



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.04.05

(21) Номер заявки
201590720

(22) Дата подачи заявки
2014.01.28

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

**(54) СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ МЫШЕЧНОЙ ДИСТРОФИИ ДЮШЕННА ПУТЕМ ВВЕДЕНИЯ
АНТИ-FLT-1-АНТИТЕЛА**

(31) 61/757,571

(32) 2013.01.28

(33) US

(43) 2015.11.30

(86) PCT/US2014/013402

(87) WO 2014/117160 2014.07.31

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ШИР ХЬЮМАН ДЖЕНЕТИК
ТЕРАПИС, ИНК.; РЕДЖЕНТС ОФ ЗЕ
ЮНИВЕРСИТИ ОФ МИННЕСОТА
(US)**

(72) Изобретатель:
**Джозиа Серена, Лаби Томас М.,
Асакура Ацуси, Киф Деннис, Чарнас
Лоуренс, Верма Маянк (US)**

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) Y. WU ET AL.: "Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 Antagonist Antibody as a Therapeutic Agent for Cancer" CLINICAL CANCER RESEARCH, vol. 12, no. 21, 1 November 2006 (2006-11-01), pages 6573-6584, XP055120093, ISSN: 1078-0432, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-0831, abstract; table 1; p. 6575, left-hand col.; p. 6576, left-hand col.; page 6578, left-hand column - page 6580, right-hand column; figures 5-8
WO-A2-2006055809

M. VERMA ET AL.: "Flt-1 haploinsufficiency ameliorates muscular dystrophy phenotype by developmentally increased vasculature in mdx mice", HUMAN MOLECULAR GENETICS, vol.

19, no. 21, 12 August 2010 (2010-08-12), pages 4145-4159, XP055119985, ISSN: 0964-6906, DOI: 10.1093/hmg/ddq334, the whole document in particular abstract, figures 1-8

SANZ L. ET AL.: "Antibodies and gene therapy: teaching old 'magic bullets' new tricks", TRENDS IN IMMUNOLOGY, ELSEVIER LTD. * TRENDS JOURNALS, GB, vol. 25, no. 2, 1 February 2004 (2004-02-01), pages 85-91, XP004487052, ISSN: 1471-4906, DOI: 10.1016/J.IT.2003.12.001, abstract

S. MESSINA ET AL.: "VEGF overexpression via adeno-associated virus gene transfer promotes skeletal muscle regeneration and enhances muscle function in mdx mice", THE FASEB JOURNAL, vol. 21, no. 13, 1 November 2007 (2007-11-01), pages 3737-3746, XP055120416, ISSN: 0892-6638, DOI: 10.1096/fj.07-8459com, the whole document, in particular abstract, figures 1-8

JAMES P. ENNEN ET AL.: "Vascular-targeted therapies for Duchenne muscular dystrophy", SKELETAL MUSCLE, BIOMED CENTRAL LTD, LONDON, UK, vol. 3, no. 1, 23 April 2013 (2013-04-23), page 9, XP021148855, ISSN: 2044-5040, DOI: 10.1186/2044-5040-3-9, abstract, page 9, left-hand column; figure 2

YUKO SHIMIZU-MOTOHASHI AND ATSUSHI ASAKURA: "Angiogenesis as a novel therapeutic strategy for Duchenne muscular dystrophy through decreased ischemia and increased satellite cells", FRONTIERS IN PHYSIOLOGY, vol. 5, no. 50, 27 January 2014 (2014-01-27), pages 1-17, XP007922708, ISSN: 1664-042X, DOI: 10.3389/FPHYS.2014.00050 [retrieved on 2014-01-27] the whole document, in particular item, 3.2 table 1

(57) В настоящем изобретении, помимо прочего, предложены способы и композиции для лечения мышечной дистрофии, в частности, мышечной дистрофии Дюшенна (МДД) путем введения антиетла против Flt-1. В некоторых вариантах реализации способ согласно настоящему изобретению включает введение индивиду, страдающему или предрасположенному к МДД, эффективного количества анти-Flt-1-антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, в результате чего происходит снижение интенсивности, тяжести или частоты или откладывается начало проявления по меньшей мере одного симптома или признака МДД.

Настоящая заявка заявляет приоритет по предварительной заявке на патент США № 61/757571, зарегистрированной 28 января 2013 г., которая в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки.

Уровень техники

Мышечная дистрофия Дюшенна (МДД) представляет собой рецессивную X-сцепленную форму мышечной дистрофии, встречающуюся приблизительно у 1 из 3600 детей мужского пола, которая приводит к мышечной дегенерации и последующей смерти. Это нарушение является следствием мутации в гене дистрофина, находящемся в X-хромосоме человека, который кодирует белок дистрофии, являющийся важным структурным компонентом мышечной ткани и обеспечивающий структурную стабильность дистрогликанового комплекса (ДГК) клеточной мембраны. Дистрофин соединяет внутреннюю цитоплазматическую сеть актиновых филаментов с внеклеточным матриксом, обеспечивая физическую силу мышечным волокнам. Соответственно изменение структуры или отсутствие дистрофина приводит к аномальной мембранной функции сарколеммы. Хотя носителями мутации могут быть представители обоих полов, у женщин редко проявляются типовые клинические признаки заболевания, характерные для мальчиков.

В настоящее время лечения для МДД не существует. Было опробовано несколько лечебных стратегий, включая генную терапию и введение кортикостероидов. Хотя некоторые из этих способов лечения могут отсрочить определенные симптомы, в настоящее время не существует удовлетворительного метода для лечения пациентов с МДД.

Сущность изобретения

В настоящем изобретении, помимо прочего, предложены усовершенствованные способы и композиции для лечения мышечной дистрофии, в частности, мышечной дистрофии Дюшенна (МДД) и/или мышечной дистрофии Беккера на основе терапии с применением анти-Flt1-антитела. Как описано ниже в примерах, данное изобретение частично основано на открытии, что анти-Flt-1-антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут подавлять связывание VEGF и других лигандов с рецептором Flt-1, таким образом, увеличивая количество VEGF и/или других лигандов, доступное для связывания с рецепторами VEGF. Происходят структурные и функциональные улучшения симптомов МДД. Действительно, как показано в примерах, авторы настоящего изобретения продемонстрировали, что введение анти-Flt-1-антитела приводит к снижению степени мышечной патологии, а также улучшению мышечной функции в животной модели МДД. Следовательно, в настоящем изобретении предложены безопасные и эффективные терапевтические средства на основе антител для лечения МДД.

В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложены способы лечения мышечной дистрофии Дюшенна (МДД), включающие введение индивиду, страдающему или предрасположенному к МДД, эффективного количества анти-Flt-1-антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, в результате чего происходит снижение интенсивности, тяжести или частоты или откладывается начало появления по меньшей мере одного симптома или признака МДД.

В некоторых вариантах реализации изобретения анти-Flt-1-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят парентерально. В некоторых вариантах реализации изобретения парентеральное введение выбрано из внутривенного, внутрикожного, интратекального, ингаляционного, трансдермального (местного), внутривидного, внутримышечного, подкожного и/или трансмукозального введения.

В некоторых вариантах реализации изобретения анти-Flt-1-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят перорально.

В некоторых вариантах реализации изобретения анти-Flt-1-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент доставляют в одну или более тканей-мишеней, выбранных из поперечнополосатых мышц (например, скелетной мышцы, сердечной мышцы). В некоторых вариантах реализации изобретения анти-Flt-1-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент доставляют в сердце. В некоторых вариантах реализации изобретения анти-Flt-1-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент доставляют в скелетную мышцу. В некоторых вариантах реализации изобретения анти-Flt-1-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент доставляют в одну или более скелетных мышц, выбранных из табл.1. В некоторых вариантах реализации изобретения поперечнополосатая мышца (например, скелетная мышца) выбрана из группы, состоящей из трехглавой мышцы, передней большеберцовой мышцы, камбаловидной мышцы, икроножной мышцы, двуглавой мышцы, трапецевидной мышцы, дельтовидной мышцы, четырехглавой мышцы и диафрагмы.

В некоторых вариантах реализации изобретения поперечнополосатая мышца выбрана из группы, состоящей из трехглавой мышцы, передней большеберцовой мышцы, камбаловидной мышцы, икроножной мышцы, двуглавой мышцы, трапецевидной мышцы, дельтовидной мышцы, четырехглавой мышцы и диафрагмы.

В некоторых вариантах реализации изобретения анти-Flt-1-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят раз в два месяца, ежемесячно, раз в три недели, раз в две недели, еженедельно, ежедневно или через переменные интервалы.

В некоторых вариантах реализации изобретения введение анти-Flt-1-антитела или его антигенсвязывающего фрагмента приводит к регенерации мышечной ткани, уменьшению степени фиброза, повы-

шению мышечной силы, повышению стабильности, повышению гибкости, увеличению объема движений, повышению выносливости, уменьшению утомляемости, усилению тока крови, улучшению когнитивной деятельности, улучшению легочной функции и/или подавлению воспалительных процессов.

В некоторых вариантах реализации изобретения введение анти-Flt-1-антитела или его антигенсвязывающего фрагмента снижает интенсивность, тяжесть или частоту или откладывает начало появления по меньшей мере одного симптома МДД. В некоторых вариантах реализации изобретения введение анти-Flt-1-антитела или его антигенсвязывающего фрагмента снижает интенсивность, тяжесть или частоту или откладывает начало появления по меньшей мере одного симптома МДД, выбранного из группы, состоящей из мышечной атрофии, мышечной слабости, мышечной хрупкости, мышечной гипертрофии, мышечной псевдогипертрофии, контрактуры суставов, деформации скелета, кардиомиопатии, нарушения глотания, нарушения функции кишечника и мочевого пузыря, мышечной ишемии, когнитивного нарушения, поведенческого расстройства, нарушения социализации, сколиоза и нарушения дыхательной функции.

В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые характеризуются способностью подавлять связывание VEGF с рецептором Flt-1.

В некоторых вариантах реализации изобретения анти-Flt-1-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно анализу связывания методом поверхностного плазмонного резонанса (например, BIACORE) характеризуется способностью связывать человеческий Flt-1 с аффинностью, превышающей 10^9 М, превышающей 10^{10} М, превышающей $0,5 \times 10^{10}$ М, превышающей 10^{11} М, превышающей $0,5 \times 10^{11}$ М, превышающей 10^{12} М или превышающей $0,5 \times 10^{12}$ М.

В некоторых вариантах реализации изобретения анти-Flt-1-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в конкурентном анализе с человеческим Flt-1 характеризуется величиной IC_{50} менее 100 пМ, менее 10 пМ или менее 1 пМ. В некоторых вариантах реализации изобретения анти-Flt-1-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент характеризуется определенной в конкурентном анализе величиной IC_{50} подавления связывания VEGF с человеческим Flt-1, составляющей менее 100 пМ, менее 10 пМ или менее 1 пМ. В некоторых вариантах реализации изобретения анти-Flt-1-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент характеризуется определенной в конкурентном анализе величиной IC_{50} подавления связывания PLGF с человеческим Flt-1, составляющей менее 100 пМ, менее 10 пМ или менее 1 пМ.

В некоторых вариантах реализации изобретения анти-Flt-1-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент не связывается с VEGFR2 (Flk-1) и/или VEGFR3 (Flt-4).

В некоторых вариантах реализации изобретения анти-Flt-1-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с мышинным или обезьяньим Flt-1. В некоторых вариантах реализации изобретения анти-Flt-1-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент не связывается с мышинным или обезьяньим Flt-1.

В некоторых вариантах реализации изобретения анти-Flt-1-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбраны из группы, состоящей из IgG, F(ab')₂, F(ab)₂, Fab', Fab, ScFv, диател, триател и тетрател.

В некоторых вариантах реализации изобретения анти-Flt-1-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой IgG. В некоторых вариантах реализации изобретения анти-Flt-1-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой IgG1.

В некоторых вариантах реализации изобретения анти-Flt-1-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой моноклональное антитело, а в определенных вариантах реализации изобретения представляет собой гуманизированное моноклональное антитело. В некоторых вариантах реализации изобретения гуманизированное моноклональное антитело содержит человеческую Fc-область. В некоторых вариантах реализации изобретения Fc-область содержит одну или более мутаций, которые повышают аффинность связывания между Fc-областью и FcRn-рецептором, результатом чего является продление *in vivo* времени полужизни антитела. В некоторых вариантах реализации изобретения Fc-область содержит одну или более мутаций в одной или более позициях, соответствующих Thr 250, Met 252, Ser 254, Thr 256, Thr 307, Glu 380, Met 428, His 433 и/или Asn 434 человеческого IgG1.

В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая анти-Flt-1-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, и фармацевтически приемлемый носитель.

При употреблении в данном документе термины "около" и "приблизительно" используются как эквивалентные. Подразумевается, что любые числовые значения, приведенные в данной заявке с или без около/приблизительно, включают любые нормальные отклонения, приемлемые для специалиста в соответствующей области техники.

Другие особенности, объекты и преимущества настоящего изобретения станут понятны из нижеприведенного подробного описания. При этом следует понимать, что, несмотря на то, что подробное описание указывает варианты реализации настоящего изобретения, оно приведено исключительно в иллюстративных, но не ограничительных целях. Из подробного описания специалистам в данной области техники станет очевидна возможность внесения различных изменений и модификаций в рамках данного изобретения.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 приведены типовые результаты, иллюстрирующие антисывороточный титр антител к растворимому человеческому Flt-1 для мышей, иммунизированных антигеном растворимого человеческого Flt-1. Сывороточный титр анти-sFlt-1 приведен для пяти разных мышей штамма Balb/c через 20 дней после введения.

На фиг. 2 приведены типовые результаты, иллюстрирующие конкурентное связывание моноклональных антител с растворимым человеческим Flt-1, полученные методом ELISA. Проиллюстрирован конкурентный анализ ELISA гибридных супернатантов в отношении связывания VEGF на человеческом Flt-1. Отрицательный контроль (очищенный поликлональный мышинный IgG) не демонстрировал конкуренции в отношении человеческого Flt-1, в то время как продукт слияния 01A04 и коммерческое антитело Abcam56300, являющееся положительным контролем, демонстрировали конкурентное связывание.

Фиг. 3 иллюстрирует типовое связывание моноклонального антитела с растворимым человеческим Flt-1. Проиллюстрирован анализ ELISA для прямого связывания очищенного IgG с субклонами гибридного клона 01A04-02B10 в сравнении с человеческим антигеном sFlt-1. На основании показаний поглощения и микроскопической морфологии субклон 01A04-02B10-02G07 был выбран для дальнейшего увеличения масштаба и определения характеристик.

