около 600 мг, около 650 мг, около 700 мг, около 750 мг, около 800 мг, около 850 мг, около 900 мг, около 950 мг или вплоть до около 1000 мг ингибитора склеростина. Также предусматриваются диапазоны между любыми и всеми из указанных конечных точек, например, от около 50 мг до около 80 мг, от около 70 мг до около 140 мг, от около 75 мг до около 100 мг, от около 100 мг до около 150 мг, от около 140 мг до около 210 мг, или от около 150 мг до около 200 мг, или от около 280 до около 410 мг. Дозу вводят через любой интервал, например, несколько раз в неделю (например, два или три раза в неделю), один раз в неделю, один раз каждые две недели, один раз каждые три недели или один раз каждые четыре недели. В некоторых или любых вариантах реализации дозу ингибитора склеростина (например, антитела или фрагмента антитела к склеростину) в диапазоне от около 120 мг до около 210 мг вводят два раза в неделю. В некоторых или любых вариантах реализации дозу, составляющую около 140 мг ингибитора склеростина (например, антитела или фрагмента антитела к склеростину) вводят два раза в неделю.

В некоторых вариантах реализации одна или больше доз ингибитора склеростина может содержать от около 0,1 до около 50 мг (например, в диапазоне от около 5 до около 50 мг), или от около 1 до около 100 мг ингибитора склеростина на килограмм массы тела (мг/кг). Например, доза ингибитора склеростина (например, антитела или фрагмента антитела к склеростину) может содержать по меньшей мере около 0,1 мг/кг, 0,5 мг/кг, 1 мг/кг, около 2 мг/кг, около 3 мг/кг, около 4 мг/кг, около 5 мг/кг, около 6 мг/кг, около 7 мг/кг, около 8 мг/кг, около 9 мг/кг, около 10 мг/кг, около 20 мг/кг, около 25 мг/кг, около 26 мг/кг, около 27 мг/кг, около 28 мг/кг, около 29 мг/кг, около 30 мг/кг, около 31 мг/кг, около 32 мг/кг, около 33 мг/кг, около 34 мг/кг, около 35 мг/кг, около 36 мг/кг, около 37 мг/кг, около 38 мг/кг, около 39 мг/кг, около 40 мг/кг, около 41 мг/кг, около 42 мг/кг, около 43 мг/кг, около 44 мг/кг, около 45 мг/кг, около 46 мг/кг, около 47 мг/кг, около 48 мг/кг, или около 49 мг/кг, или около 50 мг/кг, около 55 мг/кг, около 60 мг/кг, около 65 мг/кг, около 70 мг/кг, около 75 мг/кг, около 80 мг/кг, около 85 мг/кг, около 90 мг/кг, около 95 мг/кг или вплоть до около 100 мг/кг. Также предусматриваются диапазоны между любыми и всеми из указанных конечных точек, например, от около 1 мг/кг до около 3 мг/кг, от около 1 мг/кг до около 5 мг/кг, от около 1 мг/кг до около 10 мг/кг, от около 1 мг/кг до около 20 мг/кг, от около 1 мг/кг до около 40 мг/кг, от около 5 мг/кг до около 30 мг/кг или от около 5 мг/кг до около 20 мг/кг.

Также в настоящем документе описано применение эффективного количества ингибитора склеростина для лечения потери костной массы альвеолярного отростка у субъекта, например, в любом из опи-

санных выше количеств, как, например, от около 50 мг до около 1000 мг в неделю, при этом одно или больше введений средства, связывающего склеростин, осуществляют в течение всего периода лечения имеющего продолжительность по меньшей мере 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 7 недель, 8 недель, 9 недель, 10 недель, 11 недель, 12 недель, 3 месяца, 13 недель, 14 недель, 15 недель, 16 недель, 4 месяца, 17 недель, 18 недель, 19 недель, 20 недель, 5 месяцев, 21 неделю, 22 недели, 23 недели, 24 недели, 6 месяцев, 25 недель, 26 недель, 27 недель, 28 недель, 7 месяцев, 29 недель, 30 недель, 31 неделю или дольше (например, 8 месяцев, 9 месяцев, 10 месяцев, 11 месяцев, 1 год, 15 месяцев, 18 месяцев или дольше).

В некоторых или любых вариантах реализации ингибитор склеростина вводят подкожно. В других вариантах реализации ингибитор склеростина вводят локально в челюсть субъекта. В некоторых или любых вариантах реализации ингибитор склеростина вводят локально в пораженную область десны субъекта. В некоторых или любых вариантах реализации ингибитор склеростина вводят в периодонтальный карман субъекта.

Ингибитор склеростина (например, антитело или фрагмент антитела к склеростину) также может быть использован в приготовлении лекарственного средства для введения субъекту с потерей костной массы альвеолярного отростка с использованием любой из описанных в настоящем документе схем дозирования и/или распределения по срокам. Таким образом, настоящее изобретение также предусматривает применение ингибитора склеростина согласно любой из описанных в настоящем документе схем дозирования и/или распределения по срокам. Опционально, ингибитор склеростина находится в контейнере, таком как флакон или шприц с однократной дозой или многократными дозами. Настоящее изобретение включает контейнер, содержащий антитело к склеростину или его фрагмент и инструкции по введению антитела или его фрагмента для лечения потери костной массы альвеолярного отростка по любой из описанных в настоящем документе схем дозирования и/или распределения по срокам.

В различных вариантах реализации ингибитор склеростина представляет собой средство, связывающее склеростин, например, антитело или фрагмент антитела к склеростину. Опционально, антитело или фрагмент антитела к склеростину перекрестно блокирует связывание по меньшей мере одного из антител Ab-A, Ab-B, Ab-C, Ab-D, Ab-1, Ab-2, Ab-3, Ab-4, Ab-5, Ab-6, Ab-7, Ab-8, Ab-9, Ab-10, Ab-11, Ab-12, Ab-13, Ab-14, Ab-15, Ab-16, Ab-17, Ab-18, Ab-19, Ab-20, Ab-21, Ab-22, Ab-23 и Ab-24 со склеростинном и/или перекрестно блокируется от связывания со склеростинном по меньшей мере одним из антител Ab-A, Ab-B, Ab-C, Ab-D, Ab-1, Ab-2, Ab-3, Ab-4, Ab-5, Ab-6, Ab-7, Ab-8, Ab-9, Ab-10, Ab-11, Ab-12, Ab-13, Ab-14, Ab-15, Ab-16, Ab-17, Ab-18, Ab-19, Ab-20, Ab-21, Ab-22, Ab-23 и Ab-24.

В некоторых вариантах реализации антитело к склеростину содержит CDR-H1 SEQ ID NO:245, CDR-H2 SEQ ID NO:246, CDR-H3 SEQ ID NO:247, CDR-L1 SEQ ID NO:78, CDR-L2 SEQ ID NO:79 и CDR-L3 SEQ ID NO:80.

В одном варианте реализации антитело к склеростину содержит тяжелые цепи, содержащие SEQ ID NO: 378 и легкие цепи, содержащие SEQ ID NO: 376. В другом варианте реализации антитело к склеростину имеет тяжелые цепи SEQ ID NO: 145 или SEQ ID NO: 392 и легкие цепи SEQ ID NO: 141.

В другом варианте реализации антитело к склеростину содержит CDR SEQ ID NO: 20-25 из международной патентной публикации №. WO 2008/115732 (SEQ ID NO: 416-421), CDR SEQ ID NO: 26-31 из международной патентной публикации №. WO 2008/115732 (SEQ ID NO: 422-427), CDR SEQ ID NO: 32-37 из международной патентной публикации №. WO 2008/115732 (SEQ ID NO: 428-433) или CDR SEQ ID NO: 4, 15, 26, 37, 48 и 59 из международной патентной публикации №. WO 2009/047356 (SEQ ID NO: 443, 454, 465, 476, 487 и 498, соответственно). В еще одном варианте реализации антитело к склеростину содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере одну из SEQ ID NO: 135-143, 153-161 или 171-179 из международной патентной публикации №. WO 2010/130830 (SEQ ID NO: 745-753, 763-771, 781-789, соответственно).

Также предусматриваются зубные имплантаты, матриксы, гели и перевязочные материалы, содержащие антитело к склеростину (или фрагмент антитела) описанное в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации зубные имплантаты, матриксы, гели и перевязочные материалы покрыты антителом к склеростину (или фрагментом антитела). В других вариантах реализации антитело к склеростину (или фрагмент антитела) введен в состав с носителем, описанным в настоящем документе, и применяется на целевую область (т.е. на пораженную область десны или пораженный периодонтальный карман субъекта), опционально перед (или после) применения зубного имплантата, матриксов или перевязочного материала. Антитело к склеростину (или фрагмент антитела) может применяться в соответствии с любым способом, известным в данной области техники. В некоторых вариантах реализации антитело к склеростину (или фрагмент антитела) вводят в целевую область при помощи подкожной инъекции перед применением зубного имплантата, матрикса или перевязочного материала. В других вариантах реализации антитело к склеростину (или фрагмент антитела) вводят на пораженную область при помощи щетки или покрывая пораженную область иным способом перед применением зубного имплантата, матрикса или перевязочного материала.

Кроме того, конкретно предусматривается применение антитела к склеростину (или фрагмента антитела) в любом из раскрытых в настоящем документе способов или для приготовления лекарственных

средств для введения согласно любому из раскрытых в настоящем документе способов. В связи с этим настоящее изобретение включает антитело к склеростину для применения в способе лечения потери костной массы альвеолярного отростка у субъекта, при этом способ включает введение антитела к склеростину (или фрагмента антитела) в количестве, эффективном для уменьшения расстояния между цементно-эмалевой границей и гребнем альвеолярного отростка, опционально в дозе от около 5 мг до около 1000 мг в неделю.

Настоящее изобретение также включает использование антитела к склеростину (или фрагмента антитела) в приготовлении лекарственного средства для лечения потери костной массы альвеолярного отростка у субъекта в количестве, эффективном для уменьшения расстояния между цементно-эмалевой границей и гребнем альвеолярного отростка, при этом количество антитела к склеростину (или фрагмента антитела) составляет опционально дозу от около 5 мг до около 1000 мг в неделю.

Вышеприведенное краткое изложение не предназначено для того, чтобы определять каждый аспект настоящего изобретения, и дополнительные аспекты описаны в других разделах, таких как "Подробное описание". Весь документ планировался быть связанным как единое раскрытие, и следует понимать, что предусмотрены все комбинации признаков, описанных в настоящем документе, даже если эта комбинация признаков не находится вместе в одном предложении или параграфе или разделе настоящего документа. Что касается аспектов настоящего изобретения, описанных или заявленных с использованием единственного числа, следует понимать, что эти термины означают "один или больше", если контекст однозначно не требует более узкого смысла. Термин "или" следует понимать как охватывающий элементы в качестве альтернативы или вместе, если контекст однозначно не требует иного. Если аспекты настоящего изобретения описываются как "содержащие" характеристику, то рассматриваются также варианты реализации "состоящие из" или "состоящие по существу из" этой характеристики.

Краткое описание фигур

На фиг. 1 представлена таблица, в которой приведен список аминокислотных последовательностей и идентификаторы последовательностей для аминокислотных последовательностей различных антител к склеростину, описанных в настоящем документе. Идентификаторы последовательностей относятся к аминокислотным последовательностям, предусмотренным в перечне последовательностей, представленных здесь же. Аминокислотные последовательности также изложены в публикации патента США №2 007/0110747 или в международных патентных публикациях под номерами. WO 2008/115732, WO 2009/047356 или WO 2010/130830, включенных в настоящий документ посредством ссылки.

На фиг. 2А и 2В представлены графики, отображающие влияние системного введения антитела к склеростину (измеряется в конечных точках исследования на 2 неделе и 4 неделе) на долю объема костной ткани (фиг. 2А) и минеральную плотность костной ткани (фиг. 2В) при экспериментальном периодонтите.

На фиг. 3А и 3В представлены графики, отображающие влияние системного введения антитела к склеростину (измеряется в конечных точках исследования на 4, 7 и 10 неделе) на долю объема костной ткани (фиг. 3А) и минеральную плотность костной ткани (фиг. 3В) после индуцирования экспериментального периодонтита.

На фиг. 4А-4С представлены графики, отображающие влияние введения антитела к склеростину на расстояние между цементно-эмалевой границей и гребнем альвеолярного отростка (фиг. 4А) и измерения конкретного участка второго моляра верхней челюсти через 7 недель (фиг. 4В) и 10 недель (фиг. 4С) после индуцирования экспериментального периодонтита.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение основывается, по меньшей мере, частично, на открытии, что ингибиторы склеростина могут лечить потерю костной массы альвеолярного отростка, связанную, например, с периодонтальным заболеванием. В связи с этим настоящее изобретение предоставляет способ лечения потери костной массы альвеолярного отростка. Способ включает введение субъекту (например, млекопитающему, такому как человек) одну или больше доз ингибитора склеростина, такого как средство, связывающее склеростин (например, антитело или фрагмент антитела к склеростину) в течение периода лечения в количестве, эффективном для уменьшения расстояния между цементно-эмалевой границей и гребнем альвеолярного отростка. Материалы и способы настоящего изобретения превосходят существующие виды лечения, терапевтическая эффективность которых основывается на инвазивных хирургических способах (например, костных трансплантатах), для восстановления альвеолярного отростка субъекта до состояний перед болезнью (например, высоты и/или плотности и/или трехмерной костной массы).

Потеря костной массы альвеолярного отростка для лечения при помощи способов, описанных в настоящем документе, включает, но не ограничиваясь перечисленным, потерю костной массы альвеолярного отростка, связанную с периодонтитом, выпадением зуба, удалением зуба, ношением зубных протезов, хирургической стоматологией, остеомиелитом, лучевым некрозом кости, пороками развития (например, дефектами при рождении, такими как недостающие участки зубов, костей лицевого скелета или челюсти), дефектами пазух, неправильным относительным расположением или травмой (например, травматическим вывихом зуба или переломом челюсти). В некоторых вариантах реализации субъект, подлежащий лечению, страдает от запущенного периодонтита.

Используемый в настоящем документе термин "периодонтальное заболевание" предназначается для того, чтобы охватить спектр клинических состояний. Клинический диагноз периодонтального заболевания основывается на визуальной и рентгенологической оценке периодонта и на измерениях расстояния между зубом и десной. У людей эти расстояния в норме составляют 1-3 мм в глубину, и становятся глубже по мере того, как теряется поддерживающая соединительная ткань и кость. Во время комплексного клинического обследования измеряют глубину карманов и поддержку ткани в разных местах (например, 4-6 мест) вокруг каждого зуба и регистрируют количество зубного налета, зубной камень, кровотечение и экссудаты из десен. Для оценки степени костной поддержки зубов обычно используются стоматологические рентгенограммы.

Тяжесть периодонтального заболевания обычно основывается на клинической потере прикрепления (КПП), измеренной от цементно-эмалевой границы или края коронки, и может считаться легкой (1-2 мм), средней (3-4 мм) или тяжелой (≥ 5 мм). Термин "клиническая потеря прикрепления" (КПП) относится к расстоянию, измеренному в миллиметрах, от цементно-эмалевой границы (т.е. края коронки) до апикального края десны. Периодонтальное заболевание также может быть охарактеризовано глубиной зондирования кармана, при этом легкая степень заболевания характеризуется глубиной зондирования периодонтального кармана, составляющей около от 4 до 5 мм, средняя степень заболевания характеризуется глубиной зондирования кармана, составляющей около от 6 до 7 мм, и тяжелая степень заболевания характеризуется глубиной зондирования кармана, составляющей около ≥ 8 мм. Термин "глубина зондирования периодонтального кармана" (ГЗПК) относится к расстоянию, измеренному в миллиметрах, от цементно-эмалевой границы (т.е. края коронки) до гребня альвеолярного отростка. Как измерения ГЗПК, так и КПП выполняют с помощью периодонтального зонда в различных участках вокруг каждого зуба, например, медиально-щечных или среднещечных участках. Они обеспечивают определение тяжести периодонтального заболевания. В качестве альтернативы, как ГЗПК, так и КПП могут быть получены из стандартной цифровой рентгенографии с некоторыми анатомическими ориентирами.

Периодонтальное заболевание включает, но не ограничиваясь перечисленным, индуцированные зубным налетом и не индуцированные зубным налетом заболевания десен; хронический периодонтит (классифицируется как легкий (1-2 мм КПП), средний (3-4 мм КПП) или тяжелый (≥ 5 мм) с генерализованным или локализованным вовлечением; агрессивный периодонтит (классифицируется как (1-2 мм КПП), средний (3-4 мм КПП) или тяжелый (≥ 5 мм) с генерализованным или локализованным вовлечением); периодонтит как проявление системных заболеваний, связанных с гематологическими расстройствами и генетическими расстройствами; некротические периодонтальные заболевания, включая некротический язвенный гингивит и некротический язвенный периодонтит; абсцессы периодонта, включая десневые, периодонтальные и окружающие коронки зубов абсцессы; периодонтит, связанный с эндодонтическими поражениями; и связанные с развитием или приобретенные пороки и состояния, например, связанные с зубами локализованные факторы, которые определяют или предрасполагают к индуцированным зубным налетом заболеваниям десен или периодонтиту, мукогингивальные пороки развития и состояния вокруг зубов и состояния на альвеолярных отростках с отсутствием зубов и травматической окклюзией. Все из этих состояний могут быть локализованными на одном или нескольких конкретных зубах или могут быть более генерализованными (т.е. вовлечены $>30\%$ участков).

Используемый в настоящем документе термин "запущенное периодонтальное заболевание" относится к субъекту, имеющему КПП ≥ 5 мм или периодонтальную ГЗПК ≥ 8 мм. Рецессия десны, смещение зубов, подвижность и нагноение являются признаками, которые часто связаны с запущенным периодонтальным заболеванием из-за прогрессирующего разрушения альвеолярного отростка.

В некоторых вариантах реализации потеря альвеолярной массы альвеолярного отростка создается посредством удаления участков кости, содержащих доброкачественную опухоль. Типичные примеры доброкачественных опухолей костей включают, но не ограничиваясь перечисленным, остеому, остеоидную остеому, остеобластому, остеохондрому, энхондрому, хондромиксоидную фиброму, аневризматическую кисту кости, однокамерную кисту кости, фиброзную дисплазию кости и гигантоклеточную опухоль кости.

Введение ингибитора склеростина увеличивает один или больше параметров альвеолярного отростка (например, один или больше из высоты альвеолярного отростка, массы альвеолярного отростка, плотности костной ткани альвеолярного отростка, объема альвеолярного отростка, содержания минералов в альвеолярном отростке и улучшения стабильности зубов). В связи с этим "лечение" потери костной массы альвеолярного отростка включает, например, любое увеличение высоты альвеолярного отростка, массы альвеолярного отростка и плотности костной ткани альвеолярного отростка, а также ускорение восстановления альвеолярного отростка. Подобным образом "лечение" потери костной массы альвеолярного отростка включает опосредование уровня восстановления альвеолярного отростка сверх (т.е. более чем) уровня восстановления альвеолярного отростка, испытываемого субъектами (например, млекопитающими, такими как люди), которым не вводят ингибитор склеростина (т.е. контрольными субъектами). О восстановлении альвеолярного отростка свидетельствуют, например, увеличенная высота альвеолярного отростка, увеличенный объем альвеолярного отростка, увеличенная плотность и содержание минералов в

альвеолярном отростке, увеличенная стабильность зубов или улучшенное использование пациентом пораженной области по сравнению с такими параметрами до лечения. Увеличение любого одного или больше из параметров альвеолярного отростка может представлять собой возвращение, полностью или частично, измеренного параметра к, например, (а) исходному уровню (например, к уровню до начала болезни), (б) значениям, приведенным в нормативных базах данных или клинических стандартах, используемых в данной области техники или (в) контралатеральному функциональному уровню (например, возвращение, полностью или частично, к функциональным возможностям, например, непораженного альвеолярного отростка у субъекта). В некоторых случаях это увеличение может представлять собой улучшение сверх исходного уровня. При желании, для дополнительного анализа эффективности способов, описанных в настоящем документе, измеренные параметры у субъектов, которым вводили одну или больше доз ингибитора склеростина можно сравнить с теми же параметрами у других субъектов с наличием потери костной массы альвеолярного отростка (опционально с соответствием возраста и пола), которым не вводили ингибитор склеростина.

Параметры альвеолярного отростка (например, высота альвеолярного отростка, масса альвеолярного отростка и/или плотность костной массы альвеолярного отростка) могут быть определены при помощи рентгенографии (например, рентгенографической абсорбциометрии), одно- и/или двухэнергетической рентгеновской абсорбциометрии, количественной компьютерной томографии (ККТ), ультразвуковой эхографии, рентгенографии (например, рентгенографической абсорбциометрии) и магнитно-резонансной визуализации. В некоторых вариантах реализации степень потери костной массы альвеолярного отростка определяют и/или квантифицируют посредством измерения глубины зондирования периодонтального кармана.

В некоторых вариантах реализации ингибитор склеростина (например, антитело или фрагмент антитела к склеростину) вводят в дозе и в течение периода времени, эффективных для уменьшения расстояния между цементно-эмалевой границей и гребнем альвеолярного отростка через шесть недель после начала лечения по меньшей мере на 10% (например по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90% или больше) по сравнению с расстоянием до начала лечения или с контрольным субъектом (т.е. субъектом с аналогичным состоянием заболевания, который не получал лечение ингибитором склеростина). В некоторых вариантах реализации через шесть недель после начала лечения расстояние между цементно-эмалевой границей и гребнем альвеолярного отростка восстанавливается до состояния, предшествовавшего заболеванию. В некоторых вариантах реализации через шесть недель после начала лечения расстояние между цементно-эмалевой границей и гребнем альвеолярного отростка составляет менее чем или равняется около 2 мм (например, около 2 мм, около 1,9 мм, около 1,8 мм, около 1,7 мм, около 1,6 мм, около 1,5 мм, около 1,4 мм, около 1,3 мм, около 1,2 мм, около 1,1 мм или около 1 мм). В некоторых или любых вариантах реализации через шесть недель после начала лечения расстояние между цементно-эмалевой границей и гребнем альвеолярного отростка сравнимо с расстоянием в непораженной области полости рта у субъекта (например, соседний или контралатеральный зуб).

В некоторых вариантах реализации ингибитор склеростина (например, антитело или фрагмент антитела к склеростину) вводят в дозе и в течение периода времени, эффективных для увеличения высоты альвеолярного отростка через шесть недель после начала лечения по меньшей мере на 10% (например по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90% или больше) по сравнению с высотой альвеолярного отростка до начала лечения или с контрольным субъектом (т.е. субъектом с запущенным периодонтальным заболеванием, не получавшим лечение ингибитором склеростина). В некоторых вариантах реализации через шесть недель после начала лечения высота альвеолярного отростка восстанавливается до состояния высоты альвеолярного отростка, предшествовавшего заболеванию. В некоторых вариантах реализации через шесть недель после начала лечения высота альвеолярного отростка увеличивается по меньшей мере на 0,1 мм (например, по меньшей мере около 0,1 мм, около 0,2 мм, около 0,3 мм, около 0,4 мм, около 0,5 мм, около 0,6 мм, около 0,7 мм, около 0,8 мм, около 0,9 мм, около 1 мм, около 1,5 мм, около 2 мм, около 2,5 мм, около 3 мм, около 3,5 мм, около 4 мм, около 4,5 мм, около 5 мм, около 5,5 мм, около 6 мм, около 6,5 мм, около 7 мм, около 7,5 мм, около 8 мм, около 8,5 мм, около 9 мм, около 9,5 мм, около 10 мм) или больше по сравнению с высотой альвеолярного отростка перед лечением. В некоторых или любых вариантах реализации через шесть недель после начала лечения высота альвеолярного отростка сравнима с расстоянием в непораженной области полости рта у субъекта (например, соседний или контралатеральный зуб).

В некоторых вариантах реализации ингибитор склеростина (например, антитело или фрагмент антитела к склеростину) вводят в дозе и в течение периода времени, эффективных для увеличения плотности костной ткани альвеолярного отростка через шесть недель после начала лечения по меньшей мере на 10% (например, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90% или больше) по сравнению с плотностью костной ткани

альвеолярного отростка перед лечением или с контрольным субъектом (т.е. субъектом с запущенным периодонтальным заболеванием, не получавшим лечение ингибитором склеростина). В некоторых вариантах реализации через шесть недель после начала лечения плотность костной ткани альвеолярного отростка восстанавливается до состояния плотности костной ткани альвеолярного отростка, предшествовавшего заболеванию (например, сопоставима с непораженной областью десны полости рта субъекта). У людей минеральная плотность костной ткани часто определяется клинически с использованием двух-энергетической рентгеновской абсорбциометрии (ДРА). Другие способы включают количественную компьютерную томографию (ККТ), ультразвуковую эхографию, одноэнергетическую рентгеновскую абсорбциометрию (ОРА), магнитно-резонансную визуализацию, рентгенографию и рентгенографическую абсорбциометрию.

Американская медицинская ассоциация отмечает, что за исключением ультразвуковой эхографии, способы МПКТ обычно связаны с использованием рентгеновских лучей и основаны на том принципе, что ослабление излучения зависит от толщины и состава тканей на пути излучения. Часто способы включают сравнение результатов с нормативной базой данных.

Еще один параметр, пригодный для оценки успешности лечения ингибитором склеростина, представляет собой долю объема костной ткани альвеолярного отростка (ДОКТ). Используемый в настоящем документе термин "доля объема костной ткани" относится к объему минерализованной костной ткани в единице объема образца кости (ОКТ/ГО, %) и может быть измерена, например, при помощи микрокомпьютерной томографии (микро-КТ). В некоторых или любых вариантах реализации через шесть недель после начала лечения ДОКТ альвеолярного отростка увеличивается по меньшей мере на 10% (например, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90% или больше) по сравнению с ДОКТ альвеолярного отростка перед лечением или по сравнению с контрольным субъектом (т.е. субъектом с запущенным периодонтальным заболеванием, не получавшим лечение ингибитором склеростина). В некоторых или любых вариантах реализации через шесть недель после начала лечения ДОКТ альвеолярного отростка сравнима с ДОКТ альвеолярного отростка в непораженной области полости рта у субъекта (например, соседний или контралатеральный зуб).

Увеличение любого одного или больше из таких показателей, как высота альвеолярного отростка, масса альвеолярного отростка, плотность костной ткани альвеолярного отростка и доля объема костной ткани альвеолярного отростка и/или уменьшение расстояния между цементно-эмалевой границей и гребнем альвеолярного отростка (или улучшение любого другого параметра альвеолярного отростка) может быть определено через 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 7 недель, 8 недель, 9 недель, 10 недель или больше после первоначального введения ингибитора склеростина. В качестве альтернативы, увеличение любого одного или больше из таких показателей, как высота альвеолярного отростка, масса альвеолярного отростка, доля объема костной ткани альвеолярного отростка и плотность костной ткани альвеолярного отростка (и/или уменьшения расстояния между цементно-эмалевой границей и гребнем альвеолярного отростка) может быть определено после окончания периода лечения (например, через 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 7 недель, 8 недель, 9 недель, 10 недель, 11 недель, 12 недель, 13 недель, 14 недель, 15 недель, 16 недель, 5 месяцев, 6 месяцев, 7 месяцев, 8, месяцев, 9 месяцев, 10 месяцев, 11 месяцев или 1 год после окончания периода лечения). В одном аспекте способ уменьшает количество времени, необходимого для установления желаемого уровня высоты альвеолярного отростка, массы альвеолярного отростка, плотности костной ткани альвеолярного отростка и/или доли объема костной ткани альвеолярного отростка и/или уменьшения расстояния между цементно-эмалевой границей и гребнем альвеолярного отростка, например, любое процентное увеличение высоты альвеолярного отростка, массы альвеолярного отростка или плотности костной ткани альвеолярного отростка и/или доли объема костной ткани альвеолярного отростка, и/или расстояния между цементно-эмалевой границей и гребнем альвеолярного отростка, описанные в настоящем документе, по сравнению с пациентами с соответствием по возрасту и полу, которые не получают ингибитор склеростина, тем самым уменьшая период времени восстановления для субъекта. Например, в одном варианте реализации ингибитор склеростина уменьшает количество времени, необходимого для увеличения высоты альвеолярного отростка, массы альвеолярного отростка, плотности костной ткани альвеолярного отростка и/или доли объема костной ткани альвеолярного отростка и/или уменьшения расстояния между цементно-эмалевой границей и гребнем альвеолярного отростка по меньшей мере около на 10% (например, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 25%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 35%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 45% или по меньшей мере около 50%) по сравнению с субъектом, не получающим ингибитор склеростина.

Функционал, параметры качества жизни, свидетельствующие об улучшении альвеолярного отростка, включают, но не ограничиваются перечисленным, сниженный риск выпадения зубов; снижение кровоточивости десен, уменьшение глубины периодонтального кармана, повышенный уровень прикрепления десневой ткани, уменьшение произношения; улучшение чувства вкуса; повышение способности есть определенные продукты; снижение напряжения; улучшение питания и снижение раздражительности.

Введение одной или больше доз ингибитора склеростина, как описано в настоящем документе, ускоряет статистически значимым образом улучшение функционала, параметров качества жизни, связанных с потерей костной массы альвеолярного отростка в исследованной популяции пациентов.

В некоторых вариантах реализации одну или больше доз ингибитора склеростина, такого как средства, связывающего склеростин (например, антитело или фрагмент антитела к склеростину) вводят человеку на протяжении периода лечения, составляющего 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 31 неделю, 8 месяцев, 9 месяцев, 10 месяцев, 11 месяцев, 1 год, 18 месяцев или дольше. "Период лечения" начинается с момента введения первой дозы ингибитора склеростина (например, антитела или фрагмента антитела к склеростину) и заканчивается после введения конечной дозы ингибитора склеростина.

Предусматривается любое количество введений ингибитора склеростина в течение периода лечения. Например, на протяжении периода лечения субъекту обеспечивают 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 доз или введений ингибитора склеростина. В одном варианте реализации период лечения включает по меньшей мере 6 недель. В некоторых вариантах реализации период лечения продолжается по меньшей мере 28 недель. В других вариантах реализации период лечения продолжается по меньшей мере 1 год. В качестве альтернативы или дополнительно, период лечения продолжается не более 18 месяцев. В действительности, одно или больше введений фармацевтической композиции, содержащей ингибитор склеростина, может быть осуществлено в течение периода лечения или терапии, длящегося не более чем 18 месяцев, менее 1 года, не более чем 8 месяцев, не более чем 28 недель или не более чем 20 недель. В одном варианте реализации период лечения составляет около 28 недель и дает значительное улучшение параметров альвеолярного отростка, таких как (но не ограничиваясь перечисленным) высота альвеолярного отростка, масса альвеолярного отростка, доля объема костной ткани альвеолярного отростка и плотность костной ткани альвеолярного отростка по сравнению с непролеченными субъектами с потерей костной массы альвеолярного отростка.

Средство, связывающее склеростин (например, антитело или фрагмент антитела к склеростину) вводят в количестве, которое активизирует, усиливает или ускоряет восстановление альвеолярного отростка. В любом варианте реализации ингибитор склеростина может быть введен субъекту (например, субъекту, являющемуся человеком) в количестве от около 5 мг до около 1000 мг ингибитора склеростина в неделю. Например, количество ингибитора склеростина (например, антитела или фрагмента антитела к склеростину) может включать по меньшей мере около 5 мг, 15 мг, 25 мг, 50 мг, около 60 мг, около 70 мг, около 80 мг, около 90 мг, около 100 мг, около 120 мг, около 140 мг, около 150 мг, около 170 мг, около 180 мг, около 200 мг, около 210 мг, около 240 мг, около 250 мг, около 270 мг, около 280 мг, около 300 мг, около 350 мг, около 400 мг, около 420 мг, около 450 мг, около 500 мг, около 550 мг, около 600 мг, около 650 мг, около 700 мг, около 750 мг, около 800 мг, около 850 мг, около 900 мг, около 950 мг или вплоть до около 1000 мг ингибитора склеростина. Также предусматриваются диапазоны между любыми и всеми из указанных конечных точек, например от около 50 мг до около 80 мг, от около 70 мг до около 140 мг, от около 70 мг до около 210 мг, от около 75 мг до около 100 мг, от около 100 мг до около 150 мг, от около 120 мг до около 270 мг, от около 140 мг до около 210 мг или от около 150 мг до около 200 мг, или от около 280 до около 410 мг. Дозу вводят в любом интервале времени, например, несколько раз в неделю (например, два или три раза в неделю), один раз в неделю, один раз каждые две недели, один раз каждые три недели или один раз каждые четыре недели. В некоторых или любых вариантах реализации дозу ингибитора склеростина (например, антитела или фрагмента антитела к склеростину) в диапазоне от около 120 мг до около 210 мг вводят два раза в неделю. В некоторых или любых вариантах реализации дозу, составляющую около 140 мг ингибитора склеростина (например, антитела или фрагмента антитела к склеростину), вводят два раза в неделю. В некоторых или любых вариантах реализации период лечения составляет 12 недель, а склеростин вводят на 2 неделе, 6 неделе и 12 неделе периода лечения, опционально в дозе, составляющей около 140 мг. Любую из доз, описанных в настоящем документе можно вводить в виде отдельных доз. Например, дозу, составляющую 140 мг ингибитора склеростина можно вводить в виде двух инъекций ингибитора склеростина по 70 мг или в виде семи инъекций ингибитора склеростина по 20 мг во время посещения стоматолога.

В некоторых вариантах реализации доза средства, связывающего склеростин, которую вводят субъекту (например, млекопитающему, такому как человек) может находиться в диапазоне от около 0,1 мг/кг до около 100 мг/кг или от около 10 мг/кг до около 50 мг/кг массы тела. Например, доза ингибитора склеростина (например, средства, связывающего склеростин) может находиться в диапазоне от около 0,1 мг/кг, около 0,5 мг/кг, около 1 мг/кг, около 2 мг/кг, около 3 мг/кг, около 4 мг/кг, около 5 мг/кг, около 6 мг/кг, около 7 мг/кг, около 8 мг/кг, около 9 мг/кг, около 10 мг/кг, около 20 мг/кг, около 25 мг/кг, около 26 мг/кг, около 27 мг/кг, около 28 мг/кг, около 29 мг/кг, около 30 мг/кг, около 31 мг/кг, около 32 мг/кг, около 33 мг/кг, около 34 мг/кг, около 35 мг/кг, около 36 мг/кг, около 37 мг/кг, около 38 мг/кг, около 39 мг/кг, около 40 мг/кг, около 41 мг/кг, около 42 мг/кг, около 43 мг/кг, около 44 мг/кг, около 45 мг/кг, около 46 мг/кг, около 47 мг/кг, около 48 мг/кг, около 49 мг/кг, или около 50 мг/кг, около 55 мг/кг, около 60 мг/кг, около 65 мг/кг, около 70 мг/кг, около 75 мг/кг, около 80 мг/кг, около 85 мг/кг, около 90 мг/кг, или около 95 мг/кг вплоть до около 100 мг/кг массы тела.

Кроме того, может быть благоприятным вводить многократные дозы средства, связывающего склеростин, или растягивать введение доз во времени, в зависимости от схемы лечения, выбранной для конкретного пациента. Например, доза ингибитора склеростина может быть назначена один раз каждые четыре недели, один раз каждые три недели, один раз каждые две недели, один раз в неделю, или несколько раз в неделю (например, два раза в неделю, три раза в неделю, четыре раза в неделю или больше), в зависимости от тяжести состояния заболевания, возраста и состояния физического здоровья пациента и т.п.

В некоторых вариантах реализации субъект опционально страдает от расстройства, связанного с костями, выбранного из группы, состоящей из запущенного периодонтального заболевания, ахондроплазии, потери костной массы в постменопаузальном периоде, потери костной массы ротовой полости, остеонекроза челюсти и потери костной массы челюсти, связанной со старением. Опционально, субъект подвергается челюстно-лицевому хирургическому вмешательству или хирургическому вмешательству в полости рта или перенес его.

В некоторых вариантах реализации субъект опционально страдает от вторичного состояния, выбранного из группы, состоящей из ювенильной формы болезни Педжета, мелорестоза, метаболических болезней костей, мастоцитоза, серповидно-клеточной анемии/заболевания, потери костной массы, связанной с трансплантацией органов, потери костной массы, связанной с трансплантацией почек, системной красной волчанки, анкилозирующего спондилоартрита, эпилепсии, ювенильных артритов, талассемии, мукополисахаридозов, болезни Фабри, синдрома Тернера, синдрома Дауна, синдрома Клайнфельтера, проказы, болезни Пертеса, подросткового идиопатического сколиоза, многосистемного воспалительного заболевания у детей, синдрома Винчестера, болезни Менкеса, болезни Вильсона, ишемического заболевания костей (такого как болезнь Легга-Кальве-Пертеса, регионарный мигрирующий остеопороз), анемических состояний, состояний, вызванных стероидами, индуцированной глюкокортикоидами потери костной массы, индуцированной гепарином потери костной массы, заболеваний костного мозга, цинги, недостаточного питания, дефицита кальция, остеопороза, остеопении, алкоголизма, хронического заболевания печени, состояния после менопаузы, хронических воспалительных состояний, ревматоидного артрита, воспалительного заболевания кишечника, язвенного колита, воспалительного колита, болезни Крона, олигоменореи, аменореи, беременности, сахарного диабета, гипертиреозидизма, расстройств щитовидной железы, расстройств паращитовидной железы, болезни Кушинга, акромегалии, гипогонадизма, уменьшения подвижности или бездействия, синдрома симпатической рефлекторной дистрофии, регионарного остеопороза, остеомалации, потери костной массы, связанной с заменой сустава, потери костной массы, связанной с ВИЧ, потери костной массы, связанной со снижением уровня гормона роста, потери костной массы, связанной с муковисцидозом, потери костной массы, связанной с химиотерапией, индуцированной опухолью потери костной массы, потери костной массы, связанной с раком, потери костной массы на фоне гормон-подавляющей терапии, множественной миеломы, потери костной массы, индуцированной применением лекарственных средств, нервной анорексии, потери костной массы лицевой части черепа, связанной с заболеванием, потери костной массы краниальной части черепа, связанной с заболеванием, потери костной массы челюсти, связанной с заболеванием, потери костной массы черепа, связанной с заболеванием, потери костной массы, связанной со старением, потери костной массы лицевой части черепа, связанной со старением, потери костной массы краниальной части черепа, связанной со старением, ключично-черепаго дизостоза, эхондроматоза, фиброзной дисплазии, болезни Гоше, гипофосфатемического рахита, синдрома Марфана, множественных наследственных экзостозов, нейрофиброматоза, несовершенного остеогенеза, остеопетроза, остеопойкилоза склеротических повреждений, псевдоартроза, пиогенного остеомиелита, заболевания периодонта, потери костной массы, индуцированной противосудорожными средствами, первичного и вторичного гиперпаратиреозидизма, синдромов семейного гиперпаратиреозидизма, индуцированной невесомостью потери костной массы, остеопороза у мужчин, остеоартрита, нефрогенной остеодистрофии, инфильтративных заболеваний костей, потери костной массы черепа, связанной со старением, и потери костной массы, связанной с полетом в космос.