На фиг. 4 приведены типовые результаты, иллюстрирующие связывание моноклонального антитела с растворимым человеческим Flt-1, полученные методом поверхностного плазменного резонанса (BIAcore). Проиллюстрированы сенсограммы поверхностного плазменного резонанса, полученные для связывания IgG гибридного клона 01A04 (субклон 02B10-02G07) с иммобилизованным человеческим антигеном sFlt-1.

На фиг. 5 приведены типовые результаты, иллюстрирующие перекрестную реактивность связывания моноклонального антитела с Flt-1 яванского макака. Проиллюстрировано связывание очищенного IgG из гибридного клона 01A04 (субклон 02B10-02G07) с клеточными линиями, сверхэкспрессирующими Flt-1 человека и яванского макака. Более темная гистограмма соответствует изотипическому контрольному антителу. Более светлая гистограмма представляет моноклональное антитело 01A04-02B10-02G07.

На фиг. 6 приведены типовые результаты, иллюстрирующие конкурентное связывание моноклональных антител с растворимым человеческим Flt-1, полученные методом ELISA. Проиллюстрировано определение величины IC_{50} для VEGF:sFlt-1 для моноклонального антитела 01A04 (субклон 02B10-02G07) и коммерческого контрольного образца. Значения получали, проводя конкурентный анализ ELISA соответствующих IgG в отношении связывания VEGF на человеческом Flt-1. Отрицательный контроль (очищенный поликлональный мышинный IgG) не демонстрировал конкуренции в отношении человеческого Flt-1, в то время как моноклональное антитело 01A04 и коммерческое анти-sFlt-1 антитело от Abcam (номер 56300 по каталогу) конкурировали за сайт связывания VEGF. Моноклональное антитело 01A04 является более сильным антагонистом, чем коммерческий контрольный образец. IC_{50} для 01A04 составляла 2,3 нМ. IC_{50} для Abcam 56300 составляла 65 нМ.

На фиг. 7 приведены типовые результаты, иллюстрирующие подавление моноклональным анти-Flt-1-антителом связывания VEGF с sFlt-1, полученные методом клеточного анализа. Первичные клетки HUVEC обрабатывали рекомбинантным человеческим VEGF (100 нг/мл, 2,4 нМ) в присутствии или отсутствии растворимого рекомбинантного человеческого Flt-1 (15X молярный эквивалент, 36 нМ) и моноклонального антитела 01A04 (субклон 02B10-02G07). Согласно данным по фосфорилированию цитоплазматического хвоста VEGF R2, добавление 01A04 прекращает индуцированную VEGF активацию HUVEC. Само по себе моноклональное антитело 01A04 не влияет на фосфорилирование рецептора, а контрольный IgG не способен остановить передачу сигналов в присутствии VEGF и растворимого Flt-1.

На фиг. 8 приведены типовые микрофотографии, иллюстрирующие улучшение мышечной гистопатологии при введении анти-Flt-1-антитела. Проиллюстрировано положительное изменение мышечной патологии у mdx мышей после обработки моноклональным анти-sFlt-1 антителом. Животных обрабатывали коммерческим моноклональным антителом к sFlt-1 (Angio Proteomie, клон AP-MAB0702) или ФСБ в качестве контроля. В верхнем ряду показано окрашивание мышц диафрагмы красителем Эванса голубым. Во втором ряду показано окрашивание мышц диафрагмы CD31 для количественной оценки кровеносных сосудов. В третьем ряду показано окрашивание мышц диафрагмы гематоксилином и эозином. В нижнем ряду показано окрашивание мышц диафрагмы по Ван Гизону для количественной оценки степени фиброза.

На фиг. 9 приведены типовые результаты, иллюстрирующие количественную оценку гистопатологических маркеров, которые свидетельствуют об улучшении мышечной гистологии в результате введения мышам анти-Flt-1-антитела. Проиллюстрирована количественная оценка данных по гистопатологии, представленных на фиг. 8. Количество волокон, положительных по голубому Эванса (верхняя панель), CD31+ кровеносных сосудов (вторая панель); и центрально расположенных ядер (третья панель) подсчитывали вручную при 4x и 10x увеличении. Площадь распространения фиброза оценивали при помощи программного обеспечения для анализа изображений (нижняя панель). * = $p < 0,05$ по непарному критерию Стьюдента.

На фиг. 10 приведены типовые результаты, иллюстрирующие количественную оценку гистопатологических маркеров, которые свидетельствуют об улучшении мышечной гистологии в результате введения мышам анти-Flt-1-антитела. Проиллюстрирована количественная оценка данных по гистопатологии, представленных на фиг. 8. Вверху: снижение количества волокон с центрально расположенными ядрами (ЦРЯ) в диафрагме после обработки моноклональным анти-Flt-1-антителом. Количество волокон с ЦРЯ подсчитывали вручную при 4х и 10х увеличении. Внизу: небольшой сдвиг в сторону более крупных размеров волокон в диафрагме после обработки моноклональным анти-Flt-1-антителом. Диаметры волокон подсчитывали вручную при 4х и 10х увеличении. $^{*}p < 0,05$ по непарному критерию Стьюдента.

На фиг. 11 приведены типовые результаты, иллюстрирующие *in vivo* воздействие антитела к Flt-1 на мышечную функцию. Введение антитела к Flt-1 mdx мышам приводило к улучшенному прохождению теста на хватание (верхняя панель) и теста на бегущей дорожке (нижняя панель) по сравнению с контрольными mdx мышами, которым вводили ФСБ. Силу хватки животных независимо измеряли по три раза для каждого животного с 30-минутными интервалами между испытаниями. Общее пройденное на бегущей дорожке расстояние измеряли по три раза для каждого животного.

На фиг. 12 приведены типовые результаты, иллюстрирующие *in vivo* снижение количества свободного растворимого Flt1 в сыворотке крови. Введение антитела к Flt-1 mdx мышам приводило к значительному снижению уровней растворимого Flt1 в крови по сравнению с изотипическим контрольным антителом. Животных, начиная с возраста 4-х недель, дважды в неделю на протяжении четырех недель дозировали по 20 мг/кг. После вскрытия забирали кровь для проведения анализа на биомаркеры. $^{***}p < 0,001$ по сравнению с изотипом.

На фиг. 13 приведены типовые результаты, иллюстрирующие *in vivo* повышение концентрации VEGF в сыворотке крови. Введение антитела к Flt-1 mdx мышам приводило к значительному повышению уровней свободного VEGF в крови по сравнению с изотипическим контрольным антителом. Животных, начиная с возраста 4-х недель, дважды в неделю на протяжении четырех недель дозировали по 20 мг/кг. После вскрытия забирали кровь для проведения анализа на биомаркеры. $^{***}p = 0,0063$ по сравнению с изотипом.

На фиг. 14 приведены типовые результаты, иллюстрирующие *in vivo* повышение ангиогенеза в мышцах диафрагмы. Введение антитела к Flt-1 mdx мышам приводило к значительному повышению пролиферации эндотелиальных клеток, примером чего является окрашивание CD31, в мышцах диафрагмы по сравнению с изотипическим контрольным антителом. Животных, начиная с возраста 4-х недель, дважды в неделю на протяжении четырех недель дозировали по 20 мг/кг. Ткани после вскрытия сохраняли для проведения гистопатологии. Проиллюстрировано окрашивание в отношении CD31-маркера эндотелиальных клеток. Наблюдали статистически значимое увеличение ($p < 0,05$) количества эндотелиальных клеток после обработки моноклональным анти-Flt-1-антителом. Данные анализировали при помощи программного обеспечения для автоматической количественной визуализации. Опыты проводили в слепом для исследователя режиме.

Определения

Для того чтобы настоящее изобретение было более понятным, ниже приведены определения некоторых терминов. Дополнительные определения для следующих терминов и других терминов приведены в тексте описания.

Животное.

Употребляемый в данном документе термин "животное" относится к любому представителю животного царства. В некоторых вариантах реализации изобретения "животное" относится к человеку на любой стадии развития. В некоторых вариантах реализации изобретения "животное" относится к животным, за исключением человека на любой стадии развития. В определенных вариантах реализации изобретения животное, за исключением человека, представляет собой млекопитающее (например, грызуна, мышь, крысу, кролика, обезьяну, собаку, кошку, овцу, крупный рогатый скот, примата и/или свинью). В некоторых вариантах реализации изобретения животные включают, но не ограничиваются этим, млекопитающих, птиц, рептилий, амфибий, рыб, насекомых и/или червей. В некоторых вариантах реализации изобретения животное может быть трансгенным животным, животным, полученным методами генной инженерии, и/или клоном.

Антитело.

Употребляемый в данном документе термин "антитело" относится к любому иммуноглобулину, как природного происхождения, так и полностью или частично полученному синтетическим путем. Все его производные, которые сохраняют специфическую связывающую способность, также включены в этот термин. Этот термин также включает любой белок, содержащий связывающий домен, который является гомологичным или в значительной степени гомологичным иммуноглобулин-связывающему домену. Такие белки могут быть получены из природных источников или полностью или частично получены синтетическим путем. Антитело может быть моноклональным или поликлональным. Антитело может являться представителем любого класса иммуноглобулинов, включая любой из классов человека: IgG, IgM, IgA, IgD и IgE. В определенных вариантах реализации изобретения антитело может являться представителем иммуноглобулинов класса IgG. Употребляемые в данном документе термины "фрагмент антитела" или

"характеристическая часть антитела" используются взаимозаменяемо и относятся к любому производному антитела, меньшему, чем полноразмерное антитело. В общем случае фрагмент антитела сохраняет по меньшей мере значительную часть специфической связывающей способности полноразмерного антитела. Примеры фрагментов антител включают, но не ограничиваются этим, фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, Fv, диатело dsFv и Fd. Фрагмент антитела можно получить любым способом. Например, фрагмент антитела можно получить ферментативным или химическим путем посредством фрагментации интактного антитела и/или его можно получить рекомбинантным путем из гена, кодирующего часть последовательности антитела. В альтернативном или дополнительном варианте фрагмент антитела может быть полностью или частично получен синтетическим путем. Фрагмент антитела может, необязательно, содержать одноцепочечный фрагмент антитела. В альтернативном или дополнительном варианте фрагмент антитела может содержать несколько цепей, которые соединены вместе посредством, например, дисульфидных связей. Фрагмент антитела может, необязательно, содержать мультимолекулярный комплекс. Функциональный фрагмент антитела, как правило, содержит по меньшей мере около 50 аминокислот и, более часто, содержит по меньшей мере около 200 аминокислот. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело может быть антителом человека. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело может быть гуманизированным антителом.

Антигенсвязывающий фрагмент.

Употребляемый в данном документе термин "антигенсвязывающий фрагмент" относится к части молекулы иммуноглобулина, которая контактирует и связывается с антигеном (т.е. Flt-1).

Приблизительно или около.

Употребляемый в данном документе термин "приблизительно" или "около", применяемый к одной или более представляющим интерес величинам, относится к величине, сходной с установленной исходной величиной. В определенных вариантах реализации изобретения термин "приблизительно" или "около" относится к диапазону величин, составляющему 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% или менее в обе стороны (больше или меньше) от установленной исходной величины, если не указано иное или иное не очевидно из контекста (за исключением случаев, когда такое числовое значение превышает 100% от возможной величины).

Биологически активный.

Употребляемое в данном документе выражение "биологически активный" относится к характеристике любого вещества, которое обладает активностью в биологической системе и, в частности, в организме. Например, вещество, которое при введении в организм оказывает на этот организм биологическое воздействие, считается биологически активным. В конкретных вариантах реализации изобретения, если пептид является биологически активным, часть такого пептида, которая обладает по меньшей мере одним видом биологической активности пептида, как правило, называется "биологически активной" частью. В определенных вариантах реализации изобретения пептид, который не обладает естественной биологической активностью, но подавляет связывание одного или более лигандов VEGF, считается биологически активным.

Носитель или разбавитель.

Употребляемые в данном документе термины "носитель" и "разбавитель" относятся к фармацевтически приемлемому (например, безопасному и нетоксичному для применения на людях) веществу, выполняющему функцию носителя или разбавителя, применяемому для получения фармацевтической лекарственной формы. Типовые разбавители включают стерильную воду, бактериостатическую воду для инъекций (БВДИ), рН буферный раствор (например, фосфатно-солевой буферный раствор), стерильный солевой раствор, раствор Рингера или раствор декстрозы.

Лекарственная форма.

Употребляемые в данном документе термины "лекарственная форма" и "единичная лекарственная форма" относятся к физически дискретной единице терапевтического белка (например, антитела) для пациента, получающего лечение. Каждая единица содержит predetermined количество активного материала, рассчитанного так, чтобы оказывать необходимое терапевтическое действие. При этом следует понимать, что общую дозировку композиции определяет лечащий врач по результатам тщательного медицинского обследования.

Функциональный эквивалент или функциональное производное.

Употребляемые в данном документе термины "функциональный эквивалент" и "функциональное производное" в контексте функционального производного аминокислотной последовательности обозначают молекулу, которая сохраняет биологическую активность (функциональную или структурную), которая в значительной мере сходна с таковой для оригинальной последовательности. Функциональное производное или функциональный эквивалент может быть производным природного происхождения или полученным синтетическим путем. Типовые функциональные производные включают аминокислотные последовательности, содержащие замены, делеции или вставки одной или более аминокислот, при условии, что биологическая активность белка сохраняется. Желательно, чтобы замещающая аминокислота имела химико-физические свойства, сходные с таковыми у замещенной аминокислоты. Необходимые химико-физические свойства включают сходство заряда, объема, гидрофобности, гидрофильности и то-

му подобного.

Слитый белок.

Употребляемый в данном документе термин "слитый белок" или "химерный белок" относится к белку, полученному в результате соединения двух или более изначально отдельных белков или их частей. В некоторых вариантах реализации изобретения между белками может находиться линкер или спейсер.

Время полужизни.

Употребляемый в данном документе термин "время полужизни" обозначает время, необходимое для того, чтобы такая величина, как концентрация или активность белка снизилась до половины своего значения, определенного в начальный момент времени.

Гипертрофия.

Употребляемый в данном документе термин "гипертрофия" относится к увеличению объема органа или ткани вследствие увеличения составляющих его клеток.

Улучшаться, повышаться или снижаться.

Употребляемые в данном документе термины "улучшаться", "повышаться" или "снижаться" или их грамматические эквиваленты дают возможность оценивать величины относительно базового измерения, такого как измерение, проведенное для одного и того же индивида до начала лечения, описанного в данном документе, или измерение, проведенное для контрольного субъекта (или нескольких контрольных субъектов) в отсутствие лечения, описанного в данном документе. "Контрольным субъектом" является субъект, имеющий ту же самую форму заболевания, что и проходящий лечение субъект, приблизительно того же возраста, что и проходящий лечение субъект.