В некоторых вариантах реализации субъект опционально страдает (или страдал) от рака. Термин "рак" относится к пролиферативному расстройству, связанному с неконтролируемой клеточной пролиферацией, безудержным ростом клеток и пониженной гибелью клеток/апоптозом. Рак включает, но не ограничиваясь перечисленным, рак молочной железы, рак предстательной железы, рак легкого, рак почки, рак щитовидной железы, меланому, фолликулярные лимфомы, карциномы с p53 мутациями и гормонозависимые опухоли, включая, но не ограничиваясь перечисленным, рак толстой кишки, сердечные опухоли, рак поджелудочной железы, ретинобластому, глиобластому, рак кишечника, рак яичка, рак желудка, нейробластому, миксому, миому, лимфому, эндотелиому, остеобластому, остеокластому, остеосаркому, хондросаркому, аденому, саркому Капоши, рак яичника, лейкоз (включая острые лейкозы (например, острый лимфоцитарный лейкоз, острый миелоцитарный лейкоз, включая миелобластный, промиелоцитарный, миеломоноцитарный, моноцитарный и эритролейкоз)) и хронические лейкозы (например, хронический миелоцитарный (гранулоцитарный) лейкоз и хронический лимфолейкоз), миелодиспластический синдром, истинную полицитемию, лимфомы (например, болезнь Ходжкина и болезнь не-Ходжкина), множественную миелому, макроглобулинемию Вальденстрема, болезни тяжелых цепей и

солидные опухоли, включая, но не ограничиваясь перечисленным, саркомы и карциномы, например фибросаркому, миксосаркому, липосаркому, остеогенную саркому, хордому, ангиосаркому, эндотелиосаркому, лимфангиосаркому, лимфангиоэндотелиосаркому, синовиому, мезотелиому, опухоль Юинга, лейомиосаркому, рабдомиосаркому, плоскоклеточную карциному, базально-клеточную карциному, аденокарциному, карциному потовых желез, карциному слюнных желез, папиллярную карциному, папиллярную аденокарциному, цистаденокарциному, медуллярную карциному, бронхогенную карциному, почечно-клеточную карциному, гепатому, карциному желчных протоков, хориокарциному, семиному, эмбриональную карциному, опухоль Вильмса, рак шейки матки, мелкоклеточную карциному легких, карциному мочевого пузыря, эпителиальную карциному, глиому, астроцитому, медуллобластому, краниофарингиому, эпендимому, пинеалому, гемангиобластому, невриному слухового нерва, олигодендроглиому и менингиому. Термины "метастаз" и "метастаз рака" используются в настоящем документе взаимозаменяемо для обозначения способности раковой клетки распространяться на другие ткани. Например, "метастаз в кость" относится к способности некоторых типов рака, включая, но не ограничиваясь перечисленным, рака молочной железы, предстательной железы, легких, почек, щитовидной железы и меланомы метастазировать в кости.

Способы, описанные в настоящем документе также применимы к другим формам периодонтального заболевания, включая периодонтальное заболевание, связанное с системными расстройствами, такими как сердечно-сосудистое заболевание, инсульт, заболевание легких, воспалительные заболевания и системная красная волчанка; периодонтальное заболевание, связанное с метаболическими расстройствами, такими как сахарный диабет, и периодонтальное заболевание, связанное с гормональными изменениями, связанными, например, с менопаузой. Применение некоторых лекарственных средств, таких как противосудорожные препараты, блокаторы кальциевых каналов и циклоспорин, может также повысить риск гиперплазии десен или периодонтального заболевания, так же как и некоторые гематологические расстройства, включая расстройства иммунной системы, вызванные, например, ВИЧ. Конкретно предусматривается лечение субъектов, страдающих или подверженных риску развития вышеупомянутых расстройств, ингибитором склеростина, описанным в настоящем документе.

В некоторых вариантах реализации субъект опционально страдает от остеолитического расстройства. Используемый в настоящем документе термин "osteолитическое расстройство" относится к любому состоянию, которое вызвано увеличением активности остеокластов, которые являются клетками, ответственными за резорбцию кости. Термины "osteолиз" и "osteолитическая потеря костной ткани" используются взаимозаменяемо для обозначения опосредованной остеокластами резорбции кости или потери костной массы, связанных с остеолитическим расстройством. Osteолитические расстройства возникают у субъектов с предрасположенностью к развитию остеолитического расстройства или они возникают у субъектов с заболеванием, которое приводит или способствует остеолитическому расстройству посредством стимулирования активности остеокластов. В некоторых вариантах реализации остеолитическое расстройство представляет собой остеолитическую потерю костной ткани. В других вариантах реализации остеолитическое расстройство представляет собой индуцированную раковыми метастазами остеолитическую потерю костной ткани. В дополнительных вариантах реализации остеолитическое костное расстройство представляет собой метаболическое заболевание костей, включая, но не ограничиваясь перечисленным, эндокринопатии (например, гиперкортицизм, гипогонадизм, первичный или вторичный гиперпаратиреоз, и гипертиреоз); пищевую недостаточность, включая, но не ограничиваясь перечисленным, рахит, остеопороз, цингу, и недостаточное питание; остеопороз; применение лекарственных средств, включая глюкокортикоиды (индуцированный глюкокортикоидами остеопороз), гепарин и алкоголь; хроническое заболевание, включая синдромы малабсорбции; хроническую почечную недостаточность, включая остеодистрофию почек; хронические заболевания печени, включая остеодистрофию печени; наследственные заболевания, включая несовершенный остеогенез и гомоцистинурию и воспаление кости, связанное с артритом, ревматоидным артритом, псориатическим артритом, фиброзной дисплазией, периодонтальное заболевание и болезнь Педжета.

Термины "индуцированная метастазами остеолитическая потеря костной ткани" и "индуцированная раковыми метастазами остеолитическая потеря костной ткани" используются в настоящем документе взаимозаменяемо для обозначения остеолита или остеолитической потери костной ткани в результате метастазирования раковых клеток в кость. Используемый в настоящем документе термин "индуцированная раковыми метастазами активация остеокластов" означает способность раковых клеток, метастазировавших в кость, индуцировать активацию остеокластов.

Способы, описанные в настоящем документе, включают введение количества "ингибитора склеростина". Используемый в настоящем документе термин "ингибитор склеростина" означает любую молекулу, ингибирующую биологическое действие склеростина на кость, как измерено по изменениям в минерализации костей, плотности костной ткани, высоте кости, влиянию на остеобласты и/или остеокласты, маркерам формирования кости, маркерам резорбции кости, маркерам активности остеобластов, и/или маркерам активности остеокластов. Такие ингибиторы могут действовать путем связывания со склеростинном или его рецептором или партнером связывания. Ингибиторы в этой категории включают "средства, связывающие склеростин", такие как, например, антитела или молекулы на основе пептидов.

Термин "ингибиторы склеростина" также относится к малым органическим химическим соединениям, опционально с молекулярной массой менее около 1000 Да, которые связывают склеростин и ингибируют его активность. Ингибиторы могут действовать альтернативно путем ингибирования экспрессии склеростина. Ингибиторы в этой категории включают полинуклеотиды или олигонуклеотиды, которые связываются с ДНК или мРНК склеростина и ингибируют экспрессию склеростина, включая, но, не ограничиваясь перечисленным, антисмысловой олигонуклеотид, ингибирующую РНК, фермент ДНК (дезоксирибозим), рибозим, аптамер или их фармацевтически приемлемые соли, ингибирующие экспрессию склеростина.

"Средство, связывающее склеростин" связывается с склеростином или его участками, чтобы блокировать или ослаблять связывание человеческого склеростина с одним или больше лигандами. Склеростин, продукт гена *SOST*, отсутствует при склеростеозе, заболевании скелета, характеризующемся чрезмерным ростом костей и сильными плотными костями (Brunkow et al., *Am. J. Hum. Genet.*, 68:577-589 (2001); Balemans et al., *Hum. Mol. Genet.*, 10:537-543 (2001)). Аминокислотная последовательность человеческого склеростина сообщалась Brunkow et al. и раскрыта в публикации патента США №20070110747 как SEQ ID NO: 1 (эта публикация патента включена во всей своей полноте для описания средств, связывающих склеростин и перечня последовательностей). Рекомбинантный человеческий склеростин/*SOST* коммерчески доступен от компании R&D Systems (Миннеаполис, Миннесота, США; по каталогу 2006 №1406-ST-025). Дополнительно, рекомбинантный мышинный склеростин/*SOST* коммерчески доступен от компании R&D Systems (Миннеаполис, Миннесота, США; по каталогу 2006 №1589-ST-025). Моноклональные антитела исследовательского класса, связывающие склеростин, коммерчески доступны от компании R&D Systems (Миннеаполис, Миннесота, USA; мышинное моноклональное: по каталогу 2 00 6 №MAB1406; крысиное моноклональное: по каталогу 2006 №MAB1589). Патенты США под номерами 6395511 и 6803453 и публикации патентов США под номерами 20040009535 и 20050106683 относятся к антителам к склеростину вообще. Примеры средств, связывающих склеростин, пригодных для применения в контексте настоящего изобретения также описаны в публикациях патентов США под номерами 20070110747 и 20070072797, которые включены в настоящий документ посредством ссылки. Дополнительную информацию относительно материалов и способов для создания средств, связывающих склеростин, можно найти в публикации патента США №2 0040158045 (включенной в настоящий документ посредством ссылки).

Средство, связывающее склеростин, по настоящему изобретению предпочтительно является антителом. Термин "антитело" относится к интактному антителу или его связывающему фрагменту. Антитело может содержать полную молекулу антитела (иммуноглобулина) (включая поликлональные, моноклональные, химерные, гуманизированные, и/или человеческие варианты, имеющие полноразмерные тяжелые и/или легкие цепи) или содержать его антигенсвязывающий фрагмент. Фрагменты антител включают фрагменты F(ab')₂, Fab, Fab', Fv, Fc и Fd и могут быть включены в однодоменные антитела (например, нанотела), одноцепочечные антитела, макситела, минитела, интралела, диалела, триалела, тетралела, v-NAR и bis-scFv (см., например, публикацию Hollinger and Hudson, *Nature Biotechnology*, 23(9) :1126-1136 (2005)). Полипептиды антител, включая мономерные полипептиды фибронектина, также раскрыты в патенте США №6703199. Другие полипептиды антител раскрыты в публикации патента США №20050238646. Патенты США под номерами 6395511 и 6803453 и публикации патентов США под номерами 20040009535 и 20050106683 (включены во всей своей полноте в качестве ссылки для раскрытия антител к склеростину) относятся к антителам к склеростину вообще. Аминокислотная последовательность человеческого склеростина изложена в SEQ ID NO: 1 перечня последовательностей и предоставлена как SEQ ID NO: 1 в публикации патента США №20070110747 (указанная публикация патента включена во всей своей полноте для описания склеростина и средств, связывающих склеростин и перечня последовательностей). Дополнительную информацию относительно материалов и способов для создания антитела к склеростину можно найти в публикации патента США №20040158045 (включенной в настоящий документ посредством ссылки в своей полноте).

Фрагмент антитела может быть также любым синтетическим или генетически сконструированным белком. Например, фрагменты антитела включают выделенные фрагменты, состоящие из вариательной области легкой цепи, "Fv" фрагменты, состоящие из вариательных областей тяжелой и легкой цепей и рекомбинантные одноцепочечные полипептидные молекулы, в которых вариательные области легкой и тяжелой цепей соединены пептидным линкером (белки scFv).

Другой формой фрагмента антитела является пептид, содержащий одну или больше областей, определяющих комплементарность (CDR) антитела. CDR (также называемые "минимальными узнающими единицами") получают, например, посредством конструирования полинуклеотидов, которые кодируют CDR, представляющие интерес. Такие полинуклеотиды получают, например, с использованием полимеразной цепной реакции для синтеза вариательной области с использованием мРНК антитело-продуцирующих клеток в качестве матрицы (см., например, публикацию Larrick et al., *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, 2:106 (1991); Courtenay-Luck, "Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies," in *Monoclonal Antibodies Production, Engineering and Clinical Application*, Ritter et al. (eds.), страница 166, Cambridge University Press (1995); и Ward et al., "Genetic Manipulation and Expression of Antibod-

ies," in *Monoclonal Antibodies: Principles and Applications*, Birch et al., (eds.), страница 137, Wiley-Liss, Inc. (1995)).

Антитела к склеростину могут связываться со склеростином SEQ ID NO: 1 или с его вариантом природного происхождения с аффинностью (Kd), меньшей чем или равной 1×10^{-7} М, меньшей чем или равной 1×10^{-8} М, меньшей чем или равной 1×10^{-9} М, меньшей чем или равной 1×10^{-10} М, меньшей чем или равной 1×10^{-11} М или меньшей чем или равной 1×10^{-12} М. Аффинность определяется с использованием различных способов, примером которых является анализ аффинности ИФА. В различных вариантах реализации аффинность определяется посредством анализа BIAcore. В различных вариантах реализации аффинность определяется кинетическим способом. В различных вариантах реализации аффинность определяется посредством способа равновесие/раствор.

Публикация патента США №20070110747 содержит дополнительное описание анализов аффинности, пригодных для определения аффинности (Kd) антитела к склеростину.

В некоторых или любых вариантах реализации антитело или фрагмент антитела к склеростину связывается с полипептидом склеростина, содержащим аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1 и связывает последовательность SEQ ID NO: 6 (CGPARLLPNAIGRGKWWRPSGPDFRC; соответствующую аминокислотам 86-111 SEQ ID NO: 1). В качестве альтернативы или дополнительно, антитело к склеростину связывается с полипептидом склеростина, содержащим аминокислоты 57-146 SEQ ID NO: 1. В качестве альтернативы или дополнительно, антитело к склеростину связывается с полипептидом склеростина, содержащим аминокислоты 89-103 SEQ ID NO: 1 и/или аминокислоты 137-151 SEQ ID NO: 1. В качестве альтернативы или дополнительно, антитело к склеростину связывается с полипептидом склеростина, содержащим аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1 и связывает последовательность по меньшей мере одну из SEQ ID NO: 2 (DVSEYSCRELHFTR; соответствующую аминокислотам 51-64 SEQ ID NO: 1), SEQ ID NO: 3 (SAKPVTELVCSGQCGPAR; соответствующую аминокислотам 73-90 SEQ ID NO: 1), SEQ ID NO: 4 (WWRPSGPDFRCIPDRYR; соответствующую аминокислотам 101-117 SEQ ID NO: 1), SEQ ID NO: 5 (LVASCKCKRLTR; соответствующую аминокислотам 138-149 SEQ ID NO: 1), SEQ ID NO: 70 (SAKPVTELVCSGQC; соответствующую аминокислотам 73-86 SEQ ID NO: 1), SEQ ID NO: 71 (LVASCKC; соответствующую аминокислотам 138-144 SEQ ID NO: 1), SEQ ID NO: 72 (C1RELHFTR; соответствующую аминокислотам 57-64 SEQ ID NO: 1) или SEQ ID NO: 73 (CIPDRYR; соответствующую аминокислотам 111-117 SEQ ID NO: 1) в SEQ ID NO: 1. Например, в одном аспекте, антитело к склеростину связывает подобласть склеростина SEQ ID NO: 1, содержащую SEQ ID NO: 2-5 (и/или SEQ ID NO: 70-73), опционально в своей природной трехмерной конформации. Опционально, антитело к склеростину связывает пептид, состоящий из одной или больше SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72 или SEQ ID NO: 73 (например, пептид, состоящий из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5 или пептид, состоящий из SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72 и SEQ ID NO: 73).

В некоторых или любых вариантах реализации антитело к склеростину связывается с полипептидом склеростина, имеющим аминокислотные последовательности SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 и SEQ ID NO:5, где SEQ ID NO:2 и 4 соединены дисульфидной связью в положениях аминокислот 57 и 111 относительно SEQ ID NO:1, а SEQ ID NO:3 и 5 соединены по меньшей мере одним из: (а) дисульфидной связью в положениях аминокислот 82 и 142 относительно SEQ ID NO:1 и (б) дисульфидной связью в положениях аминокислот 86 и 144 относительно SEQ ID NO:1; полипептид может сохранять третичную структуру соответствующей полипептидной области человеческого склеростина SEQ ID NO:1. В качестве альтернативы или дополнительно, средство, связывающее склеростин (например, антитело к склеростину) связывает полипептид, имеющий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72 и SEQ ID NO: 73, при этом SEQ ID NO: 72 и 73 соединены дисульфидной связью в положениях аминокислот 57 и 111 относительно SEQ ID NO: 1, а SEQ ID NO: 70 и 71 соединены по меньшей мере одним из: (а) дисульфидной связью в положениях аминокислот 82 и 142 относительно SEQ ID NO: 1 и (б) дисульфидной связью в положениях аминокислот 86 и 144 относительно SEQ ID NO: 1.

Опционально, антитело к склеростину связывает пептид, состоящий по существу из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5, при этом SEQ ID NO: 2 и 4 соединены дисульфидной связью в положениях аминокислот 57 и 111 относительно SEQ ID NO: 1, а SEQ ID NO: 3 и 5 соединены по меньшей мере одним из: (а) дисульфидной связью в положениях аминокислот 82 и 142 относительно SEQ ID NO: 1 и (б) дисульфидной связью в положениях аминокислот 86 и 144 относительно SEQ ID NO: 1.

Опционально, антитело к склеростину связывается с полипептидом, состоящим по существу из многократно процессированного белка человеческого склеростина SEQ ID NO: 1, при этом (а) аминокислоты 1-50, 65-72, 91-100, 118-137 и 150-190 SEQ ID NO: 1 в указанном полипептиде отсутствуют или (б) аминокислоты 1-56, 65-72, 87-110, 118-137 и 145-190 SEQ ID NO: 1 в указанном полипептиде отсутствуют.

В некоторых или любых вариантах реализации антитело к склеростину связывается с полипептидом, имеющим аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72 и SEQ ID NO: 73, при этом SEQ ID NO: 72 и 73 соединены дисульфидной связью в положениях аминокислот 57 и 111 относительно SEQ ID NO: 1, а SEQ ID NO: 70 и 71 соединены по меньшей мере одним из: (а) дисульфидной связью в положениях аминокислот 82 и 142 относительно SEQ ID NO: 1 и (б) дисульфидной связью в положениях аминокислот 86 и 144 относительно SEQ ID NO: 1.

В некоторых или любых вариантах реализации полипептид сохраняет третичную структуру соответствующей полипептидной области человеческого склеростина SEQ ID NO: 1.

В некоторых или любых вариантах реализации антитело к склеростину связывается с (i) участком человеческого склеростина, содержащим аминокислоты 51-64, 73-90, 101-117 и 138-149 SEQ ID NO: 1, при этом указанный участок имеет по меньшей мере один по меньшей мере два или все три из перечисленных пунктов:

(а) дисульфидная связь между аминокислотами 57 и 111;

i. (б) дисульфидная связь между аминокислотами 82 и 142; и ii. (в) дисульфидная связь между аминокислотами 86 и 144; или

(b) (ii) участком человеческого склеростина, содержащим аминокислоты 57-64, 73-86, 111-117 и 138-144 SEQ ID NO: 1, при этом указанный участок имеет по меньшей мере один по меньшей мере два или все три из перечисленных пунктов:

(с) дисульфидная связь между аминокислотами 57 и 111;

i. (б) дисульфидная связь между аминокислотами 82 и 142; и ii. (в) дисульфидная связь между аминокислотами 86 и 144.

В некоторых или любых вариантах реализации антитело к склеростину также связывается с эпитопом SEQ ID NO: 6.

Антитела к склеростину для применения в способах, описанных в настоящем документе, предпочтительно модулируют функцию склеростина в анализе на основе клеток, описанном в публикации патента США №2 007/0110747 и/или анализе *in vivo*, описанном в публикации патента США №20070110747 и/или связываются с одним или больше эпитопами, описанными в публикации патента США №2007/0110747 и/или перекрестно блокируют связывание одним из антител, описанных в публикации патента США №2007/0110747 и/или перекрестно блокируются от связывания склеростина одним из антител, описанных в публикации патента США №2007/0110747 (включены в качестве ссылки во всей своей полноте и для описания анализов для определения характеристик антитела к склеростину).

В различных аспектах антитело к склеростину способно нейтрализовать склеростин в анализе минерализации на основе клеток МС3Т3, при менее чем 6-кратном избытке молей сайтов связывания склеростина на лунку по сравнению с числом молей склеростина на лунку. Минерализация клетками клона остеобластов в культуре или первичных клеток или клеточных линий, используется в качестве *in vitro* модели формирования кости. Пример анализа минерализации на основе клеток описан в публикации патента США №2 0070110747, например, в примере 8 (включенном в настоящий документ посредством ссылки). Клетки МС3Т3-Е1 (Sudo et al., J. Cell Biol., 95:191-198 (1983)) и субклоны исходной клеточной линии могут образовывать минерал в культуре при росте в присутствии дифференцирующих средств. Такие субклоны включают МС3Т3-Е1-ВF (Smith et al., J. Biol. Chem., 275:19992-20001 (2000)). Как для субклона МС3Т3-Е1-ВF, так и для исходных клеток МС3Т3-Е1, склеростин может ингибировать одну или больше последовательностей событий, приведших к и включающих отложение минералов (т.е. склеростин ингибирует минерализацию). Антитела к склеростину, способные нейтрализовать ингибирующую активность склеростина, допускают минерализацию культуры в присутствии склеростина таким образом, что существует статистически существенное увеличение, например, отложения фосфата кальция (измеренного как кальций) по сравнению с количеством кальция, измеренного в группе обработки только склеростинном (т.е. без антитела).

При выполнении анализа с целью определения, может ли конкретное антитело к склеростину (или другой ингибитор склеростина) нейтрализовать склеростин, желательно, чтобы количество склеростина, используемое в анализе, было минимальным количеством склеростина, которое вызывает по меньшей мере 70%, статистически значимое уменьшение отложения фосфата кальция (измеренного как кальций) в группах применения только склеростина по сравнению с количеством кальция, измеренным в группах без склеростина. Нейтрализующее антитело к склеростину определяется как то, что вызывает статистически значимое увеличение отложения фосфата кальция (измеренного как кальций) по сравнению с количеством кальция, измеренного в группе обработки только склеростинном (т.е. без антитела). Для того чтобы определить, является ли антитело к склеростину нейтрализующим или нет, количество антитела к склеростину, используемое в анализе, должно быть таким, чтобы имелся избыток молей сайтов связывания склеростина на лунку по сравнению с числом молей склеростина на лунку. В зависимости от силы антитела, кратность избытка, которая может потребоваться, может составлять 24, 18, 12, 6, 3 или 1,5, и специалист в данной области техники знаком с обычной практикой тестирования более одной концентрации связывающего средства (антитела). Например, очень сильное нейтрализующее антитело к склеростину будет нейтрализовать склеростин при менее чем 6-кратном избытке молей сайтов связывания

склеростина на лунку по сравнению с числом молей склеростина на лунку. Менее сильное нейтрализующее антитело к склеростину будет нейтрализовать склеростин только при 12, 18 или 24 кратном избытке.

Антитело к склеростину опционально имеет IC_{50} равный 100 нМ или меньше, или 75 нМ или меньше, или 50 нМ или меньше, или 25 нМ или меньше для нейтрализации человеческого склеростина в анализе на основе клеток, таком как анализ специфической костной щелочной фосфатазы, например, анализ специфической костной щелочной фосфатазы, описанный в международной патентной публикации №. WO 2008/115732 и патенте США №7744874 (включены в качестве ссылки во всей своей полноте для описания клеточных анализов и антител к склеростину). Анализ специфической костной щелочной фосфатазы основывается на способности склеростина уменьшать уровни щелочной фосфатазы, стимулированные BMP-4 и Wnt3a в мультипотентной мышечной клеточной линии C2C12. Согласно WO 2008/115732, нейтрализующее антитело к склеростину опосредует зависимое от дозы повышение активности щелочной фосфатазы в этом анализе. Иллюстративные протоколы анализов на основе клеток предоставлены в примере 1.

В качестве альтернативы или дополнительно, антитело к склеростину имеет IC_{50} равный 100 нМ или меньше (например, 75 нМ или меньше или 50 нМ или меньше) для нейтрализации человеческого склеростина в анализе Wnt сигналинга на основе клеток в клеточных линиях HEK293, например, в анализе Wnt, включающем Wnt1-опосредованную индукцию репортерного гена STF, описанном, например, в международной патентной публикации №. WO 2009/047356 (включенной в качестве ссылки для обсуждения антител к склеростину и анализов на основе клеток). В качестве альтернативы или дополнительно, антитело к склеростину имеет IC_{50} равный 500 нМ или меньше (например, 250 нМ или меньше, 150 нМ или меньше, 100 нМ или меньше, или 50 нМ или меньше) для нейтрализации человеческого склеростина в анализе индуцированной BMP2 минерализации в клетках MC3T3, таком как анализ минерализации, описанный, например, в международной патентной публикации №. WO 2009/047356. Иллюстративный протокол предоставлен в примере 1.

Примеры антител к склеростину, пригодных для использования в контексте настоящего изобретения, описаны в публикациях патентов США под номерами 2007/0110747 и 2007/0072797, которые включены в настоящий документ посредством ссылки. В одном варианте реализации настоящего изобретения антитело к склеростину перекрестно блокирует связывание по меньшей мере одного из антител со склеростином Ab-A, Ab-B, Ab-C, Ab-D, Ab-1, Ab-2, Ab-3, Ab-4, Ab-5, Ab-6, Ab-7, Ab-8, Ab-9, Ab-10, Ab-11, Ab-12, Ab-13, Ab-14, Ab-15, Ab-16, Ab-17, Ab-18, Ab-19, Ab-20, Ab-21, Ab-22, Ab-23 и Ab-24 (все из которых описаны в публикации патента США №20070110747). В качестве альтернативы или дополнительно, антитело к склеростину перекрестно блокируется от связывания со склеростином по меньшей мере одним из антител Ab-A, Ab-B, Ab-C, Ab-D, Ab-1, Ab-2, Ab-3, Ab-4, Ab-5, Ab-6, Ab-7, Ab-8, Ab-9, Ab-10, Ab-11, Ab-12, Ab-13, Ab-14, Ab-15, Ab-16, Ab-17, Ab-18, Ab-19, Ab-20, Ab-21, Ab-22, Ab-23 и Ab-24 (все из которых описаны в публикации патента США №20070110747). Термины "перекрестно блокируют", "перекрестно заблокирован" и "перекрестное блокирование" используются в настоящем документе взаимозаменяемо и означают способность антитела препятствовать связыванию других антител со склеростином. Степень, в которой антитело способно препятствовать связыванию другого антитела со склеростином, и, следовательно, возможность говорить о перекрестном блокировании, можно определять с помощью анализов конкурентного связывания. В некоторых аспектах настоящего изобретения перекрестно блокирующее антитело или его фрагмент снижает связывание склеростина эталонным антителом в диапазоне от около 40% до около 100%, например, от около 60% до около 100%, конкретно в диапазоне от 70% до 100% и более конкретно в диапазоне от 80% до 100%. В особенно подходящем количественном анализе для обнаружения перекрестного блокирования используют машину Biacore, которая измеряет степень взаимодействия с помощью технологии поверхностного плазмонного резонанса. В другом подходящем количественном анализе перекрестного блокирования используют подход на основе ИФА для измерения конкуренции между антителами исходя из их связывания со склеростином.

В некоторых или любых вариантах реализации антитело к склеростину перекрестно блокирует связывание иммуноглобулина, содержащего полноразмерные тяжелые и легкие цепи, со склеростином SEQ ID NO: 1 и/или перекрестно блокируется от связывания со склеростином SEQ ID NO: 1 иммуноглобулином, содержащим полноразмерные тяжелые и легкие цепи, при этом иммуноглобулин, содержащий полноразмерные тяжелые и легкие цепи содержит последовательности CDR, раскрытые в настоящем документе, например, один из следующих трех наборов последовательностей CDR: а) CDR-L1 SEQ ID NO: 284, CDR-L2 SEQ ID NO: 285, CDR-L3 SEQ ID NO: 286, CDR-H1 SEQ ID NO: 296, CDR-H2 SEQ ID NO: 297 и CDR-H3 SEQ ID NO: 298; б) CDR-L1 SEQ ID NO: 48, CDR-L2 SEQ ID NO: 49, CDR-L3 SEQ ID NO: 50, CDR-H1 SEQ ID NO: 45, CDR-H2 SEQ ID NO: 46 и CDR-H3 SEQ ID NO: 47; или в) CDR-L1 SEQ ID NO: 42, CDR-L2 SEQ ID NO: 43, CDR-L3 SEQ ID NO: 44, CDR-H1 SEQ ID NO: 39, CDR-H2 SEQ ID NO: 40 и CDR-H3 SEQ ID NO: 41. В качестве альтернативы или дополнительно, антитело к склеростину перекрестно блокирует связывание иммуноглобулина, содержащего полноразмерные тяжелые и легкие цепи со склеростином SEQ ID NO: 1 и/или перекрестно блокируется от связывания со склеростином SEQ ID NO: 1 иммуноглобулином, содержащим полноразмерные тяжелые и легкие цепи, при этом иммуног-

лобулин, содержащий полноразмерные тяжелые и легкие цепи, содержит следующие CDR: CDR-H1 SEQ ID NO: 245, CDR-H2 SEQ ID NO: 246, CDR-H3 SEQ ID NO: 247, CDR-L1 SEQ ID NO: 78, CDR-L2 SEQ ID NO: 79 и CDR-L3 SEQ ID NO: 80.

В качестве альтернативы или дополнительно, антитело к склеростину перекрестно блокирует связывание иммуноглобулина, содержащего полноразмерные тяжелые и легкие цепи, со склеростином SEQ ID NO: 1 и/или перекрестно блокируется от связывания со склеростином SEQ ID NO: 1 иммуноглобулином, содержащим полноразмерные тяжелые и легкие цепи, при этом иммуноглобулин, содержащий полноразмерные тяжелые и легкие цепи, содержит следующие CDR: CDR-H1 SEQ ID NO: 269, CDR-H2 SEQ ID NO: 270, CDR-H3 SEQ ID NO: 271, CDR-L1 SEQ ID NO: 239, CDR-L2 SEQ ID NO: 240 и CDR-L3 SEQ ID NO: 241.

Примеры подходящих антител к склеростину и их фрагментов включают антитела и фрагменты антител, имеющие один или больше из CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 конкретно раскрытых в настоящем документе и раскрытых в публикации патента США №20070110747. По меньшей мере одна область из CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 может иметь по меньшей мере одну аминокислотную замену, при условии, что антитело сохраняет специфичность связывания незамещенной CDR. Примеры антител к склеростину включают, но не ограничиваются перечисленным, Ab-A, Ab-B, Ab-C, Ab-D, Ab-1, Ab-2, Ab-3, Ab-4, Ab-5, Ab-6, Ab-7, Ab-8, Ab-9, Ab-10, Ab-11, Ab-12, Ab-13, Ab-14, Ab-15, Ab-16, Ab-17, Ab-18, Ab-19, Ab-20, Ab-21, Ab-22, Ab-23 и Ab-24 из публикации патента США №20070110747.

Кроме того, антитело к склеростину может содержать по меньшей мере одну CDR последовательность, имеющую по меньшей мере 75% идентичности (например, на 100% идентичную) CDR, выбранной из SEQ ID NO: 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 78, 79, 80, 81, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 351, 352, 353, 358, 359 и 360, предоставленных в перечне последовательностей и раскрытых в публикации патента США №20070110747. Предпочтительно, антитело к склеростину содержит по меньшей мере одну CDR последовательность, имеющую по меньшей мере 75% идентичности CDR, выбранной из SEQ ID NO: 245, 246, 247, 78, 79, 80, 269, 270, 271, 239, 240 и 241, все из которых предоставлены в перечне последовательностей и описаны в публикации патента США №20070110747. Как описано в публикации патента США №20070110747, антитело к склеростину может содержать:

- а) CDR последовательности SEQ ID NO:54, 55 и 56 и CDR последовательности SEQ ID NO:51, 52 и 53;
- б) CDR последовательности SEQ ID NO:60, 61 и 62 и CDR последовательности SEQ ID NO:57, 58 и 59;
- в) CDR последовательности SEQ ID NO:48, 49 и 50 и CDR последовательности SEQ ID NO:45, 46 и 47;
- г) CDR последовательности SEQ ID NO:42, 43 и 44 и CDR последовательности SEQ ID NO:39, 40 и 41;
- д) CDR последовательности SEQ ID NO:275, 276 и 277 и CDR последовательности SEQ ID NO:287, 288 и 289;
- е) CDR последовательности SEQ ID NO:278, 279 и 280 и CDR последовательности SEQ ID NO:290, 291 и 292;
- ж) CDR последовательности SEQ ID NO:78, 79 и 80 и CDR последовательности SEQ ID NO: 245, 246 и 247;
- з) CDR последовательности SEQ ID NO:81, 99 и 100 и CDR последовательности SEQ ID NO:248, 249 и 250;
- и) CDR последовательности SEQ ID NO:101, 102 и 103 и CDR последовательности SEQ ID NO:251, 252 и 253;
- к) CDR последовательности SEQ ID NO:104, 105 и 106 и CDR последовательности SEQ ID NO:254, 255 и 256;
- л) CDR последовательности SEQ ID NO:107, 108 и 109 и CDR последовательности SEQ ID NO:257, 258 и 259;
- м) CDR последовательности SEQ ID NO:110, 111 и 112 и CDR последовательности SEQ ID NO:260, 261 и 262;
- н) CDR последовательности SEQ ID NO:281, 282 и 283 и CDR последовательности SEQ ID NO:293, 294 и 295;
- о) CDR последовательности SEQ ID NO:113, 114 и 115 и CDR последовательности SEQ ID NO:263, 264 и 265;
- п) CDR последовательности SEQ ID NO:284, 285 и 286 и CDR последовательности SEQ ID NO:296, 297 и 298;

р) CDR последовательности SEQ ID NO:116, 237 и 238 и CDR последовательности SEQ ID NO:266, 267 и 268;

с) CDR последовательности SEQ ID NO:239, 240 и 241 и CDR последовательности SEQ ID NO:269, 270 и 271; CDR последовательности SEQ ID NO:242, 243 и 244 и CDR последовательности SEQ ID NO:272, 273 и 274; или

т) CDR последовательности SEQ ID NO:351, 352 и 353 и CDR последовательности SEQ ID NO:358, 359 и 360.

Антитело к склеростину может содержать по меньшей мере одну CDR последовательность, имеющую по меньшей мере 75% идентичности (на 100% идентичную) CDR, выбранной из CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, при этом CDR-H1 имеет последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 245, CDR-H2 имеет последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 246, CDR-H3 имеет последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 247, CDR-L1 имеет последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 78, CDR-L2 имеет последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 79 и CDR-L3 имеет последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 80, все из которых предоставлены в перечне последовательностей и описаны в публикации патента США №20070110747. Антитело к склеростину, в различных аспектах, содержит две CDR или шесть CDR. Опционально, антитело к склеростину содержит всю или часть тяжелой цепи (например, две тяжелые цепи), содержащую SEQ ID NO: 378 и всю или часть легкой цепи (например, две легкие цепи) содержащую SEQ ID NO 376.

Антитело к склеростину может содержать по меньшей мере одну CDR последовательность, имеющую по меньшей мере 75% идентичности (например, на 100% идентичную) CDR, выбранной из CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, при этом CDR-H1 имеет последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 269, CDR-H2 имеет последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 270, CDR-H3 имеет последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 271, CDR-L1 имеет последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 239, CDR-L2 имеет последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 240 и CDR-L3 имеет последовательность, приведенную в SEQ ID NO 241, все из которых предоставлены в перечне последовательностей и описаны в публикации патента США №20070110747. Антитело к склеростину, в различных аспектах, содержит по меньшей мере две CDR или шесть CDR. Опционально, антитело к склеростину содержит всю или часть тяжелой цепи (например, две тяжелые цепи), содержащую SEQ ID NO: 366 и всю или часть легкой цепи (например, две легкие цепи), содержащую SEQ ID NO 364.

В качестве альтернативы, антитело к склеростину может иметь тяжелую цепь, содержащую H1, H2 и H3 CDR и содержащую полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 137, 145 или 392 или ее вариант, в котором CDR являются по меньшей мере на 75% идентичными (например, на 100% идентичными) SEQ ID NO: 245, 246 и 247, соответственно, и легкую цепь, содержащую L1, L2 и L3 CDR и содержащую полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 133 или 141 или ее вариант в котором CDR являются по меньшей мере на 75% идентичными (например, на 100% идентичными) SEQ ID NO: 78, 79 и 80, соответственно (как описано в публикации патента США №20070110747).

Антитело к склеростину может иметь тяжелую цепь, содержащую H1, H2 и H3 CDR и содержащую полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 335, 331, 345 или 396 или вариант любого из вышеперечисленного, в котором CDR являются по меньшей мере на 75% идентичными (например, на 100% идентичными) SEQ ID NO: 269, 270 и 271, соответственно, и легкую цепь, содержащую L1, L2 и L3 CDR и содержащую полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 334 и 341 или вариант любого из вышеперечисленного, в котором CDR являются по меньшей мере на 75% идентичными (например, на 100% идентичными) SEQ ID NO: 239, 240 и 241, соответственно (как описано в публикации патента США №20070110747). Все комбинации последовательностей тяжелых и легких цепей предусматриваются (например, тяжелые цепи, содержащие SEQ ID NO: 335 и легкие цепи, содержащие SEQ ID NO: 334; тяжелые цепи, содержащие SEQ ID NO: 331 и легкие цепи, содержащие SEQ ID NO: 334 и 341; и тяжелые цепи, содержащие SEQ ID NO: 345 или 396 и легкие цепи, содержащие SEQ ID NO: 341).

В качестве альтернативы антитело к склеростину имеет тяжелую цепь, содержащую полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:137 и легкую цепь, содержащую полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:133; тяжелую цепь, содержащую полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:145 или 392 и легкую цепь, содержащую полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 141; тяжелую цепь, содержащую полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:335 и легкую цепь, содержащую полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:334; тяжелую цепь, содержащую полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:331 и легкую цепь, содержащую полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:341; или тяжелую цепь, содержащую полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:345 или 396 и легкую цепь, содержащую полипептид, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO:341 (как описано в публикации патента США №2 0070110747).

Примеры антител к склеростину также включают, но не ограничиваются перечисленным, антитела

к склеростину, раскрытые в международных патентных публикациях под номерами. WO 2008/092894, WO 2008/115732, WO 2009/056634, WO 2009/047356, WO 2010/100200, WO 2010/100179, WO 2010/115932 и WO 2010/130830 (каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте), например, антитело к склеростину, содержащее CDR SEQ ID NO: 2 0-2 5 из международной патентной публикации №. WO 2008/115732 (SEQ ID NO: 416-421 в настоящем документе), антитело к склеростину, содержащее CDR SEQ ID NO: 26-31 из международной патентной публикации №. WO 2008/115732 (SEQ ID NO: 422-427 в настоящем документе), антитело к склеростину содержащее CDR SEQ ID NO: 32-37 из международной патентной публикации №. WO 2 008/115732 (SEQ ID NO: 428-433 в настоящем документе), антитело к склеростину, содержащее CDR SEQ ID NO: 4, 15, 26, 37, 48 и 59 из международной патентной публикации №. WO 2009/047356 (SEQ ID NO: 443, 454, 465, 476, 487 и 498, соответственно, в настоящем документе) или антитело к склеростину, содержащее аминокислотную последовательность по меньшей мере одну из SEQ ID NO: 135-143, 153-161 или 171-179 из международной патентной публикации №. WO 2010/130830 (SEQ ID NO: 745-753, 763-771, 781-789, соответственно, в настоящем документе).

В качестве альтернативы способы, описанные в настоящем документе, включают введение ингибитора склеростина кроме антитела к склеростину. Такие средства могут действовать прямо или опосредованно на SOST или склеростин. Ингибиторы склеростина, предусмотренные для использования в способах, описанных в настоящем документе, включают те, что описаны в публикации патента США №2003/0229041 (полное раскрытие которого включено в настоящий документ посредством ссылки, с особым акцентом на описании ингибиторов склеростина). Например, средства, пригодные для модуляции экспрессии SOST и активности склеростина включают, но не ограничиваются перечисленным, стероиды (например, те, которые соответствуют формуле 1 публикации патента США №2003/0229041), алкалоиды, терпеноиды, пептоиды и синтетические химические вещества. В некоторых вариантах реализации антагонист или агонист SOST может связываться с глюкокортикоидным рецептором. Например, дексаметазон имеет тенденцию отменять стимулирующее влияние BMP-4 и BMP-6 на экспрессию SOST. Другие химические соединения, включая аналоги глюкокортикоидов, соли желчных кислот (например, те, которые соответствуют формуле 3 публикации патента США №2003/0229041) и простагландины (например, те, которые соответствуют формуле 2 публикации патента США №2003/0229041) также модулируют влияние костных морфогенетических белков на экспрессию SOST и предусматриваются для использования в способах, описанных в настоящем документе.