In Vitro.

Употребляемый в данном документе термин "in vitro" относится к процессам, которые происходят в искусственной среде, например, в пробирке или реакционном сосуде, в клеточной культуре и т.д., а не в многоклеточном организме.

In Vivo.

Употребляемый в данном документе термин "in vivo" относится к процессам, которые происходят в многоклеточном организме, таком как человек или животное за исключением человека. В контексте клеточных систем указанный термин может использоваться для описания процессов, которые происходят внутри живой клетки (в противоположность, например, in vitro системам).

Линкер.

Употребляемый в данном документе термин "линкер" в случае слитого белка относится к аминокислотной последовательности, отличной от той, которая находится в данном конкретном положении белка природного происхождения и которая в общем случае сконструирована так, чтобы быть гибкой или чтобы в промежутке между двумя белковыми компонентами разместить структуру, такую как α -спираль. Линкер также называют спейсером. Как правило, линкер или спейсер не обладает собственной биологической функцией.

Фармацевтически приемлемый.

Употребляемый в данном документе термин "фармацевтически приемлемый" относится к веществам, которые в рамках медицинской оценки подходят для применения в контакте с тканями людей и животных без проявлений чрезмерной токсичности, раздражения, аллергических реакций или других проблем или осложнений и соответствуют целесообразному соотношению между эффективностью и риском.

Полипептид.

Употребляемый в данном документе термин "полипептид" относится к непрерывной цепи из аминокислот, соединенных между собой пептидными связями. Данный термин употребляется для обозначения аминокислотной цепи любой длины, но специалисту в данной области техники понятно, что этот термин не ограничивается протяженными цепями и может относиться к минимальной цепи, содержащей две аминокислоты, соединенные друг с другом пептидной связью. Как известно специалистам в данной области техники, полипептиды могут быть процессированными и/или модифицированными.

Предотвращать.

Термин "предотвращать" или "предотвращение", употребляемый в данном документе в связи с появлением заболевания, нарушения и/или патологического состояния, относится к снижению риска развития заболевания, нарушения и/или патологического состояния. Смотрите определение термина "риск".

Белок.

Употребляемый в данном документе термин "белок" относится к одному или более полипептидам, которые функционируют как дискретная единица. Если единичный полипептид представляет собой дискретную функциональную единицу и не требует постоянной или временной ассоциации с другими полипептидами для образования дискретной функциональной единицы, термины "полипептид" и "белок" можно использовать взаимозаменяемо. Если дискретная функциональная единица состоит из более чем одного полипептида, физически ассоциированного с другим, термин "белок" относится к нескольким полипептидам, которые физически соединены и функционируют вместе как дискретная единица.

Риск.

Как будет понятно из контекста, "риск" возникновения заболевания, нарушения и/или патологического состояния включает вероятность того, что у конкретного индивида разовьется заболевание, нарушение и/или патологического состояние (например, МДД). В некоторых вариантах реализации изобретения риск выражают в виде процентного соотношения. В некоторых вариантах реализации изобретения риск составляет от 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 вплоть до 100%. В некоторых вариантах реализации изобретения риск выражают в виде риска относительно риска, ассоциированного с контрольным образцом или группой контрольных образцов. В некоторых вариантах реализации изобретения контрольный образец или группа контрольных образцов характеризуются известным риском возникновения заболевания, нарушения, патологического состояния и/или случая (например, МДД). В некоторых вариантах реализации изобретения контрольный образец или группа контрольных образцов получены от индивидов, сопоставимых с данным конкретным индивидом. В некоторых вариантах реализации изобретения относительный риск составляет 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более.

Поперечнополосатые мышцы.

Употребляемый в данном документе термин "поперечнополосатые мышцы" относится к многоядерной мышечной ткани с регулярным расположением внутриклеточных сократительных единиц - саркомеров, что приводит к появлению исчерченности при наблюдении в микроскоп, и находящейся под произвольным управлением. Как правило, поперечнополосатые мышцы могут представлять собой сердечную мышцу, скелетные мышцы и бранхиомерные мышцы.

Гладкие мышцы.

Употребляемый в данном документе термин "гладкие мышцы" относится к непроизвольно управляемым, не имеющим исчерченности мышцам, включая единичные и многоединичные мышцы.

Субъект.

Употребляемый в данном документе термин "субъект" относится к любому человеку или животному, отличному от человека (например, мыши, крысы, кролику, собаке, кошке, рогатому скоту, свинье, овце, лошади или примату). Термин человек включает пре- и постнатальные формы. Во многих вариантах реализации изобретения субъект является человеком. Субъект может быть пациентом, что означает человека, обратившегося к медицинскому работнику в целях диагностирования или лечения заболевания. Термин "субъект" взаимозаменяемо употребляется в данном документе с терминами "индивид" или "пациент". Субъект может страдать или быть предрасположенным к заболеванию или нарушению, но при этом может проявлять или не проявлять симптомы данного заболевания или нарушения.

В значительной степени.

Употребляемый в данном документе термин "в значительной степени" относится к качественному условию проявления в полной или практически полной степени представляющей интерес характеристики или свойства. Специалисту в области техники биологии понятно, что в биологических и химических явлениях в редких случаях, если это вообще происходит, процессы идут до полного завершения и/или протекают до полного завершения или удается достичь или избежать абсолютного результата. Следовательно, термин "в значительной степени" используется в данном документе, чтобы отобразить отсутствие полного завершения, характерное для многих биологических и химических явлений.

Значительная степень гомологии.

Употребляемое в данном документе выражение "значительная степень гомологии" относится к сравнению между аминокислотными или нуклеотидными последовательностями. Как известно специалистам в данной области техники, считается, что две последовательности в общем случае являются "в значительной степени гомологичными", если они содержат гомологичные остатки в соответствующих положениях. Гомологичные остатки могут быть идентичными остатками. В другом варианте гомологичные остатки могут быть неидентичными остатками с соответствующим образом сходными структурными и/или функциональными характеристиками. Например, как хорошо известно специалистам в данной области техники, определенные аминокислоты обычно классифицируются как "гидрофобные" или "гидрофильные аминокислоты", и/или как содержащие "полярные" или "неполярные" боковые цепи. Замена одной аминокислоты на другую того же самого типа часто может считаться "гомологичной" заменой.

Как хорошо известно в данной области техники, проводить сравнение аминокислотных или нуклеотидных последовательностей можно при помощи различных алгоритмов, включая алгоритмы, доступные в виде коммерческих компьютерных программ, таких как BLASTN для нуклеотидных последовательностей и BLASTP, BLAST с учетом гэпов, и PSI-BLAST для аминокислотных последовательностей. Типовые программы описаны в Altschul, et al, basic local alignment search tool, J. Mol. Biol, 215(3): 403-410, 1990; Altschul, et al., Methods in Enzymology; Altschul, et al., "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1997; Baxevanis, et al., Bioinformatics : A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Wiley, 1998; и Misener, et al., (eds.), Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, Vol. 132), Humana Press, 1999. Кроме определения гомологичных последовательностей, вышеупомянутые программы, как правило, дают возможность определять степень гомологии. В некоторых вариантах реализации изобретения две последовательности считаются в значительной степени гомологичными, если по меньшей мере 50%, 55%, 60%,

65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше их соответствующих остатков являются гомологичными на протяжении представляющего интерес фрагмента из остатков. В некоторых вариантах реализации изобретения представляющий интерес фрагмент является полной последовательностью. В некоторых вариантах реализации изобретения представляющий интерес фрагмент составляет по меньшей мере 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 или более остатков.

Значительная степень идентичности.

Выражение "значительная степень идентичности" употребляется в данном документе для сравнения между аминокислотными или нуклеотидными последовательностями. Как известно специалистам в данной области техники, считается, что две последовательности в общем случае являются "в значительной степени идентичными", если они содержат идентичные остатки в соответствующих положениях. Как хорошо известно в данной области техники, проводить сравнение аминокислотных или нуклеотидных последовательностей можно при помощи различных алгоритмов, включая алгоритмы, доступные в виде коммерческих компьютерных программ, таких как BLASTN для нуклеотидных последовательностей и BLASTP, BLAST с учетом гэпов, и PSI-BLAST для аминокислотных последовательностей. Типовые программы описаны в Altschul, et al, Basic local alignment search tool, J. Mol. Biol, 215(3): 403-410, 1990; Altschul, et al, Methods in Enzymology; Altschul et al, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1997; Baxevanis et al., Bioinformatics : A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Wiley, 1998; и Misener, et al., (eds.), Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, Vol. 132), Humana Press, 1999. Кроме определения идентичных последовательностей, вышеупомянутые программы, как правило, дают возможность определять степень идентичности. В некоторых вариантах реализации изобретения две последовательности считаются в значительной степени идентичными, если по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше их соответствующих остатков являются идентичными на протяжении представляющего интерес фрагмента из остатков. В некоторых вариантах реализации изобретения представляющий интерес фрагмент является полной последовательностью. В некоторых вариантах реализации изобретения представляющий интерес фрагмент составляет по меньшей мере 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 или более остатков.

Страдать.

Индивидом, который "страдает" заболеванием, нарушением и/или патологическим состоянием, считается тот, у кого были диагностированы или кто проявляет симптомы этого заболевания, нарушения и/или патологического состояния.

Предрасположен к.

Индивидом, который "предрасположен к" заболеванию, нарушению и/или патологическому состоянию, считается тот, у кого не было диагностировано заболевание, нарушение и/или патологическое состояние. В некоторых вариантах реализации изобретения индивид, который предрасположен к заболеванию, нарушению и/или патологическому состоянию, может не проявлять симптомов заболевания, нарушения и/или патологического состояния. В некоторых вариантах реализации изобретения индивида, который предрасположен к заболеванию, нарушению, патологическому состоянию или случаю (например, МДД), можно охарактеризовать одним или более из следующих признаков: (1) наличием генетической мутации, ассоциируемой с развитием заболевания, нарушения и/или патологического состояния; (2) наличием генетического полиморфизма, ассоциируемого с развитием заболевания, нарушения и/или патологического состояния; (3) повышенной и/или сниженной экспрессией и/или активностью белка, ассоциируемой с заболеванием, нарушением и/или патологическим состоянием; (4) привычками и/или образом жизни, ассоциируемыми с развитием заболевания, нарушения, патологического состояния и/или случая; (5) перенесенной, планируемой или требующейся трансплантацией. В некоторых вариантах реализации изобретения у индивида, который предрасположен к заболеванию, нарушению и/или патологическому состоянию, со временем разовьется заболевание, нарушение и/или патологическое состояние. В некоторых вариантах реализации изобретения у индивида, который предрасположен к заболеванию, нарушению и/или патологическому состоянию, со временем не разовьется заболевание, нарушение и/или патологическое состояние.

Ткани-мишени.

Употребляемый в данном документе термин "ткани-мишени" относится к любой ткани, пораженной заболеванием, лечение которого проводят, например, МДД. В некоторых вариантах реализации изобретения ткани-мишени включают те ткани, которые проявляют связанные с заболеванием патологию, симптом или признак, включая, но не ограничиваясь этим, мышечную атрофию, деформацию скелета, кардиомиопатию, мышечную ишемию, когнитивные расстройства и нарушение дыхательной функции.

Терапевтически эффективное количество.

Употребляемый в данном документе термин "терапевтически эффективное количество" терапевтического вещества означает количество, которое является достаточным при введении субъекту, страдающему от или предрасположенному к заболеванию, нарушению и/или патологическому состоянию, для того, чтобы излечить, диагностировать, предотвратить и/или отсрочить проявление симптома(ов) заболе-

вания, нарушения и/или патологического состояния. Специалистам в данной области техники понятно, что терапевтически эффективное количество обычно вводится в режиме дозирования, включающем по меньшей мере одну однократную дозу.

Лечение.

Употребляемый в данном документе термин "лечить" или "лечение" относится к любому способу, применяемому для того чтобы частично или полностью облегчать, уменьшать, снимать, подавлять, предотвращать, откладывать начало, снижать степень тяжести и/или снижать частоту возникновения одного или более симптомов или признаков конкретного заболевания, нарушения и/или патологического состояния. Лечение можно применять к субъекту, который не проявляет признаков заболевания и/или проявляет только ранние признаки заболевания, в целях снижения риска развития патологии, связанной с заболеванием.

Подробное описание некоторых вариантов реализации изобретения

В настоящем изобретении, помимо прочего, предложены способы и композиции для лечения мышечной дистрофии, включая мышечную дистрофию Дюшенна (МДД) и/или мышечную дистрофию Беккера, включающие применение анти-Flt-1-антител или их антигенсвязывающих фрагментов в качестве лекарственного средства. В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложены способы лечения МДД, включающие введение индивиду, страдающему или предрасположенному к МДД, эффективного количества антител Flt-1 или их антигенсвязывающих фрагментов, в результате чего происходит снижение интенсивности, тяжести или частоты или откладывается начало проявления по меньшей мере одного симптома или признака МДД.

В следующих разделах подробно описаны различные аспекты изобретения.

Использование разделов не ограничивает изобретение. Каждый раздел можно применять к любому аспекту изобретения. В настоящей заявке употребление "или" обозначает "и/или", если не указано иное.

Мышечная дистрофия Дюшенна (МДД)

МДД представляет собой заболевание, которое характеризуется прогрессирующим ухудшением состояния мышц и утратой связанных с мышечной деятельностью функций во всем организме. Предполагается, что в настоящем изобретении предложены способы и композиции, обеспечивающие возможность замедлить, отложить или предотвратить ухудшение состояния мышц, регенерировать мышцы и обратить, устранить, отложить, предотвратить или минимизировать фиброз, воспаление и другие симптомы или признаки, связанные с МДД и другими мышечными дистрофиями в различных мышечных тканях.

Мышечные ткани

В животном организме существует два основных типа мышечной ткани - поперечнополосатые мышцы и гладкие мышцы. Употребляемый в данном документе термин "поперечнополосатые мышцы" относится к мышечным тканям, содержащим повторяющиеся саркомы. Поперечнополосатые мышцы обычно находятся под произвольным управлением и прикреплены к скелету. Поперечнополосатые мышцы обеспечивают возможность произвольных движений тела и включают основные мышечные группы, включая четырехглавую мышцу, икроножную мышцу, двуглавую мышцу, трехглавую мышцу, трапециевидную мышцу, дельтовидную мышцу и многие другие. Поперечнополосатые мышцы обычно очень длинные, многие поперечнополосатые мышцы способны функционировать независимо. При этом некоторые поперечнополосатые мышцы не присоединены к скелету, включая мышцы рта, ануса, сердца и верхней части пищевода.