Ингибиторы экспрессии склеростина, которые могут быть использованы в соответствии со способами, описанными в настоящем документе, включают, но не ограничиваются перечисленным, ингибирующие нуклеиновые кислоты, в том числе их фармацевтически приемлемые соли, например, натриевые соли. В некоторых вариантах реализации ингибирующую нуклеиновую кислоту, описанную в другом месте настоящего документа, выбирают из группы, состоящей из антисмысловых олигонуклеотидов, рибозимов, олигонуклеотидов внешней гидовой последовательности (ВГП), соединений миРНК, соединений одно-или двухцепочечной РНК-интерференции (РНКи), таких как соединения миРНК, модифицированные основания/закрытые нуклеиновые кислоты (ЗНК), антагомиры, пептидные нуклеиновые кислоты (ПНК) и другие олигомерные соединения или олигонуклеотидные миметики, которые гибридизуются по меньшей мере с участком нуклеиновой кислоты-мишени и модулируют ее функцию. В некоторых вариантах реализации ингибирующая нуклеиновая кислота является одноцепочечной или двухцепочечной. В некоторых вариантах реализации ингибирующая нуклеиновая кислота представляет собой антисмысловые олигонуклеотиды, модифицированные основания/закрытые нуклеиновые кислоты (ЗНК), пептидные нуклеиновые кислоты (ПНК), арабинонуклеиновые кислоты (АНК) (как описано, например в, РСТ публикации №WO 99/67378); 2'-фтор-D-арабинонуклеиновые кислоты (ФАНК) (как описано, например, в публикации Lon et al., *Biochem.*, 41:3457-3467, 2002 и Min et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 12:2651-2654, 2002; раскрытия которых включены в настоящий документ в качестве ссылки во всей их полноте); фосфородиамидат морфолино олигомеры (ФМО) (например, как описано в публикации Iverson, *Curr. Opin. Mol. Ther.*, 3:235-238, 2001; и Wang et al., *J. Gene Med.*, 12:354-364, 2010; раскрытия которых включены в настоящий документ в качестве ссылки во всей их полноте); этилен-мостиговые нуклеиновые кислоты (как описано, например, в международной патентной публикации №WO 2005/042777, публикациях Morita et al., *Nucleic Acid Res., Suppl* 1:241-242, 2001; Surono et al., *Hum. Gene Ther.*, 15:749-757, 2004; Koizumi, *Curr. Opin. Mol. Ther.*, 8:144-149, 2006 и Horie et al., *Nucleic Acids Symp. Ser (Oxf)*, 49:171-172, 2005; раскрытия которых включены в настоящий документ в качестве ссылки во всей их полноте); 2'-0,4'-С-этилен-мостиговую нуклеиновую кислоту, рибозим, олигонуклеотиды внешней гидовой последовательности (ВГП), микроРНК (микроРНК), малые временные РНК (мвРНК) и соединения одно-или двухцепочечной РНК-интерференции (РНКи) или миРНК. В некоторых вариантах реализации ингибирующая нуклеиновая кислота содержит по меньшей мере одну нуклеотидную и/или нуклеозидную модификацию (например, олигонуклеотиды с модификацией скелетных или сахарных фрагментов).

Активность конкретного ингибитора склеростина, например, антитела или фрагмента антитела к склеростину для применения в способах, описанных в настоящем документе, может быть измерена раз-

личными способами, включая способы, описанных выше для обнаружения увеличения содержания минеральных веществ кости или плотности кости. Способность ингибитора склеростина модулировать костную массу можно рассчитать из массы тела или с помощью других способов (см. Guinness-Heu, *Metab. Bone Dis. Relat. Res.*, 5:177-181 (1984)). Животные и определенные животные модели используются в данной области техники для исследования влияния фармацевтических композиций и способов на, например, параметры потери костной массы, резорбции кости, формирования костей, прочности костей или минерализации костей. Примеры таких моделей включают модель крыс с овариоэктомией (Kalu, *Воле and Mineral*, 15:175-192 (1991); Frost and Jee, *Воле and Mineral*, 18:227-236 (1992); и Jee and Yao, *J. Musculoskel. Neuron. Interact.*, 1:193-207 (2001)). Способы измерения активности средства, связывающего склеростин, описанные в настоящем документе, также могут быть использованы для определения эффективности других ингибиторов склеростина.

В качестве альтернативы ингибитор склеростина может быть выбран на основании его способности модулировать уровни костных маркеров. Костные маркеры представляют собой продукты, созданные во время процесса костного ремоделирования и высвобождаемые костью, остеобластами и/или остеокластами. Колебания уровней "маркеров" резорбции кости и/или формирования кости подразумевает изменения в моделировании/ремоделировании кости. Международный фонд остеопороза (МФО) рекомендует использование костных маркеров для мониторинга терапии, действующей на плотность кости (см., например, публикацию Delmas et al., *Osteoporos Int., Suppl. 6:S2-17* (2000), включенную в настоящий документ посредством ссылки). Маркеры, указывающие на резорбцию кости (или активность остеокластов) включают, например, С-телопептид (например, С-концевой телопептид коллагена I типа (СТХ) или сывороточный С-телопептид с поперечными связями), N-телопептид (N-концевой телопептид коллагена I типа (NTX)), дезоксипиридинолин (ДПИД), пиридинолин, гидроксипролин мочи, галактозил-гидроксилизин и тартрат-резистентная кислая фосфатаза (например, изоформа 5b сывороточной тартрат-резистентной кислой фосфатазы). Маркеры формирования/минерализации кости включают, но не ограничиваются перечисленным, специфическую костную щелочную фосфатазу (СКЩФ), пептиды, высвобождаемые из N- и С-концевого удлинения проколлагена I типа (PINP, PICP) и остеокальцин (OstCa). Несколько наборов являются коммерчески доступными для обнаружения и квантификации маркеров в клинических образцах, таких как моча и кровь.

Пути введения

Ингибитор склеростина предпочтительно вводят субъекту в физиологически приемлемой (например, фармацевтической) композиции, которая может включать носители, наполнители или растворители. Следует понимать, что ингибиторы склеростина (например, антитело или фрагмент антитела к склеростину), описанные в настоящем документе, могут быть использованы в приготовлении лекарственного средства для введения с использованием любой из описанных в настоящем документе схем дозирования и распределения по срокам. Фармацевтические композиции и способы лечения раскрыты в публикации патента США №20050106683 и 2007/110747, которые включены в настоящее описание в качестве ссылки. Термин "физиологически приемлемый" относится к молекулярным частицам и композициям, которые не вызывают аллергическую или подобную неблагоприятную реакцию при введении человеку. Кроме того, композиция, которую вводят субъекту, может содержать более одного ингибитора склеростина (например, два антитела к склеростину или средство, связывающее склеростин и синтетический химический ингибитор склеростина) или ингибитор склеростина в комбинации с одним или больше терапевтических средств, обладающих различными механизмами действия.

Разработка композиций, пригодных для использования при различных путях введения, включая например, подкожный, пероральный, парентеральный, внутривенный, интраназальный и внутримышечный пути введения и составы хорошо известны в данной области техники и рассматриваются в публикации патента США №2007/0110747. Например, при определенных обстоятельствах, было бы желательным доставлять фармацевтическую композицию, содержащую средство, связывающее склеростин подкожно, парентерально, внутривенно, внутримышечно или даже внутривнутрино. Такие подходы, хорошо известны специалистам в данной области техники, некоторые из них дополнительно описаны, например, в патентах США под номерами. 5543158; 5641515 и 5399363. Примеры фармацевтических форм, пригодных для инъекционного применения, включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для экстремального приготовления стерильных растворов или дисперсий для инъекций (например, см. патент США №54 664 68). Во всех случаях форма должна быть стерильной и должна быть жидкой до такой степени, чтобы ее можно было вводить с помощью шприца (т.е. не быть чрезмерно вязкой, такой чтобы препятствовать прохождению через шприц).

В одном аспекте ингибитор склеростина (например, антитело или фрагмент антитела к склеростину) вводят системно. В одном варианте реализации для парентерального введения в водном растворе, раствор при необходимости должен быть соответствующим образом забуферен и жидкому разбавителю сначала необходимо придать изотоничность с помощью достаточного количества физиологического раствора или глюкозы. Эти конкретные водные растворы особенно подходят для внутривенного, внутримышечного, подкожного и внутривнутрино введения. Например, одна доза может быть растворена в 1 мл изотонического раствора NaCl и или добавлена к 1000 мл жидкости для введения в подкожную

клетчатку, или введена посредством инъекции в предложенный участок для вливания (см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th ed., Mack Pub. Co., Easton, PA, стр. 1035-1038 и 1570-1580). Некоторые изменения дозы и частоты введения могут возникать в зависимости от состояния субъекта, подлежащего лечению; возраста, роста, массы тела и общего состояния здоровья пациента и наличия каких-либо побочных эффектов. Кроме того, фармацевтическая композиция, содержащая средство, связывающее склеростин, может быть помещена в контейнеры (например, флаконы или предварительно заполненные шприцы) вместе с упаковочным материалом, который предоставляет инструкции относительно применения таких фармацевтических композиций. Как правило, такие инструкции будут включать в себя реальное выражение, описывающее концентрацию реагента, а также в некоторых вариантах реализации, относительные количества ингредиентов наполнителей или растворителей (например, воды, физиологического раствора или ФСБ), которые могут быть необходимыми для восстановления фармацевтической композиции.

В другом аспекте ингибитор склеростина вводят субъекту местно. В некоторых или любых вариантах реализации ингибитор склеростина (например, антитело или фрагмент антитела к склеростину) вводят в зависимости от заболевания к пораженной области десны, кости или зуба. В связи с этим ингибитор склеростина (например, антитело или фрагмент антитела к склеростину) опционально вводят посредством инъекции непосредственно в ткань десны и/или наносят в периодонтальный карман при помощи, например, шприца, содержащего ингибитор склеростина и соответствующий носитель.

Для аспектов местного введения (как, например, подкожная инъекция ингибитора склеростина непосредственно в пораженную область десны или пораженный периодонтальный карман субъекта), ингибитор склеростина опционально вводят субъекту в количестве от около 0,1 мг до около 20 мг. В некоторых вариантах реализации ингибитор склеростина вводят непосредственно в пораженную область в количестве, составляющем около 0,1 мг, 0,5 мг, 1 мг, 2 мг, 3 мг, 4 мг, 5 мг, 6 мг, 7 мг, 8 мг, 9 мг, 10 мг, 11 мг, 12 мг, 13 мг, 14 мг, 15 мг, 16 мг, 17 мг, 18 мг, 19 или около 20 мг. Дозу вводят в любом интервале времени, например, несколько раз в неделю (например, два или три раза в неделю), один раз в неделю, один раз каждые две недели, один раз каждые три недели или один раз каждые четыре недели. В некоторых или любых вариантах реализации дозу ингибитора склеростина (например, антитела или фрагмента антитела к склеростину) в диапазоне от около 0,1 мг до около 20 мг вводят два раза в неделю. Количество ингибитора опционально вводят в виде раздельной дозы, например, с помощью нескольких инъекций вдоль сегмента пораженной области.

В некоторых или любых вариантах реализации ингибитор склеростина (например, антитело или фрагмент антитела к склеростину) включают в гель, сетку, матрикс или коллагеновую губку, встраивают в зубной имплантат или костный трансплантат, или наносят на имплантат как покрытие. Имплантат может представлять собой повторную имплантацию собственного зуба субъекта (например, потерянного из-за травмы) или протезный имплантат (изготовленный, например, из пластика, керамики, металла или из стволовых клеток, как описано в публикации WO 2004/074464).

Термин "сетка" означает любой материал в любой форме, включая, например, вязаную, плетеную, прессованную, штампованную, трикотажную, тканую, нетканую или другие формы и может включать материал с по существу упорядоченной и/или неупорядоченной структурой. Могут быть использованы примеры нетканых сеток, включая электроспряденные материалы (обзор производства электроспряденного нановолоконного материала см. в публикации Zheng-Ming Huang et al, Composites Science and Technology, 2003, 63:2223-2253). Сетка может быть, без ограничения, сеткой из поперечно сшитых волокон, сеткой из нановолокон, тканевой сеткой, сеткой из биоразлагаемого полимера, или комбинацией любого из вышеперечисленного. Сетка может быть неразлагаемой, разлагаемой или биоразлагаемой. Разлагаемая сетка может представлять собой сетку, которая может разлагаться посредством небиологических средств (например, гидролизом или фотолизом). Биоразлагаемая сетка в различных вариантах реализации представляет собой тип сетки, который может быть разрушен биологической системой посредством действия клеток или пищеварительных ферментов или посредством окисления биомолекулами.

Примеры гелевых композиций для пероральной доставки антител описаны в публикации WO 2010/1004179, раскрытие которой включено в настоящий документ в качестве ссылки. В некоторых вариантах реализации гель представляет собой гидрогель, полученный из высокомолекулярных биосовместимых эластомерных полимеров синтетического или природного происхождения. Желательным свойством, которым должен обладать гидрогель, является способность быстро реагировать на механическое напряжение в организме человека, особенно на сдвиги и нагрузки. Предусматриваются гидрогели, полученные из природных источников, потому что они с большей вероятностью являются биоразлагаемыми и биосовместимыми при применении *in vivo*. Подходящие гидрогели включают природные гидрогели, такие как, например, желатин, коллаген, шелк, эластин, фибрин или полимеры-производные полисахаридов, гель глюкоманнана, гиалуриновая кислота, полисахариды, например, поперечно сшитые карбоксилсодержащие полисахариды или их комбинацию.

Синтетические гидрогели включают, но не ограничиваясь перечисленным, те, что образованы из поливинилового спирта; акриламида, такие как полиакриловая кислота и поли(акрилонитрил-акриловая кислота); полиуретаны; полиэтиленгликоль (например, ПЭГ 3350, ПЭГ 4500, ПЭГ 8000); силикон; по-

лиолефины, такие как полиизобутилен и полиизопропен; сополимеры силикона и полиуретана; неопрен; нитрил; вулканизированную резину; поли(N-винил-2-пирролидон); акрилаты, такие как поли(2- гидроксиэтилметакрилат) и сополимеры акрилатов с N-винилпирролидоном; N-виниллактамы; полиакрилонитрил или их комбинации. Материалы гидрогеля при необходимости могут быть дополнительно поперечно сшиты для придания большей прочности. Примеры различных типов полиуретанов включают термопластичные или терморезистивные полиуретаны, алифатические или ароматические полиуретаны, полиэфируретан, поликарбонатуретан или силиконполиэфируретан или их комбинацию.

В различных вариантах реализации вместо непосредственного примешивания в гель ингибитора склеростина, в геле диспергируют микросферы, нагруженные ингибитором склеростина. В одном из вариантов реализации микросферы обеспечивают замедленное высвобождение ингибитора склеростина. В еще одном варианте реализации гель, являющийся биоразлагаемым, предохраняет микросферы от высвобождения ингибитора склеростина, таким образом, ингибитор склеростина не высвобождается из микросфер, пока они не высвободятся из геля. Например, гель может быть размещен около целевого участка ткани (например, альвеолярного отростка).

Изобретение также предусматривает использование вязких гелей, чтобы ограничить рассредоточение ингибитора склеростина. Гели могут быть размещены, например, в периодонтальном кармане, зубе, альвеолярном отростке или в окружающей ткани десны.

В некоторых или любых вариантах реализации ингибитор склеростина введен в состав паст, балзамов, восков, лосьонов, промывных растворов, сухих порошков с/без объемного наполнителя и различные другие форматы для местного применения, известные в данной области техники. Ингибитор склеростина может также быть доставлен местно в форме распыляемого порошка или раствора или растворов для полоскания. Кроме того, ингибитор склеростина включен в перевязочные материалы, прокладки, марлю или другие средства, которые прикладывают к пораженной области, представляющей интерес (например, пораженной области десны или периодонтальному карману), из которых они передаются в область, представляющую интерес.

Комбинированная терапия

Лечение патологии путем комбинации двух или больше средств, нацеленных на тот же патоген или биохимический путь, иногда приводит к большей эффективности и снижению побочных эффектов по сравнению с применением терапевтически релевантной дозы каждого средства в одиночку. В некоторых случаях эффективность комбинации лекарственных средств является аддитивной (эффективность комбинации примерно равна сумме эффектов каждого лекарственного средства отдельно), но в других случаях эффект может быть синергическим (эффективность комбинации выше, чем сумма эффектов каждого лекарственного средства данного отдельно). Используемый в настоящем документе термин "комбинированная терапия" означает, что два соединения могут быть доставлены совместным образом, например, одновременно или одно из соединений вводят первым, с последующим введением второго средства, например, последовательно. Желаемый результат может быть либо субъективным облегчением одного или больше симптомов или объективно идентифицируемым улучшением у получателя дозы.

В некоторых вариантах реализации ингибитор склеростина (например, антитело или фрагмент антитела к склеростину) вводят в комбинации с использованием материалов, которые поддерживают возобновление роста кости, таких как костный трансплантат, костная мука, костная стружка, деминерализованный костный матрикс, костные каркасы, протез, металлические стабилизаторы или костные каркасные вещества, содержащие один или больше заменителей костного трансплантата на основе полимеров, керамики, цемента и фосфатов кальция. Многие вариации таких материалов известны в данной области техники.

В некоторых или любых вариантах реализации способ или применение, описанное в настоящем документе, включает назначение субъекту принятого стандарта оказания медицинской помощи для лечения периодонтального заболевания перед введением ингибитора склеростина (например, антитела или фрагмента антитела к склеростину). Например, в некоторых вариантах реализации принятый стандарт оказания медицинской помощи для лечения периодонтального заболевания представляет собой лекарственное средство, выбранное из группы, состоящей из Периостата® и химически модифицированного тетрациклина-3 (ХМТ-3). В некоторых вариантах реализации принятый стандарт оказания медицинской помощи включает ирригацию ротовой полости и/или удаление зубного камня и над- и/или под-десневую санацию (например, удаление микробного налета и камней) пораженной области у субъекта. В некоторых вариантах реализации принятый стандарт оказания помощи перед введением ингибитора склеростина включает выполнение ирригации ротовой полости и/или удаление зубного камня и санацию пораженной области в комбинации с назначением Периостата и/или ХМТ-3. В некоторых вариантах реализации способ включает назначение принятого стандарта оказания медицинской помощи одновременно с введением ингибитора склеростина. В других вариантах реализации принятый стандарт оказания медицинской помощи назначают последовательно. Например, принятый стандарт оказания медицинской помощи может быть назначен за 1 день, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 6 недель, 8 недель, 10 недель, 12 недель или больше перед введением ингибитора склеростина субъекту. В предпочтительных вариантах реализации перед введением ингибитора склеростина прогрессирующее

периодонтального заболевания у субъекта замедляется, останавливается или получает обратное развитие.

В некоторых или любых вариантах реализации способ или применение, описанное в настоящем документе, дополнительно включает введение антибиотика, такого как антибиотик, выбранный из группы, состоящей из амоксициллина, тетрациклина гидрохлорида, доксициклина, миноциклина, азитромицина, рокситромицина, моксифлоксацина, ципрофлоксацина и метронидазола. В некоторых вариантах реализации способ или применение включает введение субъекту антибиотика перед введением субъекту ингибитора склеростина. В других вариантах реализации способ или применение включает введение антибиотика субъекту одновременно с введением ингибитора склеростина.

В некоторых вариантах реализации ингибитор склеростина (например, антитело или фрагмент антитела к склеростину) вводят вместе со вторым лекарственным средством для укрепления кости, пригодным для лечения сниженной минеральной плотности костной ткани или костного дефекта. В некоторых вариантах реализации лекарственное средство для укрепления кости выбирают из группы, состоящей из антирезорбтивного лекарственного средства, костеобразующего средства, модулятора эстрогенового рецептора (включая, но не ограничиваясь перечисленным, ралоксифен, базедоксифен и лазофоксифен) и лекарственного средства, обладающего ингибирующим действием на остеокласты. В некоторых вариантах реализации второе средство для укрепления кости выбирают из группы, состоящей из бисфосфоната (включая, но не ограничиваясь перечисленным, алендроната натрия (ФОСАМАКС®), ризедроната, ибандроната натрия (БОНИВА®) и золедроновой кислоты (РЕКЛАСТ®)); эстрогена или аналога эстрогена; антитела к лиганду RANK (RANKL) (например, ПРОЛИА®) или ингибитора RANKL; витамина D, или производного витамина D или его имитатора; источника кальция, Тиболона, кальцитонина, кальцитриола и гормональной заместительной терапии. В некоторых вариантах реализации второе средство для укрепления кости включает, но не ограничиваясь перечисленным, паратиреоидный гормон (ПТГ) или его пептидный фрагмент, ПТГ-связанный белок (ПТГсб), костный морфогенетический белок, остеогенин, NaF, агонист ПГЕ₂, статин, ранелат стронция, ингибитор или антитело к DKK1. В некоторых вариантах реализации второе средство для укрепления кости представляет собой Фортео® (терипаратид), Претакт® или Протелос®.