С другой стороны, гладкие мышцы имеют весьма отличную структуру. В отличие от группы длинных мышц, отдельно прикрепленных к скелету, гладкие мышцы обычно упорядочены в виде непрерывных слоев с механическими связями между клетками гладкой мускулатуры. Часто гладкие мышцы выстилают стенки полых органов, и обычно они не находятся под произвольным управлением. Гладкие мышцы, выстилающие конкретный орган, должны выполнять одну и ту же нагрузку и сокращаться согласованно. Функции гладких мышц, по меньшей мере частично, заключаются в регулировании изменений нагрузки на полые органы, возникающих в результате движений и/или изменений положения или давления. Эта двойная роль означает, что гладкие мышцы должны быть способны сокращаться не только как поперечнополосатые мышцы, но и тоническим образом, чтобы поддерживать объем органов при постоянных нагрузках. Примерами гладких мышц являются мышцы, выстилающие кровеносные сосуды, бронхиолы, мочевого пузыря и желудочно-кишечный тракт, например, прямую кишку.

Мышечная сила зависит от количества и размера мышечных клеток и их анатомического расположения. Увеличение диаметра мышечного волокна путем синтеза новых миофибрилл (гипертрофия) и/или образования большего количества мышечных клеток (гиперплазия) приведет к увеличению силовой производительности мышц.

Также мышцы можно классифицировать по их расположению или функции.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитело Flt-1 или его антигенсвязывающий фрагмент нацелен на одну или более мышц лица, одну или более жевательных мышц, одну или более мышц языка и шеи, одну или более мышц грудной клетки, одну или более мышц плечевого пояса и рук, одну или более мышц руки и плеча, одну или более передних и задних мышц предплечья, одну или более мышц кисти, одну или более выпрямляющих позвоночник мышц, одну или более мышц тазового пояса и

бедер и/или одну или более мышц голени и стопы.

В некоторых вариантах реализации изобретения мышцы лица включают, но не ограничиваются этим, внутриглазные мышцы, такие как цилиарные мышцы, мышцы, расширяющие зрачок, сфинктер зрачка; мышцы уха, такие как мышцы ушной раковины, височно-теменная мышца, стремениная мышца, мышца, напрягающая барабанную перепонку; мышцы носа, такие как мышца гордецов, носовая мышца, мышца, расширяющая ноздри, мышца, опускающая перегородку носа, мышца, поднимающая верхнюю губу и крыло носа; мышцы рта, такие как мышца, поднимающая угол рта, мышца, опускающая угол рта, круговая мышца рта, щечная мышца, малая и большая скуловые мышцы, подкожная мышца шеи, мышца, поднимающая верхнюю губу, мышца, опускающая нижнюю губу, мышца смеха, подбородочная мышца и/или мышца, сморщивающая бровь.

В некоторых вариантах реализации изобретения жевательные мышцы включают, но не ограничиваются этим, жевательную мышцу, височную мышцу, медиальную крыловидную мышцу, боковую крыловидную мышцу. В некоторых вариантах реализации изобретения мышцы языка и шеи включают, но не ограничиваются этим, подбородочноязычную мышцу, шилоязычную мышцу, небноязычную мышцу, подъязычно-язычную мышцу, двубрюшную мышцу, шилоподъязычную мышцу, челюстноподъязычную мышцу, подбородочно-подъязычную мышцу, лопаточно-подъязычную мышцу, грудиноподъязычную мышцу, грудинощитовидную мышцу, щитовидно-подъязычную мышцу, грудино-ключично-сосцевидную мышцу, переднюю лестничную мышцу, среднюю лестничную мышцу и/или заднюю лестничную мышцу.

В некоторых вариантах реализации изобретения мышцы грудной клетки, плечевого пояса и рук включают, но не ограничиваются этим, подключичную мышцу, большую грудную мышцу, малую грудную мышцу, прямую мышцу живота, наружную косую мышцу живота, внутреннюю косую мышцу живота, поперечную мышцу живота, диафрагму, наружные межреберные мышцы, внутренние межреберные мышцы, переднюю зубчатую мышцу, трапецевидную мышцу, мышцу, поднимающую лопатку, большую ромбовидную мышцу, малую ромбовидную мышцу, широчайшую мышцу спины, дельтовидную мышцу, подлопаточную мышцу, надостную мышцу, подостную мышцу, большую круглую мышцу, малую круглую мышцу и/или клювовидно-плечевую мышцу.

В некоторых вариантах реализации изобретения мышцы руки и плеча включают, но не ограничиваются этим, длинную головку двуглавой мышцы плеча, короткую головку двуглавой мышцы плеча, длинную головку трехглавой мышцы плеча, латеральную головку трехглавой мышцы плеча, медиальную головку трехглавой мышцы плеча, локтевую мышцу, круглый пронатор, супинатор и/или плечевую мышцу.

В некоторых вариантах реализации изобретения передние и задние мышцы предплечья включают, но не ограничиваются этим, плечелучевую мышцу, лучевой сгибатель запястья, локтевой сгибатель запястья, длинную ладонную мышцу, локтевой разгибатель запястья, длинный лучевой разгибатель запястья, короткий лучевой разгибатель запястья, разгибатель пальцев, разгибатель мизинца.

В некоторых вариантах реализации изобретения мышцы кисти включают, но не ограничиваются этим, возвышение большого пальца кисти, короткую мышцу, отводящую большой палец кисти, короткий сгибатель большого пальца кисти, мышцу, противопоставляющую большой палец кисти, возвышение мизинца, мышцу, отводящую мизинец, короткий сгибатель мизинца, мышцу, противопоставляющую мизинец кисти, ладонные межкостные мышцы, тыльные межкостные мышцы кисти и/или червеобразные мышцы кисти.

В некоторых вариантах реализации изобретения мышцы, выпрямляющие позвоночник, включают, но не ограничиваются этим, шейные мышцы, спинные мышцы, длиннейшую мышцу спины и/или подвздошно-реберную мышцу.

В некоторых вариантах реализации изобретения мышцы тазового пояса и бедер включают, но не ограничиваются этим, большую поясничную мышцу, подвздошную мышцу, квадратную мышцу бедра, длинную приводящую мышцу, короткую приводящую мышцу, большую приводящую мышцу, тонкую мышцу, портняжную мышцу, четырехглавую мышцу бедра, например, прямую мышцу бедра, латеральную широкую мышцу бедра, медиальную широкую мышцу бедра, промежуточную широкую мышцу бедра, икроножную мышцу, третью малоберцовую мышцу, камбаловидную мышцу, большую ягодичную мышцу, среднюю ягодичную мышцу, малую ягодичную мышцу, мышцы задней поверхности бедра: двуглавую мышцу бедра: длинную головку, мышцы задней поверхности бедра: двуглавую мышцу бедра: короткую головку, мышцы задней поверхности бедра: полусухожильную мышцу, мышцы задней поверхности бедра: полуперепончатую мышцу, напрягатель широкой фасции бедра, гребенчатую мышцу и/или переднюю большеберцовую мышцу.

В некоторых вариантах реализации изобретения мышцы голени и стопы включают, но не ограничиваются этим, длинный разгибатель пальцев стопы, длинный разгибатель большого пальца стопы, короткую малоберцовую мышцу, подошвенную мышцу, заднюю большеберцовую мышцу, длинный сгибатель большого пальца стопы, короткий разгибатель пальцев стопы, короткий разгибатель большого пальца стопы, мышцу, отводящую большой палец стопы, короткий сгибатель большого пальца стопы, мышцу, отводящую мизинец стопы, короткий сгибатель мизинца стопы, мышцу, противопоставляющую мизинец

стопы, короткий разгибатель пальцев стопы, червеобразные мышцы стопы, квадратную мышцу подошвы, короткий сгибатель пальцев стопы, тыльные межкостные мышцы стопы и/или подошвенные межкостные мышцы.

Типовые мышечные мишени приведены в таблице.

Таблица 1

КРУГОВАЯ МЫШЦА ГЛАЗА			
Внутриглазные: цилиарные мышцы, мышцы, расширяющие зрачок, сфинктер зрачка			
Мышцы уха: мышцы ушной раковины, височно-теменная мышца, стременинная мышца, мышца, напрягающая барабанная перепонку			
Мышцы носа: мышца гордецов, носовая мышца, мышца, расширяющая ноздри, мышца, опускающая перегородку носа, мышца, поднимающая верхнюю губу и крыло носа			
Мышцы рта: мышца, поднимающая угол рта, мышца, опускающая угол рта, круговая мышца рта			
Щечная мышца	Малая и большая скуловые мышцы	Подкожная мышца шеи	Мышца, поднимающая верхнюю губу
Мышца, опускающая нижнюю губу	Мышца смеха	Подбородочная мышца	Мышца, сморщивающая бровь
Локтевая мышца	Круглый пронатор	Супинатор	Плечевая мышца
ЖЕВАТЕЛЬНЫЕ МЫШЦЫ			
Жевательная мышца	Височная мышца	Медиальная крыловидная мышца	Боковая крыловидная мышца
МЫШЦЫ ЯЗЫКА И ШЕИ			

Подбородочноязычная мышца	Шилоязычная мышца	Небная мышца	Подъязычно-язычная мышца
Двубрюшная мышца	Шилоподъязычная мышца	Челюстноподъязычная мышца	Подбородочно-подъязычная мышца
Лопаточно-подъязычная мышца	Грудиноподъязычная мышца	Грудинощитовидная мышца	Щитовидно-подъязычная мышца
Грудино-ключично-сосцевидная мышца	Передняя лестничная мышца	Средняя лестничная мышца	Задняя лестничная мышца
МЫШЦЫ ГРУДНОЙ КЛЕТКИ, ПЛЕЧЕВОГО ПОЯСА И РУК			
Подключичная мышца	Большая грудная мышца	Малая грудная мышца	Прямая мышца живота
Наружная косая мышца живота	Внутренняя косая мышца живота	Поперечная мышца живота	Диафрагма
Наружные межреберные мышцы	Внутренние межреберные мышцы	Передняя зубчатая мышца	Трапецевидная мышца
Мышца, поднимающая лопатку	Большая ромбовидная мышца	Малая ромбовидная мышца	Широчайшая мышца спины
Дельтовидная мышца	Подлопаточная мышца	Надостная мышца	Подостная мышца
Большая круглая мышца	Малая круглая мышца	Клювовидно-плечевая мышца	
РУКИ И ПЛЕЧИ			
Длинная головка двуглавой мышцы плеча	Короткая головка двуглавой мышцы плеча	Длинная головка трехглавой мышцы плеча	Латеральная головка трехглавой мышцы плеча
Медиальная головка трехглавой мышцы плеча	Локтевая мышца	Круглый пронатор	Супинатор

Плечевая мышца			
МЫШЦЫ ПРЕДПЛЕЧЬЯ: передние и задние			
Плечелучевая мышца	Лучевой сгибатель запястья	Локтевой сгибатель запястья	Длинная ладонная мышца
Локтевой разгибатель запястья	Длинный лучевой разгибатель запястья	Короткий лучевой разгибатель запястья	Разгибатель пальцев
Разгибатель мизинца	мышцы, выпрямляющие позвоночник: шейные мышцы	мышцы, выпрямляющие позвоночник: спинные мышцы	мышцы, выпрямляющие позвоночник: длиннейшая мышца спины
мышцы, выпрямляющие позвоночник: подвздошно-реберная мышца			
Собственные мышцы кисти: возвышение большого пальца кисти, короткая мышца, отводящая большой палец кисти, короткий сгибатель большого пальца кисти и мышца, противопоставляющая большой палец кисти			
Собственные мышцы кисти: возвышение мизинца, мышца, отводящая мизинец, короткий сгибатель мизинца и мышца, противопоставляющая мизинец кисти			
Собственные мышцы кисти: ладонные межкостные мышцы, тыльные межкостные мышцы кисти и червеобразные мышцы кисти			
МЫШЦЫ ТАЗОВОГО ПОЯСА И БЕДЕР			
Подвздошно-поясничные: большая поясничная мышца	Подвздошно-поясничные: подвздошная мышца	квадратная мышца бедра	Длинная приводящая мышца
Короткая приводящая мышца	Большая приводящая мышца	Тонкая мышца	Портняжная мышца

Четырехглавая мышца бедра: прямая мышца бедра	Четырехглавая мышца бедра: латеральная широкая мышца бедра	Четырехглавая мышца бедра: медиальная широкая мышца бедра	Четырехглавая мышца бедра: промежуточная широкая мышца бедра
Икроножная мышца	Третья малоберцовая мышца	Камбаловидная мышца	Большая ягодичная мышца
Средняя ягодичная мышца	Малая ягодичная мышца	Мышцы задней поверхности бедра: длинная головка двуглавой мышцы бедра	Мышцы задней поверхности бедра: короткая головка двуглавой мышцы бедра
Мышцы задней поверхности бедра: полусухожильная мышца	Мышцы задней поверхности бедра: полуперепончатая мышца	Напрягатель широкой фасции бедра	Гребенчатая мышца
Передняя большеберцовая мышца			
МЫШЦЫ ГОЛЕНИ И СТОПЫ			
Длинный разгибатель пальцев стопы	Длинный разгибатель большого пальца стопы	короткая малоберцовая мышца	подошвенная мышца
Задняя большеберцовая мышца	Длинный сгибатель большого пальца стопы	короткий разгибатель пальцев стопы	короткий разгибатель большого пальца стопы
Мышца, отводящая большой палец стопы	короткий сгибатель большого пальца стопы	Мышца, отводящая мизинец стопы	короткий сгибатель мизинца стопы
мышца, противопоставляющая мизинец стопы	короткий разгибатель пальцев стопы	червеобразные мышцы стопы	квадратная мышца подошвы
Короткий сгибатель пальцев стопы	тыльные межкостные мышцы стопы	подошвенные межкостные мышцы	

Мышечная дистрофия

Мышечные дистрофии представляют собой группу наследственных нарушений, которые приводят к мышечной дегенерации, результатом которой является слабость и нарушение движений. Основным признаком всех мышечных дистрофий является то, что они имеют прогрессирующий характер. Мышечные дистрофии включают, но не ограничиваются этим: мышечную дистрофию Дюшенна (МДД), мышечную дистрофию Беккера (МДБ), мышечную дистрофию Эмери-Дрейфуса, плече-лопаточно-лицевую мышечную дистрофию, тазово-плечевую мышечную дистрофию и миотоническую дистрофию типов 1 и 2, включая врожденную форму миотонической дистрофии типа 1. Симптомы могут варьироваться в зависимости от типа мышечной дистрофии, при этом могут поражаться только некоторые или все мышцы. Типовые симптомы мышечных дистрофий включают замедленное развитие мышечных двигательных навыков, затруднения в работе одной или более мышечных групп, затруднения при глотании, разговоре или употреблении пищи, слюнотечение, птоз века, частые падения, потерю силы мышц или группой мышц в зрелом возрасте, потерю объема мышц, проблемы с ходьбой вследствие слабости или изменения

биомеханики организма и/или когнитивные или поведенческие нарушения/умственную отсталость.