В различных вариантах реализации план лечения периодонтального заболевания после завершения активного лечения ингибитором склеростина включает проведение регулярной последующей поддерживающей терапии. В некоторых вариантах реализации способ или виды применения, описанные в настоящем документе, опционально включают выполнение последующей поддерживающей терапии, выбранной из группы, состоящей из механической санации, усиления гигиены полости рта (например, регулярные профессиональные чистки (т.е. каждые 6 месяцев), ежедневная чистка зубной щеткой и зубной нитью) и введение антибиотиков.

В некоторых вариантах реализации комбинированная терапия с применением ингибитора склеростина, описанного в настоящем документе, может предварять или следовать после введения дополнительного лекарственного средства (средств) (например, антибиотика или второго средства для укрепления кости) в интервалах в диапазоне от минут до недель. Например, отдельные модальности вводят в пределах около 24 ч друг от друга, например, в пределах около 6-12 ч друг от друга, или в пределах около 1-2 ч друг от друга, или в пределах около от 10 до 30 мин друг от друга. В некоторых ситуациях может быть желательным существенно продлить период времени лечения, с промежутком от нескольких дней (2, 3, 4, 5, 6 или 7 дней) до нескольких недель (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 недель) между соответствующими введениями различных модальностей. Конкретно предусматриваются повторные курсы лечения одним или обоими средствами / видами терапии комбинированной терапии.

Поддерживающая схема лечения

Также предусматривается использование второго средства для укрепления кости и/или ингибитора склеростина в поддерживающей схеме, например, для предотвращения или замедления потери одного или больше из следующих параметров альвеолярного отростка: минеральная плотность костной ткани, высота альвеолярного отростка, масса альвеолярного отростка, объем альвеолярного отростка и содержание минералов в альвеолярном отростке. В связи с этим способ или применение, описанное в настоящем документе, опционально включает введение одного или больше количеств второго средства для укрепления кости, эффективного для поддержания минеральной плотности костной ткани, высоты альвеолярного отростка, массы альвеолярного отростка, объема альвеолярного отростка и содержания минералов в альвеолярном отростке в течение поддерживающего периода, составляющего от около 1 недели до около 5 лет после окончания периода лечения антителом к склеростину. Например, в некоторых вариантах реализации способ или применение, описанное в настоящем документе, включает введение второго средства для укрепления кости субъекту в течение поддерживающего периода, составляющего по меньшей мере около 1 недели, 2 недель, 3 недель, 4 недель, 5 недель, 6 недель, 7 недель, 8 недель, 9 недель, 10 недель, 11 недель, 12 недель, 3 месяцев, 13 недель, 14 недель, 15 недель, 16 недель, 4 месяцев, 17 недель, 18 недель, 19 недель, 20 недель, 5 месяцев, 21 недели, 22 недель, 23 недель, 24 недель, 6 месяцев, 25 недель, 26 недель, 27 недель, 28 недель, 7 месяцев, 29 недель, 30 недель, 31 недели или дольше (например, 8 месяцев, 9 месяцев, 10 месяцев, 11 месяцев, 1 год, 15 месяцев, 18 месяцев, 2 года, 3 года, 4 года, 5 лет или

дольше (например, на протяжении всей продолжительности жизни субъекта). В некоторых вариантах реализации поддерживающий период составляет около 6-12 недель. В некоторых вариантах реализации поддерживающий период составляет около 4-12 недель или около 1-3 месяцев. В некоторых вариантах реализации поддерживающий период составляет около 12-20 недель или около 3-5 месяцев. В некоторых вариантах реализации поддерживающий период составляет около 20-32 недель или около 5-8 месяцев. В некоторых вариантах реализации поддерживающий период составляет около 24-36 недель или около 6-9 месяцев. В некоторых вариантах реализации поддерживающий период составляет около 1 года, около 2 лет, около 3 лет, около 4 лет, около 5 лет или дольше. "Поддержание" альвеолярного отростка включает поддержание уровней параметров альвеолярного отростка аналогичных тем, которые испытывает субъект, получавший лечение ингибитором склеростина.

Подобным образом, способ или применение, описанное в настоящем документе, опционально включает введение позднее одного или больше количеств ингибитора склеростина, эффективных для минеральной плотности костной ткани, высоты альвеолярного отростка, массы альвеолярного отростка, объема альвеолярного отростка и содержания минералов в альвеолярном отростке в течение поддерживающего периода, составляющего по меньшей мере около 1 недели, 2 недель, 3 недель, 4 недель, 5 недель, 6 недель, 7 недель, 8 недель, 9 недель, 10 недель, 11 недель, 12 недель, 3 месяцев, 13 недель, 14 недель, 15 недель, 16 недель, 4 месяцев, 17 недель, 18 недель, 19 недель, 20 недель, 5 месяцев, 21 недель, 22 недель, 23 недель, 24 недель, 6 месяцев, 1 года, 2 лет, 3 лет, 4 лет, 5 лет или дольше (например, на протяжении всей продолжительности жизни субъекта) после окончания периода лечения. В некоторых вариантах реализации поддерживающий период составляет около 6-12 недель. В некоторых вариантах реализации поддерживающий период составляет около 4-12 недель или около 1-3 месяцев. В некоторых вариантах реализации поддерживающий период составляет около 12-20 недель или около 3-5 месяцев. В некоторых вариантах реализации поддерживающий период составляет около 20-32 недель или около 5-8 месяцев. В некоторых вариантах реализации поддерживающий период составляет около 24-36 недель или около 6-9 месяцев. В некоторых вариантах реализации поддерживающий период составляет около 1 года, около 2 лет, около 3 лет, около 4 лет, около 5 лет или дольше.

Наборы

Фармацевтическая композиция, содержащая ингибитор склеростина (например, антитело или фрагмент антитела к склеростину) может быть помещена в контейнеры (например, флаконы или шприцы), вместе с упаковочным материалом, который предоставляет инструкции относительно применения таких фармацевтических композиций. Как правило, такие инструкции будут включать в себя реальное выражение, описывающее концентрацию ингибитора склеростина, а также в некоторых вариантах реализации, относительные количества ингредиентов наполнителей или растворителей (например, воды, солевого раствора или ФСБ), которые могут быть необходимыми для восстановления фармацевтической композиции.

Настоящее изобретение дополнительно описано в следующих примерах. Следующие примеры служат только для иллюстрации изобретения и не предназначены для ограничения объема изобретения каким-либо образом.

Примеры

Пример 1.

Этот пример описывает различные анализы нейтрализации на основе клеток, пригодные для определения характеристик активности нейтрализации антитела к склеростину.

Анализ минерализации на основе клеток.

МС3Т3-Аскорбиновую кислоту и В-глицерофосфат используют для индуцирования дифференцировки клеток МС3Т3-Е1-ВФ, приводящей к отложению минералов. Типичный протокол скрининга в 96-луночном формате включает высевание клеток на 1 день, с последующей сменой среды семь раз в течение 12-дневного периода, при этом большая часть отложения минералов происходит в последние восемнадцать часов. Конкретное распределение по времени и степень осаждения минералов может изменяться в зависимости, частично, от конкретного используемого номера партии сыворотки. Контрольные эксперименты позволяют учитывать такие переменные, как это хорошо известно в области экспериментов с культурами клеток вообще. Для статистического анализа (с использованием программ MS Excel и JMP) может быть использован однофакторный анализ ANOVA с последующим сравнением по методу Даннетта для определения различий между группами. Средние значения в группе для каждого набора данных считаются значимо различными, когда значение Р составляет меньше 0,05 ($P < 0,05$).

Клеточную культуру для роста клеток МС3Т3-Е1-ВФ культивируют следующим образом. Клеточную культуру культивируют при 37°C и 5% CO₂. Для целей скрининга на антитела, нейтрализующие склеростин, может быть создан банк клеток. Один флакон замороженных клеток МС3Т3-Е1-ВФ размораживают при встряхивании на водяной бане при температуре 37°C. Размороженные клетки помещают в 10 мл культуральной среды (альфа-МЕМ/10%ФСБ/ПенСтрепГлю) в 50 мл пробирку и осторожно центрифугируют в течение 5 мин. Затем клетки ресуспендируют в 4 мл среды альфа-МЕМ/10%ФСБ/ПенСтрепГлю. После определения количества клеток с использованием трипанового синего и гематиметра

высевают 1×10^6 клеток в 50 мл среды альфа-МЕМ/10%ФБС/ПенСтрепГлю в одну колбу T175.

После слияния этого пассажа (около через 7 дней), клетки трипсинизируют трипсином/ЭДТА (0,05% трипсин; 0,53 мМ ЭДТА), осторожно центрифугируют в течение 5 мин, а затем ресуспендируют в 5 мл среды альфа-МЕМ/10%ФБС/ПенСтрепГлю. После определения количества клеток с использованием трипанового синего и гемацитометра клетки высевают по 1×10^6 клеток в 50 мл среды альфа-МЕМ/10%ФБС/ПенСтрепГлю на одну колбу T175. Количество используемых в этот момент для посева колб T175 зависит от общего числа доступных клеток и желаемого количества колб, которые должны быть далее отобраны для следующего пассажа.

После слияния этого пассажа (около 3-4 дней), клетки трипсинизируют трипсином/ЭДТА (0,05% трипсин; 0,53 мМ ЭДТА), осторожно центрифугируют в течение 5 мин, а затем ресуспендируют в 5 мл среды альфа-МЕМ/10%ФБС/ПенСтрепГлю. После определения количества клеток с использованием трипанового синего и гемацитометра, клетки высевают по 1×10^6 клеток в 50 мл среды альфа-МЕМ/10%ФБС/ПенСтрепГлю на одну колбу T175. Количество используемых в этот момент для посева колб T175 зависит от общего числа доступных клеток и желаемого количества колб, которые должны быть далее отобраны для следующего пассажа.

После слияния этого пассажа (около 3-4 дней), клетки трипсинизируют трипсином/ЭДТА (0,05% трипсин; 0,53 мМ ЭДТА), осторожно центрифугируют в течение 5 мин, а затем ресуспендируют в 5 мл среды альфа-МЕМ/10%ФБС/ПенСтрепГлю. После определения количества клеток с использованием трипанового синего и гемацитометра, клетки высевают по 1×10^6 клеток в 50 мл среды альфа-МЕМ/10%ФБС/ПенСтрепГлю на одну колбу T175. Количество используемых в этот момент для посева колб T175 зависит от общего числа доступных клеток и желаемого количества колб, которые должны быть далее отобраны для следующего пассажа. Избыток клеток замораживают по $1-2 \times 10^6$ живых клеток/мл в 90%ФБС/10%ДМСО.

После слияния этого пассажа (около 3-4 дней), клетки трипсинизируют трипсином/ЭДТА (0,05% трипсин; 0,53 мМ ЭДТА), осторожно центрифугируют в течение 5 мин, а затем ресуспендируют в 5 мл среды альфа-МЕМ/10%ФБС/ПенСтрепГлю. После определения количества клеток с использованием трипанового синего и гемацитометра, клетки замораживают по $1-2 \times 10^6$ живых клеток/мл в 90%ФБС/10%ДМСО. Этот "заключительный пассаж" замороженных клеток является пассажем, используемым для скринингового анализа.

Клеточную культуру для минерализации клеток MC3T3-E1-BF культивируют следующим образом. Клеточную культуру культивируют при 37°C и 5% CO_2 . Желательно минимизировать колебания температуры и % CO_2 во время процедуры минерализации клеточной культуры. Соответствующее количество флаконов "заключительного пассажа", приготовленных как описано выше, размораживают при встряхивании на водяной бане при температуре 37°C . Размороженные клетки помещают в 10 мл культуральной среды (альфа-МЕМ/10%ФБС/ПенСтрепГлю) в 50 мл пробирку и осторожно центрифугируют в течение 5 мин. Затем клетки ресуспендируют в 4 мл среды альфа-МЕМ/10%ФБС/ПенСтрепГлю. После определения количества клеток с использованием трипанового синего и гемацитометра, по 2500 клеток высевают в 200 мкл культуральной среды на лунку на покрытые коллагеном I 96-луночные планшеты (Becton Dickinson Labware, номер по каталогу 354407).

Пример процедуры культивирования клеток является следующим. Стартовым днем недели для посева клеток указана среда. Если в качестве стартового дня для посева клеток используют другой день недели, то этот день запустит ежедневное расписание удаления и добавления среды в течение всего процесса, указанного ниже. Например, если клетки высевают во вторник, культуральную среду не следует удалять и добавлять ни в первую пятницу и субботу, ни во вторую пятницу и субботу. С началом во вторник, планшеты будут подготовлены для анализа кальция в последнее воскресенье. Клетки высевают в среду по 2500 клеток на 200 мкл культуральной среды. В четверг всю культуральную среду удаляют и добавляют 200 мкл дифференцировочной среды. В пятницу удаляют 100 мкл среды и добавляют 100 мкл свежей дифференцировочной среды. В понедельник удаляют 100 мкл среды и добавляют 100 мкл свежей дифференцировочной среды. Во вторник удаляют 100 мкл среды и добавляют 100 мкл свежей дифференцировочной среды. В среду удаляют 100 мкл среды и добавляют 100 мкл свежей дифференцировочной среды. В четверг удаляют 100 мкл среды и добавляют 100 мкл свежей дифференцировочной среды. В пятницу удаляют 100 мкл среды и добавляют 100 мкл свежей дифференцировочной среды. В следующий понедельник планшеты готовят для анализа кальция следующим образом: планшеты промывают один раз 10 мМ Трис, HCl pH 7-8. Работая под вытяжкой, добавляют по 200 мкл 0,5н. HCl на лунку. Затем планшеты замораживают при температуре -80°C . Непосредственно перед измерением кальция, планшеты дважды подвергают замораживанию-оттаиванию, а затем используют растирание с помощью многоканальной пипетки для диспергирования содержимого планшета. Содержимому планшета предоставляют возможность осаждения при температуре 4°C в течение 30 мин, и в этот момент соответствующее количество супернатанта удаляют для измерения уровня кальция с использованием коммерчески доступного набора для анализа кальция. Типичный и неограничивающий набор представляет собой Calcium (CPC) Liquidcolor, номер по каталогу 0150-250, Stanbio Laboratory, Берне, Техас.

В этом анализе на основе клеток, склеростин ингибирует одну или больше последовательностей событий, приведших к и включающих осаждение минералов (т.е. склеростин ингибирует минерализацию). Таким образом, в тех экспериментах, где склеростин введен в конкретную клеточную культуру эксперимента, рекомбинантный склеростин добавляют к среде, начиная в первый четверг и после этого каждый день подпитки. В случаях, когда антитело к склеростину исследуют на способность нейтрализовать склеростин, т.е. предоставляют возможность минерализации, нейтрализуя способность склеростина ингибировать минерализацию, антитело добавляют в культуральную среду, начиная в первый четверг и после этого каждый день подпитки. Антитело предварительно инкубируют с рекомбинантным склеростин в дифференцировочной среде в течение 45-60 мин при температуре 37°C, а затем эту среду используют для подпитки клеток.

Выше описан 12-дневный протокол минерализации для клеток MC3T3-E1-BF. Минерализация исходных клеток MC3T3-E1 ингибируется рекомбинантным склеростин и это ингибирование блокируется с помощью нейтрализующего антитела к склеростину, например, антитела к склеростину, содержащего CDR SEQ ID NO: 245-247 и 78-80. Анализ нейтрализации на основе клеток дополнительно описан в публикации патента США №7592429, например, в примере 8 (включенном в настоящий документ посредством ссылки для описания анализов нейтрализации на основе клеток).

Анализ специфической костной щелочной фосфатазы.

Типичный анализ специфической костной щелочной фосфатазы описан в международной патентной публикации №. WO 2008/115732 и патенте США №7744874 (включенных в настоящий документ посредством ссылки для описания анализов нейтрализации на основе клеток). Иллюстративный протокол является следующим. Клетки C2C12 (ATCC, CRL 1772) высевают по 3000-5000 клеток/лунку в 96-луночный планшет с тканевой культурой в среде MEM с добавлением 5% фетальной телячьей сыворотки. Планшет инкубируют при температуре 37°C в 5% CO₂ в течение ночи. Антитело разводят в 0,5X Wnt3a-кондиционированной среды (приготовленной так, как описано в WO 2008/115732) до различных конечных концентраций. Удаляют среду из посеянных клеток и добавляют предварительно смешанный раствор антитело-BMP4-склеростин (человека или яванских макак) (150 мкл), обеспечивая окончательную концентрацию антитела от 30 мкг/мл до 0,5 мкг/мл, окончательную концентрацию BMP-4 25 нг/мл, окончательную концентрацию белка склеростина 1,0 мкг/мл, а концентрация кондиционированной среды составляет 0,5X. Затем планшет инкубируют при температуре 37°C в 5% CO₂ в течение 72 ч. Удаляют среду из клеток, которые промывают один раз ФСБ и подвергают трехкратному замораживанию-оттаиванию попеременно в диапазоне температур -80°C и 37°C. Активность щелочной фосфатазы измеряют посредством добавления субстрата щелочной фосфатазы (1-step PNPP, Pierce #37621) (150 мкл/лунку). Планшет с клетками инкубируют в течение 60 мин при комнатной температуре, после чего измеряют оптическую плотность (ОП) при 405 нм, чтобы определить активность щелочной фосфатазы. Расчеты IC₅₀ могут быть проведены с использованием, например, программного обеспечения SigmaPlot Regression Wizard с приближением результатов 4-параметрической сигма-кривой.

Анализ минерализации, индуцированной BMP2 в клетках MC3T3.

Иллюстративный анализ минерализации, индуцированной BMP2 в клетках MC3T3, описан в международной патентной публикации №WO 2009/047356 (включенной в настоящий документ посредством ссылки для описания анализов нейтрализации на основе клеток). Коротко, MC3T3b1b клетки высевают в 96-луночные планшеты (например, по 6×10³ клеток/лунку или по 2×10³ клеток/лунку) в 100 мкл культуральной среды анализа (поддерживающая культуральная среда без G418) и инкубируют в течение трех дней, чтобы достичь слияния. Культуральную среду анализа заменяют и добавляют тестируемые соединения с 10 мМ β-глицерофосфата и 50 мкМ аскорбиновой кислоты. Перед добавлением к клеткам, склеростин и кандидатуру антитела предварительно инкубируют на отдельном планшете в течение двух часов при комнатной температуре. Для анализа в 96-луночные планшеты перед внесением смеси склеростин-антитело вносят 2,1 или 2,8 нМ BMP-2 (R&D Systems, номер по каталогу 355-BM-010). Клетки инкубируют в течение 14 дней. По окончании инкубации клетки промывают два раза 200 мкл ФСБ/лунку, добавляют в каждую лунку 50 мкл 0,5 М HCl и замораживают планшеты при температуре -20°C в течение минимум 24 ч. Для тестирования планшеты размораживают при комнатной температуре в течение 2 ч. Десять 10 мкл из каждой лунки переносят в новый планшет и подвергают воздействию рабочего раствора кальция (1:5) (200 мкл). После 5-30 минутного периода инкубации измеряют оптическую плотность при 595 нм на ридере микропланшетов. Оптическую плотность переводят в мкг кальция согласно стандартной кривой, позволяя определить степени минерализации, индуцированной BMP-2.

Анализ wnt сигналинга на основе клеток.

Иллюстративный анализ сигналинга на основе клеток, с применением репортерного белка super top flash (STF) описан в международной патентной публикации №. WO 2009/047356. Клетки линии HEK293 трансфецируют pcDNA3+ (480 нг); SuperTopFlash (STF) (20 нг); и phRL-CMV (0,5 нг) для контрольных лунок и pcDNA-wnt1 (20 нг); pcDNA3+ (460 нг); SuperTopFlash (STF) (20 нг); и phRL-CMV (0,5 нг) для лунок обработки Wnt1. Плазмиды смешивают с 1,6 мкл липофектамина 2000, разбавленного в 50 мкл OptiMEM® и инкубируют в течение 30 мин при комнатной температуре перед нанесением на клетки.

После нанесения, клетки инкубируют при температуре 37°C в 5% CO₂ в течение пяти часов.

Антитела предварительно смешивают с SOST, чтобы создать серию разведений. Подготавливают один мл среды для каждого разведения и добавляют 450 мкл в каждую лунку после удаления смеси трансфекции. Клетки инкубируют со смесями антитело-SOST в течение 18-20 ч. По окончании инкубации среду удаляют и для лизирования клеток добавляют 300 мкл 1X пассивного буфера для лизиса (Promega, номер по каталогу E194A). Затем в двух повторениях измеряют активность люциферазы с помощью системы Dual-Glo Luciferase System (Promega, номер по каталогу E2940) с 30 мкл лизатов. Как правило, используют 30мкл субстратов для люциферазы Dual-Glo (люциферазы светляков, для STF) и 30мкл Dual-Glo Stop и Glo (люциферазы Renilla; для контроля эффективности трансфекции). Люминесцентные сигналы измеряют с помощью инструмента Mithras LB940 (Berthold Technologies). Рассчитывают соотношение люциферазы светлячка и Renilla. Окончательные результаты выражают посредством установки значения Wntl без SOST как 1. Дополнительные детали анализа приведены в международной патентной публикации №WO 2009/047356.

Пример 2.

Следующий пример иллюстрирует способность ингибитора склеростина, а именно моноклонального антитела к склеростину (Scl-Ab) увеличивать восстановление альвеолярного отростка в крысиной модели периодонтального заболевания.

Крысиная модель периодонтита: экспериментальное периодонтальное заболевание у крыс индуцируют с помощью размещения лигатуры, как описано ранее (публикации Jin Q, et al., 2007. J Periodontol 78:1300-1308; Graves, DT, et al., 2008. J Clin Periodontol 35:89-105; раскрытия которых включены в настоящий документ в качестве ссылки во всей их полноте). Коротко, самцам крыс Sprague Dawley (масса тела около 300-350 г, Harlan Laboratory, IN) проводят анестезию кетаминном и ксилазином (соотношение 83/17). Затем закрепляют хлопковую нить (3,0) вокруг цервикальной части (чуть выше десны) моляров на одной стороне верхней челюсти, чтобы обеспечить нормальное жевание. Лигатуры оценивают три раза в неделю, аккуратно перемещают апикально в десневую борозду для обеспечения положения под десной и при необходимости заменяют.

Сканирование и анализ при помощи микрокомпьютерной томографии (микро КТ): крыс умерщвляют в установленных временных точках. Верхние челюсти иссекают и помещают в 10% нейтральный забуференный формалин на период 48-72 ч. Фиксированные, не деминерализованные верхние челюсти крыс сканируют в 70% этиловом спирте конусно-лучевой системой микроКТ (GE Healthcare BioSciences). Линейные и объемные анализы основаны на разработанном ранее способе (Park CH, et al., 2007. J Periodontol 78:273-281). Коротко, каждый образец верхней челюсти сканируют и реконструируют в вокселях 18×18×18 мкм с помощью микро КТ системы. Средство объемного трехмерного (3-D) просмотра и программное обеспечение для анализатора (Microview Analysis, GE Healthcare) используют в качестве инструмента как для 3-D и 2-D визуализации, так и для квантификации. Вертикальную, линейную потерю костной массы определяют путем измерения расстояния от цементно-эмалевой границы (ЦЭГ) до гребня альвеолярного отростка (ГАО) второго моляра верхней челюсти. С точки зрения объемного анализа, наиболее медиальный корень первого моляра (м-М1), наиболее дистальный корень третьего моляра (д-М3), высшую точку разделения корней зуба и верхушку зуба М1-М3 используют в качестве воспроизводимых ориентиров для оценки альвеолярного отростка верхней челюсти. Двухмерные области, представляющие интерес (ОПИ) чертят через равные интервалы (в среднем, восемь срезов данных) со стороны коронки и реконструируют как 3-D структуры, чтобы квантифицировать объемные параметры, долю объема костной ткани (ДОКТ) и минеральную плотность костной ткани (МПКТ; мг/см³).

Статистический анализ.

Для выполнения статистического анализа используют программное обеспечение GraphPad Prism (V.5.01). Различия между группами для линейных и объемных измерений кости статистически оценивают с помощью однофакторного анализа вариаций (ANOVA) с последующим многократным сравнением с помощью теста Тьюки. Данные регистрируют как среднее± СО, и уровень значимости устанавливают как P ≤ 0,05.

Дизайн исследования. Самцы крыс Sprague-Dawley (SD) в возрасте от десяти до двенадцати недель испытывают экспериментальный периодонтит, индуцированный размещением лигатуры, как описано выше. В одном из способов исследования, за три дня до размещения лигатуры, животным (n = 10/группу) один раз подкожно вводят или носитель в виде физиологического раствора или Scl-Ab (уровень дозы составляет 25 мг/кг). Сразу после размещения лигатуры, лигированным животным или их нормальным интактным контролям вводят или носитель в виде физиологического раствора или Scl-Ab. Как дозу Scl-Ab (уровень дозы составляет 25 мг/кг), так и контрольный носитель вводят посредством подкожной инъекции два раза в неделю. Некропсию выполняют через две недели и четыре недели после индуцирования заболевания, соответственно.

В другом способе исследования, через четыре недели после индуцированного наложением лигатуры экспериментального периодонтита, лечение начинают немедленно после удаления лигатуры. Животным (n=10/группу) с экспериментальным периодонтитом или их нормальным интактным контролям вво-

дят при помощи подкожной инъекции два раза в неделю или носитель в виде физиологического раствора или Scl-Ab (уровень дозы составляет 25 мг/кг). Лечение продолжается в течение трех недель или шести недель после прекращения индуцирования заболевания, при этом общая продолжительность периода исследования длится семь или десять недель. Измерения массы тела проводят еженедельно перед введением Scl-Ab до окончания исследования. Некropsии выполняют через семь недель и десять недель после индуцирования заболевания, соответственно. Собирают цельную кровь (для сывороточного анализа), верхнечелюстные кости и бедренные кости. Исследование было одобрено комитетом по содержанию и использованию животных Мичиганского университета.

Результаты.

Альвеолярный отросток верхней челюсти: микро КТ измерения поддерживающего объема и плотности альвеолярного отростка представлены на фиг. 2 и 3. В способе исследования, в котором лигатуру размещают на протяжении всего исследования (две недели и четыре недели), системное введение Scl-Ab в группе нормальных интактных животных приводит в результате к статистически значимому увеличению как доли объема костной ткани (ДОКТ), так и минеральной плотности костной ткани (МПКТ) на второй и четвертой неделе после начала лечения по сравнению с нормальными интактными животными, получающими инъекции носителя. Кроме того, во временных точках две и четыре недели, группы с периодонтальным заболеванием, индуцированным наложением лигатуры, получающие системные инъекции Scl-Ab продемонстрировали повышенные значения ДОКТ и МПКТ (хотя и не статистически значимые) по сравнению с группой, получавшей инъекции носителя (фиг. 2А и 2В).

В способе исследования, в котором лигатуру удаляют через четыре недели после размещения и непосредственно перед началом лечения, было продемонстрировано статистически значимое снижение как ДОКТ, так и МПКТ в течение фазы индуцирования болезни в экспериментальных группах с периодонтитом по сравнению с группами нормальных интактных животных. В течение трех недель после прекращения индуцирования заболевания, ДОКТ и МПКТ в группе лечения транспортным средством восстановились, а затем стабилизировались до конца исследования. Лигированные животные, получавшие после индуцирования экспериментального периодонтита лечение Scl-Ab, продемонстрировали улучшение восстановления кости (т.е. большие значения объема и плотности костей) в течение шестинедельной фазы лечения по сравнению с группами животных, получавших инъекции носителя. Самое главное, что после шести недель лечения, ДОКТ и МПКТ были статистически выше у животных, пролеченных Scl-Ab, чем в группе животных, получавших носитель. Кроме того, в конце 10-недельного исследования не было обнаружено никаких статистических различий в доле объема костной ткани и плотности костной ткани между больными животными, пролеченными Scl-Ab и нормальными интактными животными, получавшими носитель, указывая, что применение Scl-Ab после перенесенного периодонтального заболевания может содействовать регенерации альвеолярного отростка до здоровых нормальных уровней.

Линейное измерение кости: высоту альвеолярного отростка измеряют от гребня альвеолярного отростка до цементно-эмалевой границы второго моляра посредством оценивания с помощью микро КТ (Фиг. 4). В способе исследования, в котором лигатуру удаляют через четыре недели после размещения и непосредственно перед началом лечения, введение scl-Ab демонстрирует некоторое влияние на линейное восстановление кости (т.е. увеличение высоты альвеолярного отростка). После трех недель лечения не наблюдалось статистической значимости линейного измерения кости между группами лечения Scl-Ab и носителем на участке у лигированного второго моляра. Тем не менее, в точке времени через шесть недель после лечения, применение Scl-Ab продемонстрировало увеличение линейного восстановления костей - со статистически значимой разницей, очевидной между группами лечения Scl-Ab и группами применения носителя на участке у лигированного второго моляра. (Фиг. 4А-4С).

Системное введение Scl-Ab в течение шести недель после индуцирования экспериментального периодонтита приводит в результате к статистически большим значениям ДОКТ и МПКТ по сравнению с лечением носителем, а также статистически схожим с нормальной интактной группой показателям измерений кости. Таким образом, системное введение Scl-Ab способствует регенерации альвеолярного отростка, как это определено ДОКТ и МПКТ. Scl-Ab как терапевтическое средство может быть перспективным в отношении увеличения и/или ускорения регенерации костей ротовой полости.

В то время, как настоящее изобретение было описано с акцентом на предпочтительные варианты реализации, специалистам с обычной квалификацией в данной области техники должно быть очевидно, что могут быть использованы варианты предпочтительных соединений и способов и что подразумевается, что изобретение может быть осуществлено на практике иначе, чем конкретно описано в настоящем документе. Соответственно, настоящее изобретение включает все модификации, охватываемые в пределах сущности и объема изобретения, как определено прилагаемой формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ увеличения высоты альвеолярного отростка у субъекта, страдающего потерей костной массы альвеолярного отростка, включающий введение субъекту антитела к склеростину в количестве, эффективном для уменьшения расстояния между цементно-эмалевой границей и гребнем альвеолярного

отростка, в дозе от 70 до 210 мг в неделю, и где антитело к склеростину содержит CDR-H1 SEQ ID NO:245, CDR-H2 SEQ ID NO:246, CDR-H3 SEQ ID NO:247, CDR-L1 SEQ ID NO:78, CDR-L2 SEQ ID NO:79 и CDR-L3 SEQ ID NO:80.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что расстояние между цементно-эмалевой границей и гребнем альвеолярного отростка через шесть недель после начала лечения уменьшается по меньшей мере на 10% по сравнению с расстоянием до начала лечения.

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что высота альвеолярного отростка через шесть недель после начала лечения увеличивается по меньшей мере на 10% по сравнению с высотой альвеолярного отростка до начала лечения.

4. Способ по п.1, отличающийся тем, что высота альвеолярного отростка субъекта через шесть недель после начала лечения увеличивается по меньшей мере на 1 мм по сравнению с высотой альвеолярного отростка перед лечением.

5. Способ по п.1, отличающийся тем, что плотность костной ткани альвеолярного отростка субъекта через шесть недель после начала лечения увеличивается по меньшей мере на 10% по сравнению с плотностью костной ткани альвеолярного отростка перед лечением.

6. Способ по п.1, отличающийся тем, что доля объема костной ткани альвеолярного отростка через шесть недель после начала лечения увеличивается по меньшей мере на 10% по сравнению с долей объема костной ткани перед лечением.

7. Способ по п.1, отличающийся тем, что антитело к склеростину вводят два раза в неделю.

8. Способ по п.1, отличающийся тем, что антитело к склеростину вводят местно в пораженную область десны или пораженный периодонтальный карман субъекта.

9. Способ по любому из пп.1-8, отличающийся тем, что способ включает введение Периостата® или химически модифицированного тетрациклина-3 (ХМТ-3) перед введением антитела к склеростину.

10. Способ по любому из пп.1-9, дополнительно включающий введение второго лекарственного средства для укрепления кости, выбранного из группы, состоящей из паратиреоидного гормона, терипаратида, бисфосфоната, антитела к RANKL и антитела к DKK-1.

11. Способ по п.10, отличающийся тем, что второе лекарственное средство для укрепления кости вводят после окончания периода лечения антителом к склеростину.

12. Способ по п.1, опционально включающий введение антитела к склеростину в течение второго периода времени в количестве, достаточном для поддержания альвеолярного отростка.

13. Способ по любому из пп.1-12, отличающийся тем, что антитело к склеростину представляет собой иммуноглобулин, содержащий тяжелую цепь и легкую цепь.

14. Способ по любому из пп.1-13, отличающийся тем, что антитело к склеростину представляет собой антитело или его фрагмент, демонстрирующий связывающую аффинность в отношении склеростина SEQ ID NO: 1, меньшую чем или равную 1×10^{-9} M.

15. Способ по п.1, отличающийся тем, что антитело к склеростину содержит тяжелые цепи, содержащие SEQ ID NO: 378, и легкие цепи, содержащие SEQ ID NO 376.

Описание последовательности	Последовательность
Ab-A и Ab-1 CDR-L1	QSSQSVYDNNWLA (SEQ ID NO: 54)
Ab-A и Ab-1 CDR-L2	DASDLAS (SEQ ID NO: 55)
Ab-A и Ab-1 CDR-L3	QGAYNDVIYA (SEQ ID NO: 56)
Ab-A и Ab-1 CDR-H1	SYWMN (SEQ ID NO: 51)
Ab-A и Ab-1 CDR-H2	TIDSGGRTDYASWAKG (SEQ ID NO: 52)
Ab-A и Ab-1 CDR-H3	NWNL (SEQ ID NO: 53)
Ab-A легкая цепь	SEQ ID NO: 23
Ab-A тяжелая цепь	SEQ ID NO: 27
Ab-1 переменная область легкой цепи (с сигнальной последовательностью)	SEQ ID NO: 75
Ab-1 переменная область тяжелой цепи (с сигнальной последовательностью)	SEQ ID NO: 77
Ab-B CDR-L1	SASSSVSFVD (SEQ ID NO: 60)
Ab-B CDR-L2	RTSNLGF (SEQ ID NO: 61)
Ab-B CDR-L3	QQRSTYPPT (SEQ ID NO: 62)
Ab-B CDR-H1	TSGMGVG (SEQ ID NO: 57)
Ab-B CDR-H2	HIWWDDVKRYNPVLKS (SEQ ID NO: 58)
Ab-B CDR-H3	EDFDYDEEYYAMDY (SEQ ID NO: 59)
Ab-B легкая цепь	SEQ ID NO: 31
Ab-B тяжелая цепь	SEQ ID NO: 35
Ab-C CDR-L1	KASQSDYDGDSYMN (SEQ ID NO: 48)
Ab-C CDR-L2	AASNLES (SEQ ID NO: 49)
Ab-C CDR-L3	QQSNEDPWT (SEQ ID NO: 50)
Ab-C CDR-H1	DCYMN (SEQ ID NO: 45)
Ab-C CDR-H2	DINPFNGGTTYNQKFKG (SEQ ID NO: 46)
Ab-C CDR-H3	SHYYFDGRVPWDAMDY (SEQ ID NO: 47)
Ab-C легкая цепь	SEQ ID NO: 15
Ab-C тяжелая цепь	SEQ ID NO: 19
Ab-D CDR-L1	QASQGTSINLN (SEQ ID NO: 42)
Ab-D CDR-L2	GSSNLED (SEQ ID NO: 43)
Ab-D CDR-L3	LQHSYLPYT (SEQ ID NO: 44)
Ab-D CDR-H1	DHYMS (SEQ ID NO: 39)
Ab-D CDR-H2	DINPYSGETTYNQKFKG (SEQ ID NO: 40)
Ab-D CDR-H3	DDYDASPFAY (SEQ ID NO: 41)
Ab-D легкая цепь	SEQ ID NO: 7
Ab-D тяжелая цепь	SEQ ID NO: 11
Ab-2 CDR-L1	RASSSVYYMH (SEQ ID NO: 275)
Ab-2 CDR-L2	ATSNLAS (SEQ ID NO: 276)
Ab-2 CDR-L3	QQWSSDPLT (SEQ ID NO: 277)
Ab-2 CDR-H1	DYFIH (SEQ ID NO: 287)
Ab-2 CDR-H2	RLDPEDGESDYAPKFQD (SEQ ID NO: 288)
Ab-2 CDR-H3	EDYDGTYYFFPY (SEQ ID NO: 289)
Ab-2 легкая цепь	SEQ ID NO: 117
Ab-2 тяжелая цепь	SEQ ID NO: 121
Ab-3 и Ab-15 CDR-L1	SVSSTISSNHLH (SEQ ID NO: 278)
Ab-3 и Ab-15 CDR-L2	GTSNLAS (SEQ ID NO: 279)
Ab-3 и Ab-15 CDR-L3	QQWSSYPLT (SEQ ID NO: 280)
Ab-3 и Ab-15 CDR-H1	DFYLH (SEQ ID NO: 290)

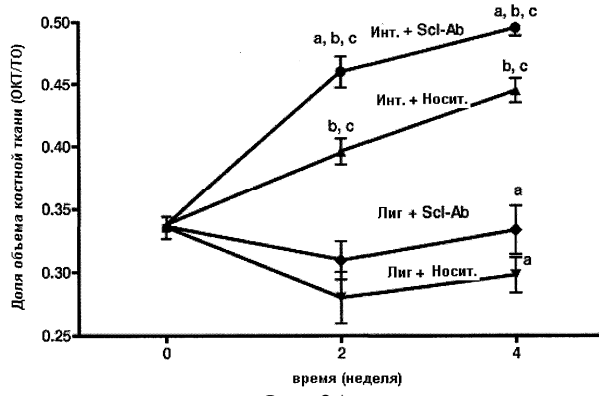
Ab-3 и Ab-15 CDR-H2	RIDPENGDTLYDPKFQD (SEQ ID NO: 291)
Ab-3 и Ab-15 CDR-H3	EADYFHDGTSYWYFDV (SEQ ID NO: 292)
Ab-3 легкая цепь	SEQ ID NO: 125
Ab-3 тяжелая цепь	SEQ ID NO: 129
Ab-15 переменная область легкой цепи	SEQ ID NO: 384
Ab-15 переменная область тяжелой цепи	SEQ ID NO: 386
Ab-15 легкая цепь	SEQ ID NO: 221
Ab-15 тяжелая цепь	SEQ ID NO: 225
Ab-4 и Ab-5 CDR-L1	RASQDISNYLN (SEQ ID NO: 78)
Ab-4 и Ab-5 CDR-L2	YTSRLLS (SEQ ID NO: 79)
Ab-4 и Ab-5 CDR-L3	QQGDTLPYT (SEQ ID NO: 80)
Ab-4 и Ab-5 CDR-H1	DYNMH (SEQ ID NO: 245)
Ab-4 и Ab-5 CDR-H2	EINPNSGGAGYNQKFKG (SEQ ID NO: 246)
Ab-4 и Ab-5 CDR-H3	LGYDDIYDDWYFDV (SEQ ID NO: 247)
Ab-4 легкая цепь	SEQ ID NO: 133
Ab-4 тяжелая цепь	SEQ ID NO: 137
Ab-5 переменная область легкой цепи	SEQ ID NO: 376
Ab-5 переменная область тяжелой цепи	SEQ ID NO: 378
Ab-5 легкая цепь	SEQ ID NO: 141
Ab-5 тяжелая цепь	SEQ ID NO: 145
Ab-6 CDR-L1	RASQDISNYLN (SEQ ID NO: 81)
Ab-6 CDR-L2	YTSRLHS (SEQ ID NO: 99)
Ab-6 CDR-L3	QQGDTLPYT (SEQ ID NO: 100)
Ab-6 CDR-H1	DYNMH (SEQ ID NO: 248)
Ab-6 CDR-H2	EINPNSGGSGYNQKFKG (SEQ ID NO: 249)
Ab-6 CDR-H3	LVYDGSYEDWYFDV (SEQ ID NO: 250)
Ab-6 легкая цепь	SEQ ID NO: 149
Ab-6 тяжелая цепь	SEQ ID NO: 153
Ab-7 CDR-L1	RASQVITNYLY (SEQ ID NO: 101)
Ab-7 CDR-L2	YTSRLHS (SEQ ID NO: 102)
Ab-7 CDR-L3	QQGDTLPYT (SEQ ID NO: 103)
Ab-7 CDR-H1	DYNMH (SEQ ID NO: 251)
Ab-7 CDR-H2	EINPNSGGAGYNQKFKG (SEQ ID NO: 252)
Ab-7 CDR-H3	LGYVGNVEDWYFDV (SEQ ID NO: 253)
Ab-7 легкая цепь	SEQ ID NO: 157
Ab-7 тяжелая цепь	SEQ ID NO: 161
Ab-8 CDR-L1	RASQDISNYLN (SEQ ID NO: 104)
Ab-8 CDR-L2	YTSRLLS (SEQ ID NO: 105)
Ab-8 CDR-L3	QQGDTLPYT (SEQ ID NO: 106)
Ab-8 CDR-H1	DYNMH (SEQ ID NO: 254)
Ab-8 CDR-H2	EINPNSGGAGYNQKFKG (SEQ ID NO: 255)
Ab-8 CDR-H3	LGYDDIYDDWYFDV (SEQ ID NO: 256)
Ab-8 легкая цепь	SEQ ID NO: 165
Ab-8 тяжелая цепь	SEQ ID NO: 169
Ab-9 CDR-L1	RASQDISNYLN (SEQ ID NO: 107)
Ab-9 CDR-L2	YTSRLFS (SEQ ID NO: 108)
Ab-9 CDR-L3	QQGDTLPYT (SEQ ID NO: 109)
Ab-9 CDR-H1	DYNMH (SEQ ID NO: 257)