Хотя не существует известного лечения мышечных дистрофий, применяют несколько поддерживающих методик лечения, которые включают как симптоматическую, так и модифицирующую течение болезни терапию. При мышечных дистрофиях применяют кортикостероиды, ингибиторы АПФ, блокаторы ангиотензиновых рецепторов, физиотерапию, ортопедические аппараты, инвалидные коляски или другие вспомогательные медицинские устройства для обеспечения повседневной жизнедеятельности и легочной функции. Для предотвращения внезапной смерти от сердечных аритмий при миотонической дистрофии применяют кардиостимуляторы. Протимиотонические препараты, которые облегчают симптомы миотонии (неспособности расслаблять мышцы), включают мексилетин и, в некоторых случаях, фенитоин, прокаиамид и хинин.

Мышечная дистрофия Дюшенна

Мышечная дистрофия Дюшенна (МДД) представляет собой рецессивную X-сцепленную форму мышечной дистрофии, которая приводит к мышечной дегенерации и последующей смерти. МДД характеризуется слабостью проксимальных мышц, аномальной походкой, гипертрофией икроножных мышц и повышенным уровнем креатинкиназы. Многих пациентов с МДД диагностируют в возрасте около 5 лет, когда соответствующие симптомы/признаки становятся, как правило, более очевидными. Пораженные болезнью индивиды, как правило, перестают ходить в возрасте около 10-13 лет и умирают, раньше или позже, после 20 вследствие кардиореспираторных нарушений.

Заболевание МДД является следствием мутации в гене дистрофина, находящемся в X-хромосоме человека, который кодирует белок дистрофии, являющийся важным структурным компонентом мышечной ткани и обеспечивающий стабильность дистрогликанового комплекса (ДГК) клеточной мембраны. Дистрофин соединяет внутреннюю цитоплазматическую сеть актиновых филаментов с внеклеточным матриксом, обеспечивая физическую силу мышечным волокнам. Соответственно, изменение структуры или отсутствие дистрофина приводит к аномальной мембранной функции сарколеммы и некрозу мышечных волокон. Хотя носителями мутации могут быть представители обоих полов, у женщин редко проявляются тяжелые признаки заболевания.

Основным симптомом МДД является мышечная слабость, связанная с мышечной атрофией, при этом первыми, как правило, поражаются произвольно сокращающиеся мышцы, в особенности мышцы тазовой части бедер, паховой области, бедер, плеч и икроножные мышцы. Мышечная слабость возникает также в руках, шее и других областях. Икры часто увеличены. Признаки и симптомы заболевания обычно появляются до 6 лет, а многие появляются еще в грудном возрасте. Другие физические симптомы включают, но не ограничиваются этим, поздно развивающуюся способность самостоятельно ходить, прогрессирующие затруднения с ходьбой, шагом или бегом, а также окончательную потерю возможности ходить (обычно к 12 годам); частые падения; утомляемость; затруднения с двигательными функциями (бегом, скачками, прыжками); выраженный поясничный лордоз, приводящий к укорочению мышц-сгибателей тазовой части бедер; нарушение функциональности ахиллесова сухожилия и мышц задней поверхности бедра, фиброз соединительной ткани; деформации мышечных волокон; псевдогипертрофию (увеличение) языка и икроножных мышц вследствие замещения мышечной ткани жировой и соединительной тканью; повышенный риск нейроповеденческих нарушений (например, СДВГ), нарушение способности к обучению (дислексию) и непрогрессирующие нарушения специфических когнитивных навыков (в частности, кратковременной вербальной памяти); деформации скелета (включая, в некоторых случаях, сколиоз).

Рецептор Flt-1

Рецептор Flt-1, также известный под названием рецептора 1 фактора роста эндотелия сосудов, представляет собой рецептор, кодируемый геном FLT1. Сигнальные гликопротеины из семейства фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) действуют как эффективные промоторы ангиогенеза во время эмбриогенеза и постнатального роста. В частности, было показано, что связывание лиганда VEGF-A с рецепторами VEGF стимулирует проницаемость сосудов, а также инициирует миграцию, пролиферацию и выживаемость эндотелиальных клеток, а новообразованные эндотелиальные клетки обеспечивают основную структуру новых сосудистых сетей. Доминантная сигнальная молекула VEGF для ангиогенеза, VEGF-A, опосредует передачу сигнала через рецептор-1 VEGF (VEGFR-1, также известный как Flt-1) и рецептор-2 VEGF (VEGFR-2, также известный как Flk-1). Также существует растворимая форма Flt-1 (sFlt-1), но в ней отсутствует внутриклеточный сигнальный домен, и поэтому считается, что она служит только для выполнения регуляторной функции, изолируя VEGF-A или другие лиганды, которые с ней связываются. sFlt-1 и другие молекулы, содержащие сайты связывания Flt-1, не связанные с внутриклеточным путем передачи сигнала, называются "рецепторами-ловушками". Рецепторы Flt-1 и Flk-1 содержат внеклеточный VEGF-A-связывающий домен и внутриклеточный домен тирозинкиназы, и оба демонстрируют экспрессию во время этапа развития и регенерации тканей в гемангиобластах и линиях дифференцировки эндотелиальных клеток. Flt-1 обладает аффинностью связывания VEGF-A ($K_d \sim 2-10$ пМ), приблизительно в 10 раз превышающей соответствующую величину для Flk-1, но более слабый домен тирозинкиназы свидетельствует о том, что ангиогенная передача сигнала после связывания VEGF-A с Flt-1 слабее по сравнению с сигналом Flk-1. В связи с этим, мыши, гомозиготные по нокауту гена Flt-1,

умирали на эмбриональном этапе вследствие повышенного производства эндотелиальных клеток и разрушения системы кровеносных сосудов. И наоборот, мыши, гомозиготные по нокауту гена Flk-1, умирали из-за дефектов развития системы кровеносных сосудов вследствие недостатка образования кровяных островков в желточных мешках во время эмбриогенеза. Для нормального развития нужны оба рецептора, Flt-1 и Flk-1, но избирательное увеличение концентрации VEGF-A может обеспечить лучшее связывание с рецептором Flk-1 и индуцировать проангиогенный эффект, который повышает плотность капилляров и способствует регенерации мышц, уменьшению степени фиброза и воспаления, а также смягчает симптомы и признаки, связанные с МДД и другими мышечными дистрофиями в различных мышечных тканях.

Употребляемый в данном документе термин "рецептор Flt-1" относится как к растворимому, так и к мембранному рецепторам Flt-1 или их функциональным фрагментам.

Анти-Flt-1-антитела

Употребляемый в данном документе термин "анти-Flt-1-антитела" относится к любым антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые связываются с рецептором Flt-1 (например, растворимым или мембранным рецептором Flt-1). В некоторых вариантах реализации изобретения получают анти-Flt-1-антитела, которые связываются с рецепторами Flt-1 с высокой аффинностью. Не привязываясь к какой-либо конкретной теории, считается, что связывание анти-Flt-1-антитела с рецепторами Flt-1 подавляет связывание одного или более эндогенных лигандов с Flt-1 и тем самым создает возможность связывания большего количества доступных лигандов с другими рецепторами VEGF, такими как рецептор Flk-1. В некоторых вариантах реализации изобретения связывание антител с рецепторами Flt-1 увеличивает количество VEGF, доступного для связывания другими рецепторами VEGF. В некоторых вариантах реализации изобретения связывание антител с рецепторами Flt-1 увеличивает количество плацентарного фактора роста (PLGF), доступного для связывания другими рецепторами VEGF.

В некоторых вариантах реализации изобретения анти-Flt-1-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с человеческим Flt-1 с аффинностью, превышающей около 10^{-9} М, превышающей около 10^{-10} М, превышающей около $0,5 \times 10^{-10}$ М, превышающей около 10^{-11} М, превышающей около $0,5 \times 10^{-11}$ М, превышающей около 10^{-12} М или превышающей около $0,5 \times 10^{-12}$ М. Аффинность антитела к Flt-1 можно определить, например, методом поверхностного плазмонного резонанса, такого как метод BIACORE.

В некоторых вариантах реализации изобретения анти-Flt-1-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в конкурентном анализе с человеческим Flt-1 характеризуется величиной IC_{50} менее 100 пМ, менее 10 пМ или менее 1 пМ.

В некоторых вариантах реализации изобретения анти-Flt-1-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент подавляет связывание и/или активность VEGF с рецептором Flt-1. В некоторых вариантах реализации изобретения анти-Flt-1-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент характеризуется определенной в конкурентном анализе величиной IC_{50} подавления связывания VEGF с человеческим Flt-1, составляющей менее 100 пМ, менее 10 пМ или менее 1 пМ.

В некоторых вариантах реализации изобретения анти-Flt-1-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент подавляет связывание и/или активность PLGF с рецептором Flt-1. В некоторых вариантах реализации изобретения анти-Flt-1-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент характеризуется определенной в конкурентном анализе величиной IC_{50} подавления связывания PLGF с человеческим Flt-1, составляющей менее 100 пМ, менее 10 пМ или менее 1 пМ.

В некоторых вариантах реализации изобретения анти-Flt-1-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент избирательно связывает Flt-1 и характеризуется минимальным или не характеризуется наблюдаемым связыванием с другими рецепторами VEGF. В некоторых вариантах реализации изобретения анти-Flt-1-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент избирательно связывает Flt-1 и характеризуется минимальным или не характеризуется наблюдаемым связыванием с VEGFR2 (Flk-1) и/или VEGFR3 (Flt-4).

В некоторых вариантах реализации изобретения анти-Flt-1-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент избирательно связывает человеческий Flt-1 и характеризуется минимальным или не характеризуется наблюдаемым связыванием с рецепторами Flt-1 других млекопитающих (например, с аффинностью связывания менее чем 10^{-7} М или 10^{-6} М). В некоторых вариантах реализации изобретения анти-Flt-1-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент избирательно связывает человеческий Flt-1 и не связывается с обезьяньим Flt-1. В некоторых вариантах реализации изобретения анти-Flt-1-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент избирательно связывает человеческий Flt-1 и не связывается с мышинным Flt-1.

В некоторых вариантах реализации изобретения анти-Flt-1-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывает человеческий Flt-1, а также обезьяньий Flt-1. В некоторых вариантах реализации изобретения анти-Flt-1-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывает человеческий Flt-1, а также мышинный Flt-1.

В некоторых вариантах реализации изобретения анти-Flt-1-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбраны из группы, состоящей из IgG, F(ab')₂, F(ab)₂, Fab', Fab, ScFv, диател, триател и тетрадел.

В некоторых вариантах реализации изобретения анти-Flt-1-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой IgG. В некоторых вариантах реализации изобретения анти-Flt-1-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой IgG1.

В некоторых вариантах реализации изобретения подходящее анти-Flt-1-антитело содержит Fc-домен или его часть, которая связывается с FcRn-рецептором. В неограничивающем примере подходящий Fc-домен может быть получен из иммуноглобулинов, например подкласса IgG В некоторых вариантах реализации изобретения подходящий Fc-домен получен из IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Наиболее подходящие Fc-домены включают домены, полученные из человеческих или гуманизированных антител.

Предполагается, что улучшенное связывание между Fc-доменом и FcRn-рецептором приводит к продлению времени полужизни в сыворотке крови. Таким образом, в некоторых вариантах реализации изобретения подходящий Fc-домен содержит одну или более аминокислотных мутаций, которые приводят к улучшению связывания с FcRn. В данной области техники известно много мутаций в пределах Fc-домена, которые приводят к улучшенному связыванию с FcRn и которые можно адаптировать для практической реализации настоящего изобретения. В некоторых вариантах реализации изобретения подходящий Fc-домен содержит одну или более мутаций в одной или более позициях, соответствующих Thr 250, Met 252, Ser 254, Thr 256, Thr 307, Glu 380, Met 428, His 433 и/или Asn 434 человеческого IgG1.

В некоторых вариантах реализации изобретения анти-Flt-1-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит спейсер и/или соединен с другим компонентом. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер или спейсер содержит последовательность, по меньшей мере на 50% (например, по меньшей мере на 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную

GAPGGGGGAAAAAGGGGGGAP (SEQ ID NO: 1) (GAG-линкер).

В некоторых вариантах реализации изобретения линкер или спейсер содержит последовательность, по меньшей мере на 50% (например, по меньшей мере на 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную

GAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAP (SEQ ID NO: 2) (GAG2-линкер).

В некоторых вариантах реализации изобретения линкер или спейсер содержит последовательность, по меньшей мере на 50% (например, по меньшей мере на 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную

GAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAP (SEQ ID NO: 3) (GAG3-линкер).

Получение ауто-Flt-1-антител и их антигенсвязывающих фрагментов

Подходящее в целях настоящего изобретения рекомбинантное анти-Flt-1-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно получить любыми доступными способами. Например, рекомбинантное анти-Flt-1-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно получить рекомбинантным путем при помощи системы клеток-хозяев, сконструированной для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантное анти-Flt-1-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

В случае рекомбинантного получения антител можно применять любую экспрессионную систему. В качестве нескольких примеров известных экспрессионных систем можно привести, например, яйцеклетку, клетки бакуловирусов, растений, дрожжей или млекопитающих.

В некоторых вариантах реализации изобретения подходящее в целях настоящего изобретения рекомбинантное анти-Flt-1-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент получают в клетках млекопитающих. Неограничивающие примеры клеток млекопитающих, которые можно применять в соответствии с настоящим изобретением, включают линию миеломы мышей штамма BALB/c (NSO/1, ECACC No: 85110503); ретинобласты человека (PER.C6, CruCell, Leiden, The Netherlands); линию почки обезьяны CV1, трансформированную SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651).

В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложено рекомбинантное анти-Flt-1-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, полученное из клеток человека. В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложено рекомбинантное анти-Flt-1-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, полученное из клеток CHO.