Ab-9 CDR-H2	EINPNSGGAGYNQKFKG (SEQ ID NO: 258)
Ab-9 CDR-H3	LGYYDDIYDDWYFDV (SEQ ID NO: 259)
Ab-9 легкая цепь	SEQ ID NO: 173
Ab-9 тяжелая цепь	SEQ ID NO: 177
Ab-10 CDR-L1	RASQDISNYLN (SEQ ID NO: 110)
Ab-10 CDR-L2	YTSRLLS (SEQ ID NO: 111)
Ab-10 CDR-L3	QQGDTLPYT (SEQ ID NO: 112)
Ab-10 CDR-H1	DYNAMH (SEQ ID NO: 260)
Ab-10 CDR-H2	EINPNS GGAGYNQKFKG (SEQ ID NO: 261)
Ab-10 CDR-H3	LGYYDDIYDDWYFDV (SEQ ID NO: 262)
Ab-10 легкая цепь	SEQ ID NO: 181
Ab-10 тяжелая цепь	SEQ ID NO: 185
Ab-11 и Ab-16 CDR-L1	RASSSISYIH (SEQ ID NO: 281)
Ab-11 и Ab-16 CDR-L2	ATSNLAS (SEQ ID NO: 282)
Ab-11 и Ab-16 CDR-L3	QQWSSDPLT (SEQ ID NO: 283)
Ab-11 и Ab-16 CDR-H1	DYYIH (SEQ ID NO: 293)
Ab-11 и Ab-16 CDR-H2	RVDPDNGETEFAPKFPK (SEQ ID NO: 294)
Ab-11 и Ab-16 CDR-H3	EDYDGTYTWFY (SEQ ID NO: 295)
Ab-11 легкая цепь	SEQ ID NO: 189
Ab-11 тяжелая цепь	SEQ ID NO: 193
Ab-16 переменная область легкой цепи	SEQ ID NO: 388
Ab-16 переменная область тяжелой цепи	SEQ ID NO: 390
Ab-16 легкая цепь	SEQ ID NO: 229
Ab-16 тяжелая цепь	SEQ ID NO: 233
Ab-12 CDR-L1	RASQDISNYLN (SEQ ID NO: 113)
Ab-12 CDR-L2	YTSTLQS (SEQ ID NO: 114)
Ab-12 CDR-L3	QQGDTLPYT (SEQ ID NO: 115)
Ab-12 CDR-H1	DYNAMH (SEQ ID NO: 263)
Ab-12 CDR-H2	EINPNSGGSGYNQKFKG (SEQ ID NO: 264)
Ab-12 CDR-H3	LGYYGNYEDWYFDV (SEQ ID NO: 265)
Ab-12 легкая цепь	SEQ ID NO: 197
Ab-12 тяжелая цепь	SEQ ID NO: 201
Ab-13 и Ab-14 CDR-L1	RASSSVTSSYLN (SEQ ID NO: 284)
Ab-13 и Ab-14 CDR-L2	STSNLAS (SEQ ID NO: 285)
Ab-13 и Ab-14 CDR-L3	QQYDFPST (SEQ ID NO: 286)
Ab-13 и Ab-14 CDR-H1	DYYMN (SEQ ID NO: 296)
Ab-13 и Ab-14 CDR-H2	DINPYNDDTTYNHKFKG (SEQ ID NO: 297)
Ab-13 и Ab-14 CDR-H3	ETAVITNAMD (SEQ ID NO: 298)
Ab-13 легкая цепь	SEQ ID NO: 205
Ab-13 тяжелая цепь	SEQ ID NO: 209
Ab-14 переменная область легкой цепи	SEQ ID NO: 380
Ab-14 переменная область тяжелой цепи	SEQ ID NO: 382
Ab-14 легкая цепь	SEQ ID NO: 213
Ab-14 тяжелая цепь	SEQ ID NO: 217
Ab-17 и Ab-18 CDR-L1	SVSSSSSSNLH (SEQ ID NO: 116)
Ab-17 и Ab-18 CDR-L2	GTSNLAS (SEQ ID NO: 237)
Ab-17 и Ab-18 CDR-L3	QQWTTTYT (SEQ ID NO: 238)
Ab-17 и Ab-18 CDR-H1	DYYIH (SEQ ID NO: 266)

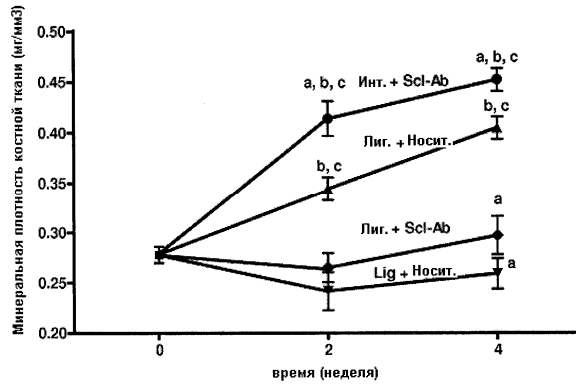
Ab-17 и Ab-18 CDR-H2	RIDPDNGESTYVVPKFQG (SEQ ID NO: 267)
Ab-17 и Ab-18 CDR-H3	EGLDYGDYYAVDY (SEQ ID NO: 268)
Ab-17 переменная область легкой цепи (с сигнальной последовательностью)	SEQ ID NO: 299
Ab-17 переменная область тяжелой цепи (с сигнальной последовательностью)	SEQ ID NO: 301
Ab-18 переменная область легкой цепи (с сигнальной последовательностью)	SEQ ID NO: 303
Ab-18 переменная область тяжелой цепи (с сигнальной последовательностью)	SEQ ID NO: 305
Ab-19, Ab-20 и Ab-23 CDR-L1	RASQDISSYLN (SEQ ID NO: 239)
Ab-19, Ab-20 и Ab-23 CDR-L2	STSRLNS (SEQ ID NO: 240)
Ab-19, Ab-20 и Ab-23 CDR-L3	QQDIKHPT (SEQ ID NO: 241)
Ab-19, Ab-20 и Ab-23 CDR-H1	DYIMH (SEQ ID NO: 269)
Ab-19, Ab-20 и Ab-23 CDR-H2	YINPYNDDEYNEKFKG (SEQ ID NO: 270)
Ab-19, Ab-20 и Ab-23 CDR-H3	SIYYDAPFAY (SEQ ID NO: 271)
Ab-19 переменная область легкой цепи	SEQ ID NO: 314
Ab-19 переменная область тяжелой цепи	SEQ ID NO: 327
Ab-19 легкая цепь (с сигнальной последовательностью)	SEQ ID NO: 307
Ab-19 тяжелая цепь (с сигнальной последовательностью)	SEQ ID NO: 309
Ab-20 переменная область легкой цепи (с сигнальной последовательностью)	SEQ ID NO: 311
Ab-20 переменная область тяжелой цепи (с сигнальной последовательностью)	SEQ ID NO: 313
Ab-23 переменная область легкой цепи	SEQ ID NO: 364
Ab-23 переменная область тяжелой цепи	SEQ ID NO: 366
Ab-23 легкая цепь	SEQ ID NO: 341
Ab-23 тяжелая цепь	SEQ ID NO: 345
Ab-21 и Ab-22 CDR-L1	KASQDVFTAVA (SEQ ID NO: 242)
Ab-21 и Ab-22 CDR-L2	WASTRHT (SEQ ID NO: 243)
Ab-21 и Ab-22 CDR-L3	QQYSSYPLT (SEQ ID NO: 244)
Ab-21 и Ab-22 CDR-H1	DYYMH (SEQ ID NO: 272)
Ab-21 и Ab-22 CDR-H2	RIDPENGDIYDPKFQG (SEQ ID NO: 273)
Ab-21 и Ab-22 CDR-H3	DAGDPAWFTY (SEQ ID NO: 274)
Ab-21 переменная область легкой цепи (с сигнальной последовательностью)	SEQ ID NO: 315
Ab-21 переменная область тяжелой цепи (с сигнальной последовательностью)	SEQ ID NO: 317
Ab-22 переменная область легкой цепи	SEQ ID NO: 368
Ab-22 переменная область тяжелой цепи	SEQ ID NO: 370
Ab-24 CDR-L1	KASQSVDYDGTSMN (SEQ ID NO: 351)
Ab-24 CDR-L2	AASNLES (SEQ ID NO: 352)
Ab-24 CDR-L3	QSNEDPFT (SEQ ID NO: 353)
Ab-24 CDR-H1	TYWMN (SEQ ID NO: 358)
Ab-24 CDR-H2	MIHPSASEIRLDQKFKD (SEQ ID NO: 359)
Ab-24 CDR-H3	SGEWGSMDY (SEQ ID NO: 360)
Ab-24 легкая цепь	SEQ ID NO: 350
Ab-24 тяжелая цепь	SEQ ID NO: 357
CDR SEQ ID NO: 20 из WO 2008/115732	GYTFTDYFLN (SEQ ID NO: 416)
CDR SEQ ID NO: 21 из WO 2008/115732	TIYPYHDGTTYQKFKG (SEQ ID NO: 417)
CDR SEQ ID NO: 22 из WO 2008/115732	EEEDGQFDY (SEQ ID NO: 418)
CDR SEQ ID NO: 23 из WO 2008/115732	SASQGIQWYLN (SEQ ID NO: 419)

CDR SEQ ID NO: 24 нз WO 2008/115732	YTSSLHS (SEQ ID NO: 420)
CDR SEQ ID NO: 25 нз WO 2008/115732	QQHSKLPRT (SEQ ID NO: 421)
CDR SEQ ID NO: 26 нз WO 2008/115732	GFPIKDTFQH (SEQ ID NO: 422)
CDR SEQ ID NO: 27 нз WO 2008/115732	WSDPEIGDTEYASKFQG (SEQ ID NO: 423)
CDR SEQ ID NO: 28 нз WO 2008/115732	GDTTYKFDG (SEQ ID NO: 424)
CDR SEQ ID NO: 29 нз WO 2008/115732	KASQDVHTAVA (SEQ ID NO: 425)
CDR SEQ ID NO: 30 нз WO 2008/115732	WASTRWT (SEQ ID NO: 426)
CDR SEQ ID NO: 31 нз WO 2008/115732	QQYSDYPWT (SEQ ID NO: 427)
CDR SEQ ID NO: 32 нз WO 2008/115732	DFEIKDYIYH (SEQ ID NO: 428)
CDR SEQ ID NO: 33 нз WO 2008/115732	QIDAEDGETEYAPRFQG (SEQ ID NO: 429)
CDR SEQ ID NO: 34 нз WO 2008/115732	QIDAEDGETEYAPRFQG (SEQ ID NO: 430)
CDR SEQ ID NO: 35 нз WO 2008/115732	QIDAEDGETEYAPRFQG (SEQ ID NO: 431)
CDR SEQ ID NO: 36 нз WO 2008/115732	STSELAS (SEQ ID NO: 432)
CDR SEQ ID NO: 37 нз WO 2008/115732	QQLSHLPLT (SEQ ID NO: 433)
CDR SEQ ID NO: 4 нз WO 2009/047356	GFTFRSHWLS (SEQ ID NO: 443)
CDR SEQ ID NO: 15 нз WO 2009/047356	WVSNINYDGSSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 454)
CDR SEQ ID NO: 26 нз WO 2009/047356	DTYLHFDY (SEQ ID NO: 465)
CDR SEQ ID NO: 37 нз WO 2009/047356	SGDNIGSFYVH (SEQ ID NO: 476)
CDR SEQ ID NO: 48 нз WO 2009/047356	LMIYDVNNRPS (SEQ ID NO: 487)
CDR SEQ ID NO: 59 нз WO 2009/047356	QSYAGSYLSE (SEQ ID NO: 498)
CDR SEQ ID NO: 135 нз WO 2010/130830	DNVMG (SEQ ID NO: 745)
CDR SEQ ID NO: 136 нз WO 2010/130830	IYNMD (SEQ ID NO: 746)
CDR SEQ ID NO: 137 нз WO 2010/130830	RFDMS (SEQ ID NO: 747)
CDR SEQ ID NO: 138 нз WO 2010/130830	SYFMG (SEQ ID NO: 748)
CDR SEQ ID NO: 139 нз WO 2010/130830	IYNMD (SEQ ID NO: 749)
CDR SEQ ID NO: 140 нз WO 2010/130830	RYVTG (SEQ ID NO: 750)
CDR SEQ ID NO: 141 нз WO 2010/130830	SFVIG (SEQ ID NO: 751)
CDR SEQ ID NO: 142 нз WO 2010/130830	QYTIT (SEQ ID NO: 752)
CDR SEQ ID NO: 143 нз WO 2010/130830	IYNMD (SEQ ID NO: 753)
CDR SEQ ID NO: 153 нз WO 2010/130830	WYRQAPGKQRELV (SEQ ID NO: 763)
CDR SEQ ID NO: 154 нз WO 2010/130830	WFRQTPGKERELIA (SEQ ID NO: 764)
CDR SEQ ID NO: 155 нз WO 2010/130830	WFRQAPGKQREFIA (SEQ ID NO: 765)
CDR SEQ ID NO: 156 нз WO 2010/130830	WFRQAPGKEREVVA (SEQ ID NO: 766)
CDR SEQ ID NO: 157 нз WO 2010/130830	WFLQAPGKERELIA (SEQ ID NO: 767)
CDR SEQ ID NO: 158 нз WO 2010/130830	WFRQAPGKEREVVA (SEQ ID NO: 768)
CDR SEQ ID NO: 159 нз WO 2010/130830	WFRQAPGKQREVVA (SEQ ID NO: 769)
CDR SEQ ID NO: 160 нз WO 2010/130830	WFRQAPGKEREFVA (SEQ ID NO: 770)
CDR SEQ ID NO: 161 нз WO 2010/130830	WFRQSGKGRELIA (SEQ ID NO: 771)
CDR SEQ ID NO: 171 нз WO 2010/130830	GTIVTGTWRSDY (SEQ ID NO: 781)
CDR SEQ ID NO: 172 нз WO 2010/130830	GDTGGAAYGY (SEQ ID NO: 782)
CDR SEQ ID NO: 173 нз WO 2010/130830	LGIEYA (SEQ ID NO: 783)
CDR SEQ ID NO: 174 нз WO 2010/130830	AKGIGVYGY (SEQ ID NO: 784)
CDR SEQ ID NO: 175 нз WO 2010/130830	GVTGGAAYGY (SEQ ID NO: 785)
CDR SEQ ID NO: 176 нз WO 2010/130830	AELPGTYDY (SEQ ID NO: 786)
CDR SEQ ID NO: 177 нз WO 2010/130830	AEPAGVYDV (SEQ ID NO: 787)
CDR SEQ ID NO: 178 нз WO 2010/130830	DRRGLASTRAADYDY (SEQ ID NO: 788)
CDR SEQ ID NO: 179 нз WO 2010/130830	GDTGGAAYGY (SEQ ID NO: 789)

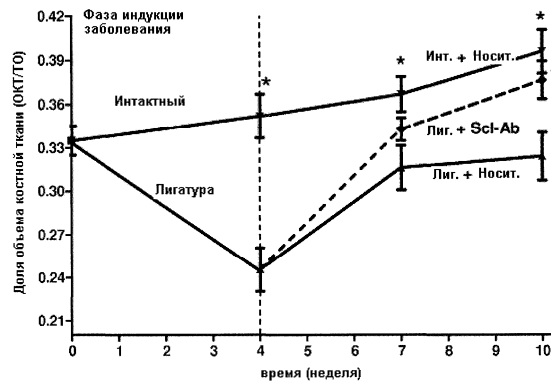
Фиг. 1



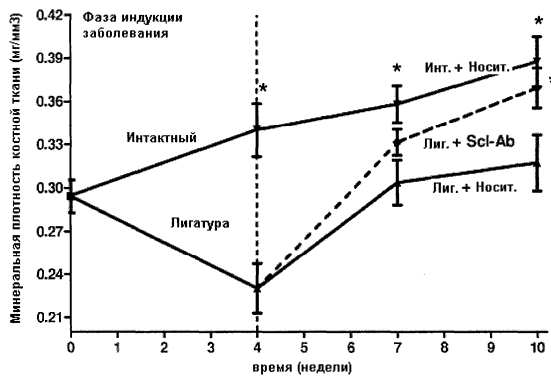
Фиг. 2А



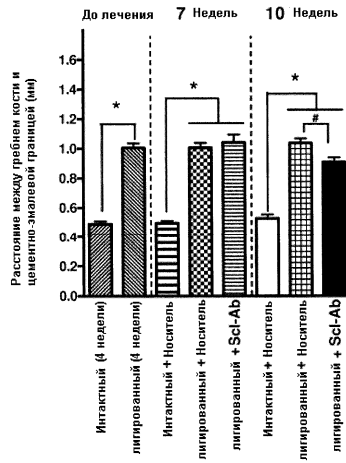
Фиг. 2В



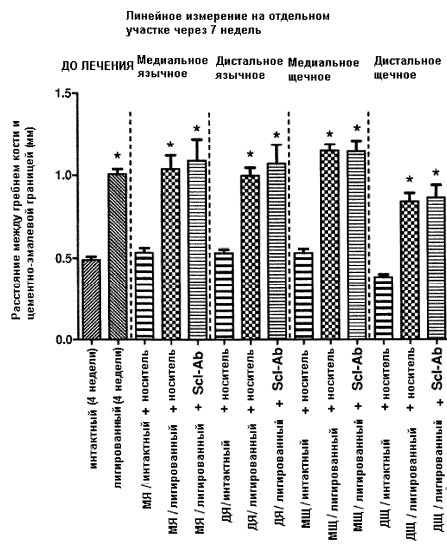
Фиг. 3А



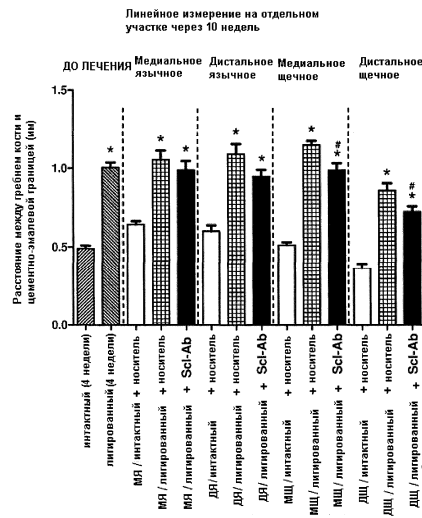
Фиг. 3В



Фиг. 4А



Фиг. 4В



Фиг. 4С