Фармацевтическая композиция и введение

В настоящем изобретении дополнительно предложена фармацевтическая композиция, содержащая описанное в данном документе анти-Flt-1-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и физиологически приемлемый носитель или вспомогательное вещество.

Подходящие фармацевтически приемлемые носители включают, но не ограничиваются этим, воду, солевые растворы (например, NaCl), физиологический раствор, забуференный физиологический раствор, спирты, глицерин, этанол, гуммиарабик, растительные масла, бензиловые спирты, полиэтиленгликоли, желатин, углеводы, такие как лактоза, амилоза или крахмал, сахара, такие как маннит, цукроза или другие, декстрозу, стеарат магния, тальк, кремниевую кислоту, вазелин, парфюмерное масло, эфиры жирных кислот, гидроксиметилцеллюлозу, поливинилпирролидон и т.д., а также их комбинации. Фармацевтические препараты при необходимости можно смешивать со вспомогательными веществами (например, лубрикантами, консервантами, стабилизаторами, смачивающими агентами, эмульсификаторами, солями

для изменения осмотического давления, буферами, красителями, ароматизаторами и/или ароматическими веществами и т.д.), которые не вступают в нежелательные реакции с активными компонентами или не влияют на их активность. В предпочтительном варианте реализации изобретения применяют водорастворимый носитель, подходящий для внутривенного введения.

Подходящая фармацевтическая композиция или лекарственный препарат при необходимости может также содержать небольшие количества смачивающих и эмульсифицирующих агентов или буферных агентов для поддержания pH. Композиция может представлять собой жидкий раствор, суспензию, эмульсию, таблетку, пилюлю, капсулу, препарат с замедленным высвобождением или порошок. Также композиция может быть изготовлена в виде суппозитория с традиционными связывающими веществами и носителями, такими как триглицериды. Препараты для перорального применения могут содержать стандартные носители, такие как имеющие фармацевтическую степень чистоты маннит, лактоза, крахмал, стеарат магния, поливинилпироллидон, сахарин натрия, целлюлоза, карбонат магния и т.д.

Фармацевтическую композицию или лекарственный препарат можно изготовить в соответствии со стандартными процедурами в виде фармацевтической композиции, подходящей для введения людям. Например, в некоторых вариантах реализации изобретения композиция для внутривенного введения, как правило, представляет собой раствор в стерильном изотоническом водном буфере. При необходимости композиция также может содержать растворитель и местный анестетик для снижения болевых ощущений в месте инъекции. В общем случае ингредиенты или добавляют отдельно, или смешивают вместе в единичную лекарственную форму, например, как в случае сухого лиофилизированного порошка или безводного концентрата в герметично закрытом контейнере, таком как ампула или пакет с указанием количества активного вещества. Если композиция предназначена для инфузионного введения, его можно развести в инфузионном флаконе, содержащем стерильную, имеющую фармацевтическую степень чистоты воду, солевой раствор или декстрозу/воду. Если композиция предназначена для инъекционного введения, к ней может прилагаться ампула со стерильной водой для инъекции или солевым раствором, чтобы ингредиенты можно было смешивать перед введением.

Пути введения

Описанное в данном документе анти-Flt-1-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (или композицию или лекарственное средство, содержащее анти-Flt-1-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент) вводят любым подходящим путем. В некоторых вариантах реализации изобретения анти-Flt-1-антитело или белок его антигенсвязывающего фрагмента или содержащую указанные вещества фармацевтическую композицию вводят парентерально. Парентеральное введение может представлять собой внутривенное, внутрикожное, интратекальное, ингаляционное, трансдермальное (местное), внутриглазное, внутримышечное, подкожное, внутримышечное и/или трансмукозальное введение. В некоторых вариантах реализации изобретения анти-Flt-1-антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, или содержащую указанные вещества фармацевтическую композицию вводят подкожно. Употребляемый в данном документе термин "подкожная ткань" определяется как слой рыхлой неоднородной соединительной ткани, расположенной непосредственно под кожей. Например, подкожное введение можно осуществлять путем инъекции композиции в области, включающие, но не ограничиваясь этим, область бедра, область живота, ягодичную область или лопаточную область. В некоторых вариантах реализации изобретения анти-Flt-1-антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, или содержащую указанные вещества фармацевтическую композицию вводят внутривенно. В некоторых вариантах реализации изобретения анти-Flt-1-антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, или содержащую указанные вещества фармацевтическую композицию вводят перорально. При необходимости можно параллельно применять более одного пути введения.

В некоторых вариантах реализации изобретения введение приводит только к локальному действию в организме индивида, в то время как в других вариантах реализации изобретения введение приводит к действию в разных частях организма индивида, например, к системному действию. Как правило, введение приводит к доставке анти-Flt-1-антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в одну или более тканей-мишеней, включая, но не ограничиваясь этим, почки, печень, головной мозг, спинной мозг, кишечник, глаза, легкие, селезенку, сердце, поперечнополосатые мышцы и гладкие мышцы.

В некоторых вариантах реализации изобретения поперечнополосатая мышца выбрана из группы, состоящей из трехглавой мышцы, передней большеберцовой мышцы, камбаловидной мышцы, икроножной мышцы, четырехглавой мышцы и диафрагмы.

Лекарственные формы и режим дозирования

В некоторых вариантах реализации изобретения композицию вводят в терапевтически эффективном количестве и/или согласно режиму дозирования, который соответствует конкретному необходимому результату (например, лечению или снижению риска возникновения мышечной дистрофии, такой как мышечная дистрофия Дюшенна).

Конкретные дозировки или количества вводимого препарата в соответствии с настоящим изобретением могут варьироваться, например, в зависимости от природы и/или степени необходимого результата, от конкретного пути и/или времени введения и/или от одной или более характеристик (например, массы, возраста, истории болезни, генетических характеристик, образа жизни, степени тяжести порока сердца,

и/или степени риска возникновения порока сердца и т.д., или их комбинаций). Такие дозировки или количества могут быть определены специалистом в данной области техники. В некоторых вариантах реализации изобретения подходящую дозировку или количество определяют в соответствии со стандартными клиническими методами. В альтернативном или дополнительном варианте в некоторых вариантах реализации изобретения подходящую дозировку или количество определяют при помощи одного или более методов *in vitro* или *in vivo* анализа для выявления необходимых или оптимальных диапазонов доз или количеств вводимого препарата.

В различных вариантах реализации изобретения анти-Flt-1-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в терапевтически эффективном количестве. В общем случае терапевтически эффективного количества достаточно, чтобы достичь заметного положительного эффекта у субъекта (например, лечения, модуляции, исцеления, предотвращения и/или облегчения первопричинного заболевания или патологического состояния). В некоторых конкретных вариантах реализации изобретения подходящие дозировки или количества вводимого препарата можно определить, экстраполируя данные зависимости доза-ответ, полученные для *in vitro* или животных модельных тест-систем.

В некоторых вариантах реализации изобретения предложенную композицию получают в виде фармацевтической лекарственной формы. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическая лекарственная форма представляет собой или содержит единичную дозу для введения согласно режиму дозирования, соответствующему достижению сниженного риска возникновения мышечной дистрофии, такой как мышечная дистрофия Дюшенна.

В некоторых вариантах реализации изобретения лекарственную форму, содержащую описанное в данном документе анти-Flt-1-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вводят в виде единичной дозы. В некоторых вариантах реализации изобретения лекарственную форму, содержащую описанное в данном документе анти-Flt-1-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вводят через регулярные интервалы. Употребляемое в данном документе выражение введение через "интервалы" означает, что терапевтически эффективное количество вводят периодически (в отличие от одноразового дозирования). Интервал можно определить при помощи стандартных клинических методов. В некоторых вариантах реализации изобретения лекарственную форму, содержащую описанное в данном документе анти-Flt-1-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вводят раз в два месяца, ежемесячно, дважды в месяц, раз в три недели, раз в две недели, еженедельно, дважды в неделю, трижды в неделю, ежедневно, дважды в день или каждые 6 ч. Интервал между введениями для каждого отдельного случая не обязательно должен быть фиксированным и может меняться со временем в зависимости от нужд индивида.

Употребляемое в данном документе выражение "раз в два месяца" обозначает введение, осуществляемое раз в два месяца (т.е. один раз каждые два месяца); выражение "ежемесячно" обозначает введение, осуществляемое раз в месяц; выражение "раз в три недели" обозначает введение, осуществляемое раз в три недели (т.е. один раз каждые три недели); выражение "раз в две недели" обозначает введение, осуществляемое раз в две недели (т.е. один раз каждые две недели); выражение "еженедельно" обозначает введение, осуществляемое раз в неделю; а выражение "ежедневно" обозначает введение, осуществляемое раз в день.

В некоторых вариантах реализации изобретения лекарственную форму, содержащую описанное в данном документе анти-Flt-1-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вводят через регулярные интервалы в продолжение неопределенного периода времени. В некоторых вариантах реализации изобретения лекарственную форму, содержащую описанное в данном документе анти-Flt-1-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вводят через регулярные интервалы в продолжение определенного периода времени.

В некоторых вариантах реализации изобретения введение анти-Flt-1-антитела или его антигенсвязывающего фрагмента снижает интенсивность, тяжесть или частоту или откладывает начало проявления по меньшей мере одного признака или симптома МДД. В некоторых вариантах реализации изобретения введение анти-Flt-1-антитела или его антигенсвязывающего фрагмента снижает интенсивность, тяжесть или частоту или откладывает начало проявления по меньшей мере одного признака или симптома МДД, выбранного из группы, состоящей из мышечной атрофии, деформации скелета, кардиомиопатии, мышечной ишемии, когнитивного нарушения и нарушения дыхательной функции.

В некоторых вариантах реализации изобретения введение анти-Flt-1-антитела или его антигенсвязывающего фрагмента улучшает клинический результат согласно оценке по тесту 6-минутной ходьбы, количественному тесту мышечной силы, тесту двигательной активности на время, шкалам функций конечностей Брука и Виноса, тесту легочной функции (жизненной форсированной емкости легких, объема форсированного выдоха за 1 с, пиковой скорости выдоха, максимального давления вдоха и выдоха), связанному с состоянием здоровья качеству жизни, функции сгибателей коленного и локтевого суставов, функции разгибателя локтевого сустава, абдукции плеча, силе хватки, времени подъема из положения лежа на спине, оценке способности к самостоятельному передвижению "North Start", ходьбе/бегу на 10 м на время, шкале Egen Klassification, показателю Говерса, оценке двигательной способности по Хаммерсмитту, количественной миометрии, объему движений, гониометрии, гиперкапнии, индексу развития детей грудного и преддошкольного возраста Бейли и/или нагрузке на лицо, осуществляющее уход за больным.

Комбинированная терапия

В некоторых вариантах реализации изобретения анти-Flt-1-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент применяют в комбинации с одним или более известными лекарственными средствами (например, кортикостероидами), которые в настоящее время применяют для лечения мышечной дистрофии. В некоторых вариантах реализации изобретения известное лекарственное средство (лекарственные средства) вводят в соответствии со стандартным или одобренным для него/них режимом дозирования или схемой лечения. В некоторых вариантах реализации изобретения известное лекарственное средство (лекарственные средства) вводят в соответствии с режимом, который был изменен по сравнению со стандартным или одобренным режимом дозирования или схемой лечения. В некоторых вариантах реализации изобретения такой измененный режим отличается от стандартного или одобренного режима дозирования тем, что было изменено количество препарата, соответствующее одной или более одноразовым дозам (например, уменьшено или увеличено), и/или тем, что была изменена частота дозирования (например, один или более интервалов между приемами одноразовых доз был увеличен, в результате чего частота снижается, или уменьшен, в результате чего частота повышается).

Примеры

Пример 1. Получение и характеристика высокоаффинных анти-Flt-1-антител.

Антитело 01A04

Получали антитело против растворимого Flt-1, применяя стандартную методологию мышинового моноклонального антитела. Вкратце, мышей штамма Balb/c иммунизировали растворимым рекомбинантным человеческим Flt-1 (приобретенным у ABCAM). На 20-й день после иммунизации животных титровали в отношении выработки анти-sFlt-1 методом ELISA (фиг. 1). Обнаружили, что одна мышь демонстрировала высокие титры; это животное стимулировали антигеном и умертвили через 5 дней. Клетки селезенки и лимфатических узлов, полученные от этого животного, сливали с клетками-партнерами мышинной миеломы для получения гибридом. Проводили скрининг гибридомных супернатантов против антигена sFlt-1, а материал с положительным откликом увеличивали в масштабе и повторно оценивали в отношении связывания с человеческим и мышинным sFlt-1, а также в отношении способности конкурировать с sFlt-1 за связывание VEGF. Не было обнаружено перекрестно-реактивных гибридом, которые могли связываться и с человеческим, и с мышинным sFlt-1. При этом конкурентный анализ ELISA определил наличие нескольких антагонистов sFlt-1:VEGF среди гибридом, реактивных в отношении человеческого sFlt-1 (смотрите фиг. 2, на которой проиллюстрирован репрезентативный эксперимент). Партнера по слиянию 01A04, который оказался наиболее эффективным, подвергали трем этапам одноклеточного клонирования для получения моноклонального антитела 01A04. Это антитело дополнительно характеризовали в отношении аффинности связывания с антигеном sFlt-1 (ELISA, BIACORE и FACS); IC₅₀ в конкурентном анализе ELISA для sFlt-1 :VEGF; и эффективности в клеточном анализе.

Характеристики антитела 01A04 - связывание

После клонирования и субклонирования родительского партнера по слиянию многие субклоны родительского 01A04 демонстрировали связывание с иммобилизованным растворимым Flt-1 (фиг. 3). Один из этих субклонов, моноклональный 01A04-02B10-02G07, выбрали для увеличения масштаба и формирования банка клеток на основании связывания антигена, морфологии клона и жизнеспособности. Методом поверхностного плазмонного резонанса (BIACORE, смотрите фиг. 4) определяли константу связывания 01A04-02B10-02G07 с антигеном sFlt-1. Моноклональное антитело 01A04-02B10-02G07 связывается с человеческим sFlt-1 на субнаномолярном уровне.

Характеристики антитела 01A04 - перекрестная реактивность

Связывание моноклонального антитела 01A04 с рецептором Flt-1, экспрессируемым клетками, исследовали методом FACS. Исследовали три трансфицированные клеточные линии, экспрессирующие Flt-1 человека, мыши или яванского макака. Связывание со всеми тремя клеточными линиями исследовали путем инкубации клеток с антителом на протяжении 1 ч. Затем связывание антитела с клетками регистрировали при помощи антимышиного антитела IgG PE. Результаты приведены на фиг. 5. В соответствии с данными ELISA и BIACORE моноклональное антитело 01A04 не связывается с мышинным Flt-1. При этом антитело связывается с Flt-1 человека и яванского макака, экспрессируемым клетками.

Характеристики антитела 01A04 - конкурентный анализ

Чтобы оценить эффективность антител, проводили конкурентный анализ ELISA (с человеческим sFlt-1 и VEGF) для скрининга Fab и IgG ламы. Исследования проводили в диапазоне концентраций IgG от 10 до 0,01 мкг/мл. Анализ моноклонального антитела 01A04 проводили в сравнении с молекулами отрицательного контроля (очищенный поликлональный мышинный IgG) и положительного контроля (коммерческое анти-sFlt-1 моноклональное антитело Abcam56300). Рассчитывали величины полумаксимального ингибирования (IC₅₀). Результаты представлены на фиг. 6.

Характеристики антитела 01A04 - клеточный анализ

Человеческие эндотелиальные клетки пупочной вены (HUVEC) стимулировали VEGF в присутствии или отсутствии растворимого Flt-1 и моноклонального антитела 01A04. Индуцированную VEGF активацию клеток оценивали, определяя статус фосфорилирования рецептора VEGF R2. В присутствии растворимого Flt-1 происходит ослабление индуцированной VEGF активации HUVEC. Добавление мо-

ноклонального антитела 01A04 восстанавливает активацию клеток, противодействуя растворимому Flt-1 (фиг. 7).

Пример 2. In vivo эффективность анти-Flt-1-антитела.

Введение анти-Flt-1-антитела мышам штамма mdx

Мышам (n=8) проводили инъекции анти-Flt-1-антитела (0 (ФСБ), 0,1 мг или 0,5 мг внутривенно), начиная с 21 дня после рождения. Анти-Flt-1-антитело получали от коммерческого производителя (Angio Proteomie, номер по каталогу AP-MAV0702). Это антитело является известным антагонистом Flt-1: VEGF. Мышам каждые 3 дня проводили инъекции вплоть до 48 дня. На 53-й день оценивали проявление in vivo эффектов. Во второй серии экспериментов исследовали показатели антитела по сравнению с изотипически сходным контрольным антителом, которое не связывает Flt-1. Мышам дважды в неделю проводили инъекции фиксированной дозы 20 мг/кг, начиная с 28-го дня и заканчивая 56-м днем. На 57-й день оценивали проявление in vivo эффектов.

Гистопатология

Обработка анти-Flt-1-антителом в дозировке 0,5 мг (внутривенно) приводила к значительному улучшению мышечной патологии у mdx мышей по сравнению с контрольным раствором (фиг. 8, 9 и 10). В частности, была улучшена целостность мышечных волокон, о чем свидетельствует снижение накопления красителя голубого Эванса в мышцах диафрагмы (фиг. 8, верхняя панель); была снижена степень фиброза, о чем свидетельствует окрашивание мышц диафрагмы по Ван Гизону (фиг. 8, нижняя панель); и была снижена степень мышечного некроза, о чем свидетельствует окрашивание мышц диафрагмы гематоксилином и эозином (H+E) (фиг. 8, третья панель сверху).

Центрально расположенные ядра (ЦРЯ) в мышечных волокнах относятся к типичному фенотипу, связанному с МДД. Меньшее количество ЦРЯ в группе, обработанной антителами, свидетельствует о снижении степени видоизменения волокон и повышении стабильности мышечных волокон (фиг. 10). Предполагается, что повышение мышечного здоровья происходит вследствие повышения мышечной перфузии, так как обработанные антителами животные демонстрировали повышенное количество CD31+ кровеносных сосудов в диафрагме и передней большеберцовой мышце (фиг. 8, вторая панель; фиг. 14). Количественная оценка результатов представлена на фиг. 9, 10 и 14. Дополнительно предполагается, что пролиферация клеток CD31+ кровеносных сосудов происходит вследствие нейтрализации антагониста эндогенного VEGF -растворимого Flt-1 (фиг. 12), что приводит к увеличению количества свободного VEGF в кровеносной системе обработанных мышей (фиг. 13).

Мышечная функция

Обработка анти-Flt-1-антителом в дозировке 0,5 мг (внутривенно) приводила к значительному улучшению мышечной функции мышей в тесте на хватание (фиг. 11, верхняя панель) и демонстрировала четкую тенденцию к улучшению в тесте на бегущей дорожке (фиг. 11, нижняя панель).

Эквиваленты и объем изобретения

Специалистам в данной области техники очевидно или они могут при помощи стандартных экспериментов установить существование многих эквивалентов описанным в данном документе конкретным вариантам реализации изобретения. Объем настоящего изобретения не ограничен вышеприведенным описанием, но определен нижеприведенной формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения мышечной дистрофии Дюшенна (МДД), включающий введение индивиду, страдающему или предрасположенному к МДД, терапевтически эффективного количества анти-Flt-1-антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанное анти-Flt-1-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент характеризуются способностью связывать Flt-1 человека с аффинностью, выбранной из группы, состоящей из более чем 10^{-9} М, более чем 10^{-10} М или более чем 10^{-12} М, согласно анализу связывания методом поверхностного плазмонного резонанса.

3. Способ по любому из пп.1 или 2, отличающийся тем, что указанное анти-Flt-1-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент характеризуются значением IC_{50} , выбранным из группы, состоящей из менее чем 100 пМ, менее чем 10 пМ или менее чем 1 пМ, согласно анализу конкурентного связывания с Flt-1 человека, при этом указанный анализ конкурентного связывания заключается в подавлении связывания VEGF и/или PLGF с Flt-1 человека.

4. Способ по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что указанное анти-Flt-1-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбраны из группы, состоящей из IgG, F(ab')₂, F(ab)₂, Fab', Fab, ScFv, диател, триател и тетраел.

5. Способ по п.4, отличающийся тем, что указанное анти-Flt-1-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой IgG1.

6. Способ по пп.4 или 5, отличающийся тем, что указанное анти-Flt-1-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой моноклональное антитело.

7. Способ по п.6, отличающийся тем, что указанное моноклональное антитело представляет собой

гуманизированное моноклональное антитело.

8. Способ по п.7, отличающийся тем, что указанное гуманизированное моноклональное антитело содержит Fc-область человека.

9. Способ по п.8, отличающийся тем, что указанная Fc-область содержит одну или более мутаций, которые повышают аффинность связывания между Fc-областью и FcRn-рецептором, результатом чего является продление времени полужизни антитела *in vivo*.

10. Способ по п.9, отличающийся тем, что указанная Fc-область содержит одну или более мутаций в одной или более позициях, соответствующих Thr 250, Met 252, Ser 254, Thr 256, Thr 307, Glu 380, Met 428, His 433 и/или Asn 434 IgG1 человека.

11. Способ по любому из пп.1-10, отличающийся тем, что указанное анти-Flt-1-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят парентерально.

12. Способ по п.11, отличающийся тем, что указанное парентеральное введение выбрано из внутривенного, внутрикожного, интратекального, ингаляционного, трансдермального (местного), внутриглазного, внутримышечного, подкожного и/или трансмукозального введения.

13. Способ по любому из пп.1-10, отличающийся тем, что анти-Flt-1-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят перорально.

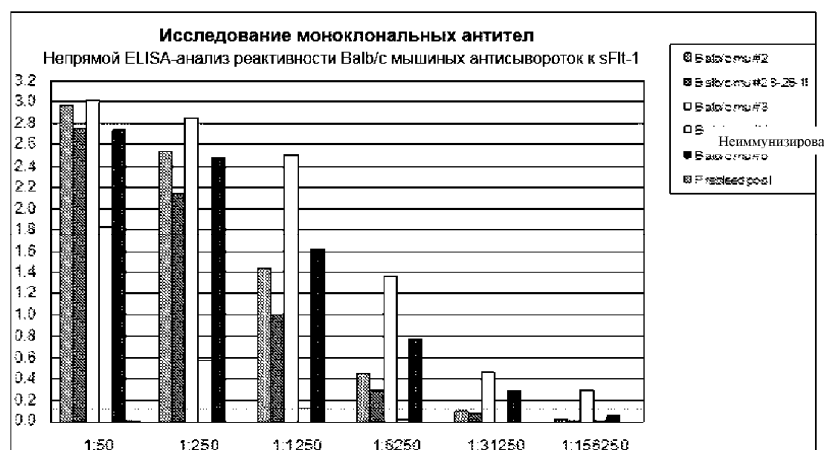
14. Способ по любому из пп.1-13, отличающийся тем, что указанное анти-Flt-1-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят раз в два месяца, ежемесячно, раз в три недели, раз в две недели, еженедельно, ежедневно или через переменные интервалы.

15. Способ по любому из пп.1-14, отличающийся тем, что указанное анти-Flt-1-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент доставляют в одну или более скелетных мышц, выбранных из табл.1.

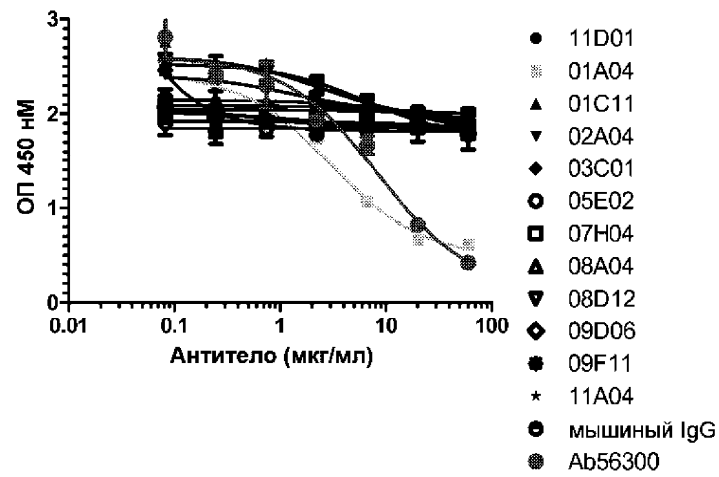
16. Способ по любому из пп.1-15, отличающийся тем, что указанное анти-Flt-1-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент доставляют в одну или более тканей-мишеней, выбранных из сердца, диафрагмы, трехглавой мышцы, камбаловидной мышцы, передней большеберцовой мышцы, икроножной мышцы, длинного разгибателя пальцев, прямой мышцы живота и/или четырехглавой мышцы.

17. Способ по любому из пп.1-16, отличающийся тем, что введение указанного анти-Flt-1-антитела или его антигенсвязывающего фрагмента приводит к уменьшению степени фиброза, повышению стабильности мышечных волокон, повышению мышечной силы, повышению выносливости, уменьшению утомляемости, усилению тока крови и/или уменьшению некроза мышц.

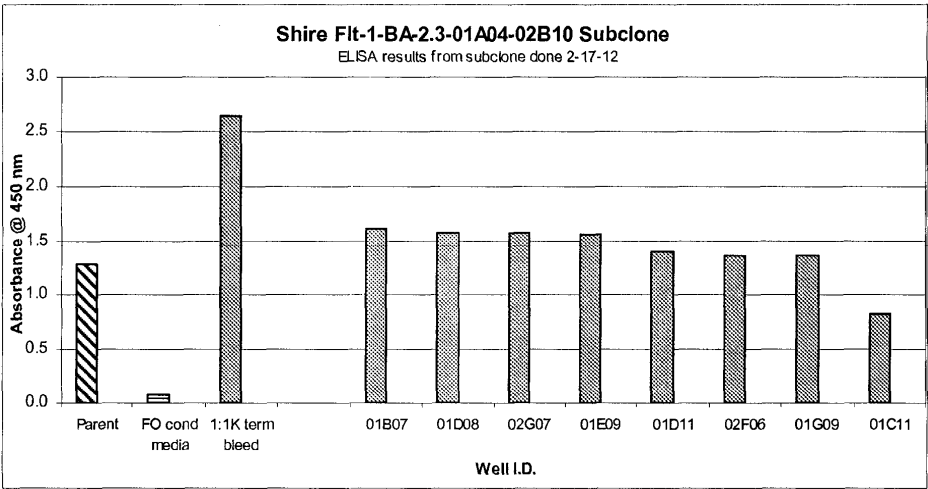
18. Применение фармацевтической композиции, содержащей в терапевтически эффективном количестве анти-Flt-1-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и фармацевтически приемлемый носитель, для лечения мышечной дистрофии Дюшенна (МДД).



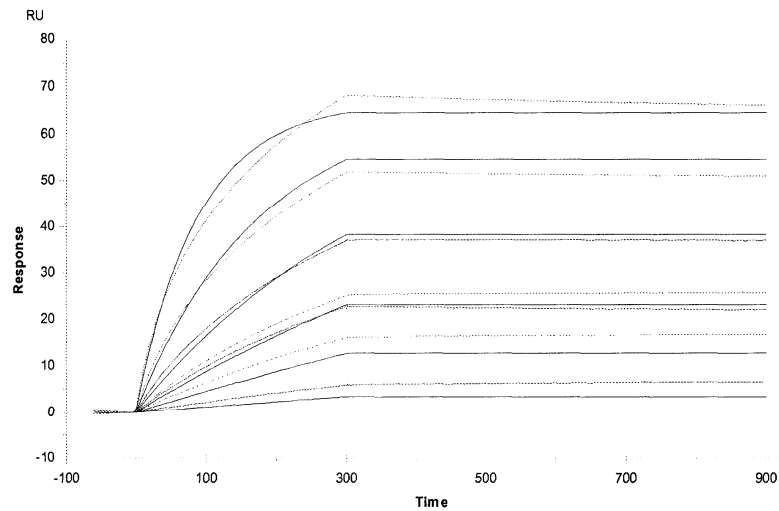
Фиг. 1



Фиг. 2

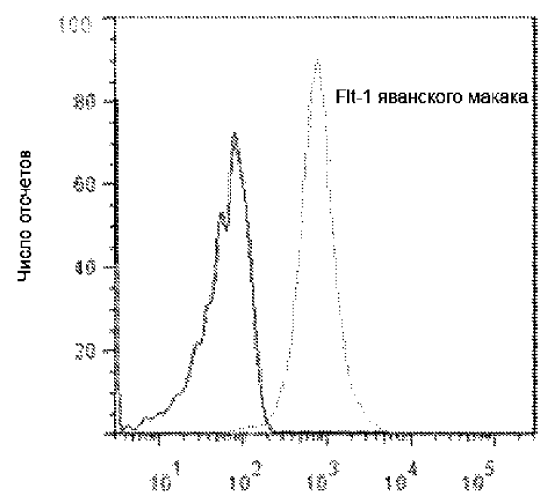
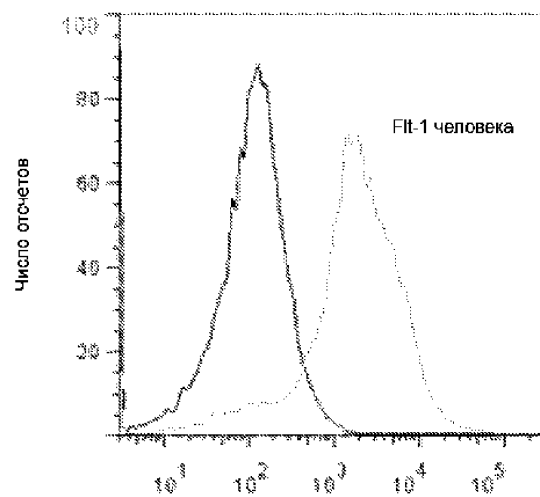


Фиг. 3

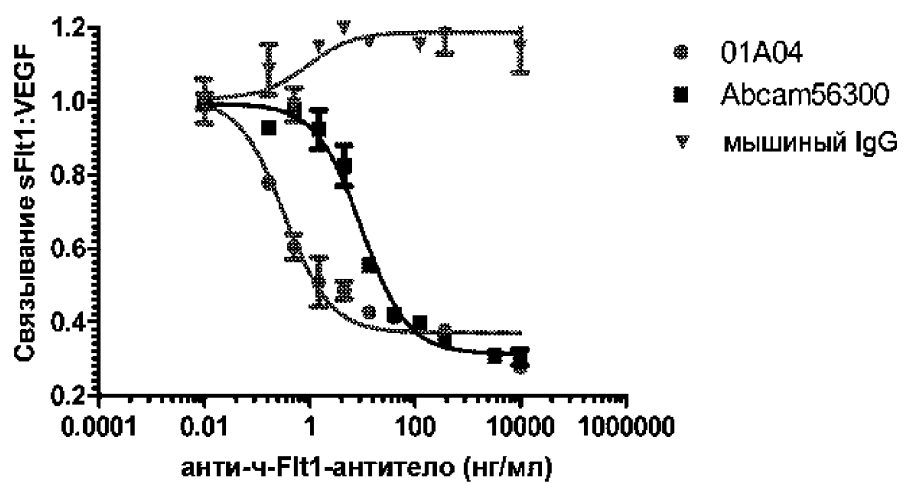


k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)	t_c	χ^2 (RU ²)
3.785E+5	6.516E-7	1.722E-12	66.70	1.307E+10	5.44

Фиг. 4

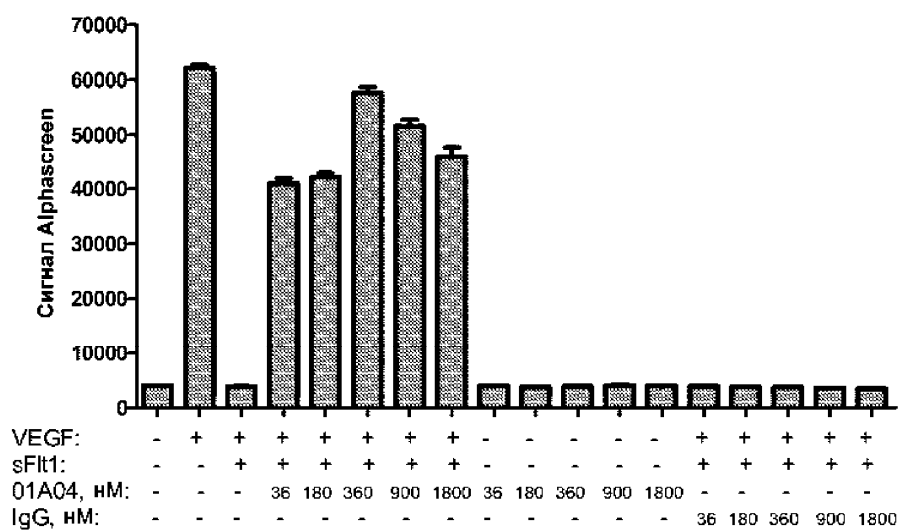


Фиг. 5



Фиг. 6

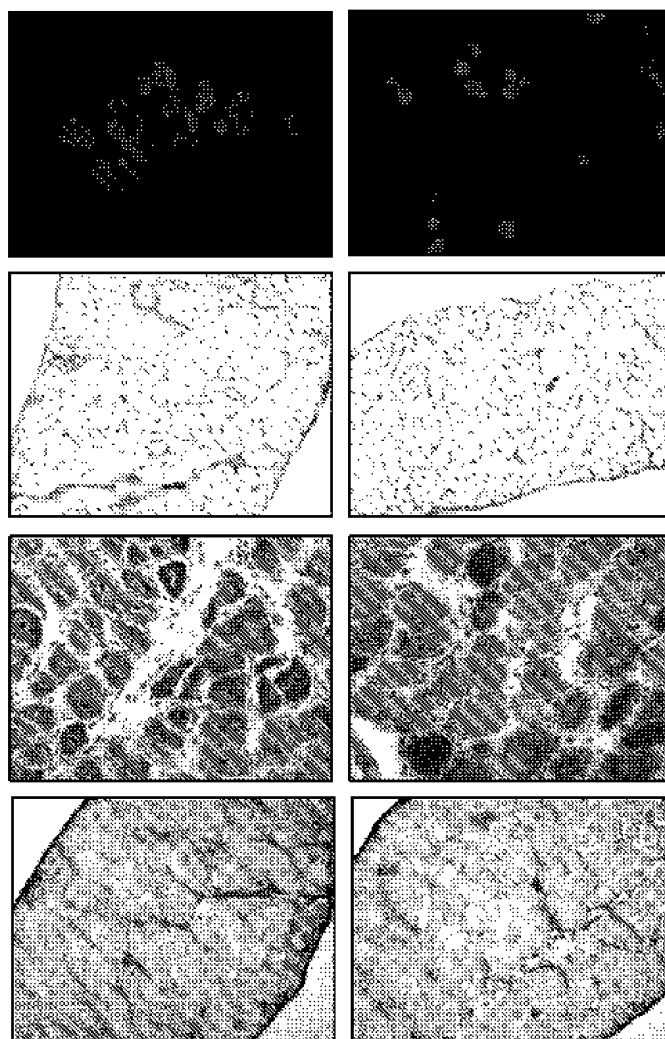
HUVEC VEGF клеточный анализ



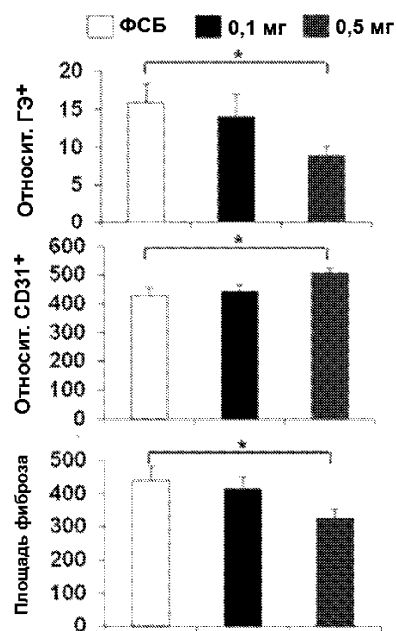
Фиг. 7

ФСБ

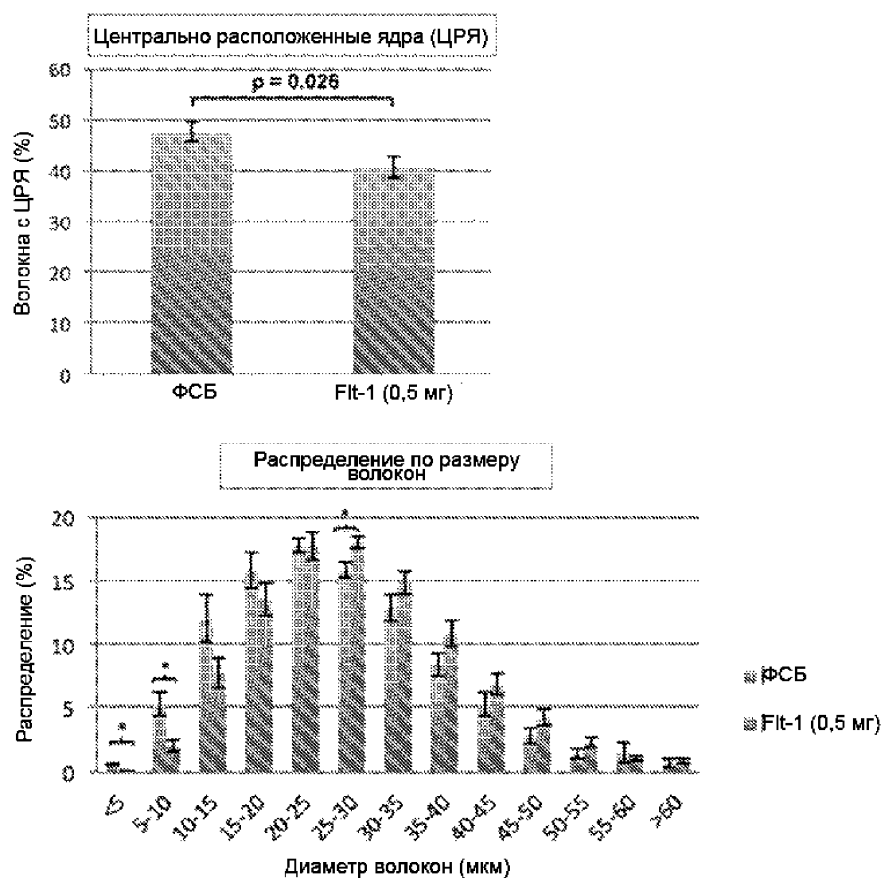
анти-Flt1 mAb



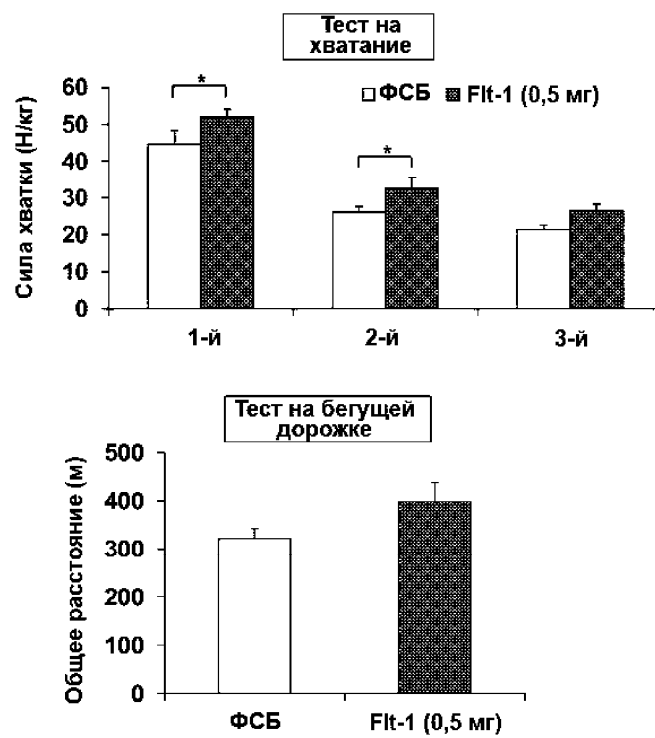
Фиг. 8



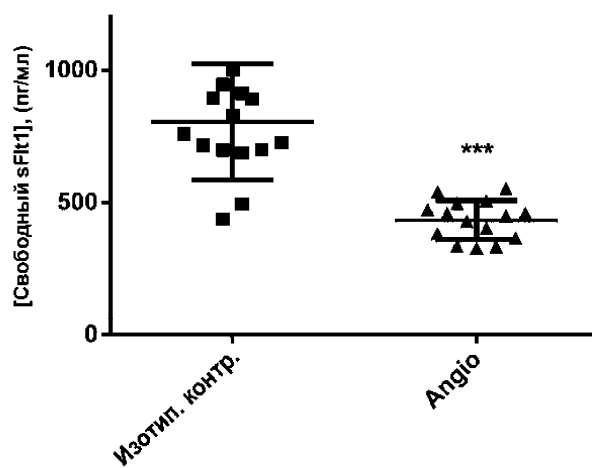
Фиг. 9



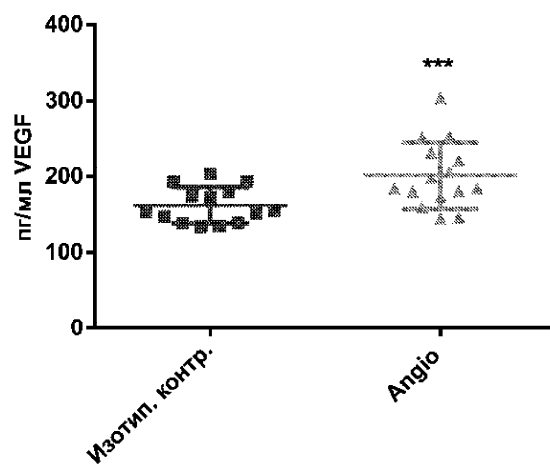
Фиг. 10



Фиг. 11



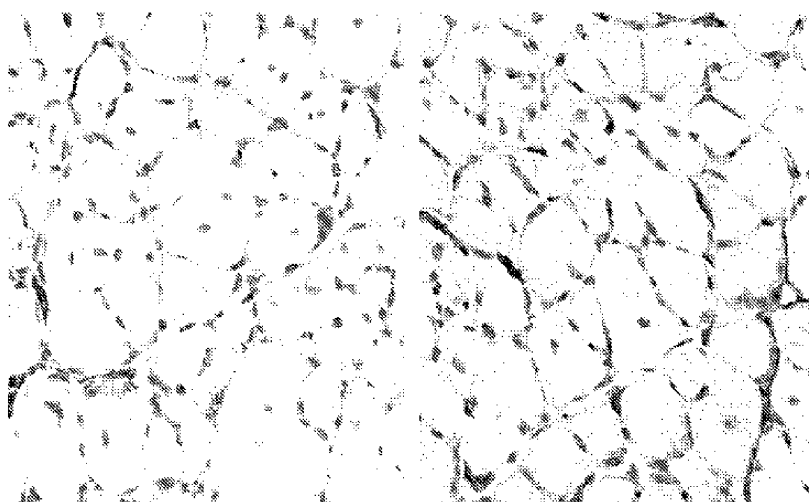
Фиг. 12



Фиг. 13

Изотипический контроль

Angio Proteomie



Фиг. 14

