



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.06.08

(21) Номер заявки
201690243

(22) Дата подачи заявки
2014.07.30

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

(54) АНТИТЕЛА К АКТИВИНУ А И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 61/859,926; 61/864,036; 61/911,834;
61/913,885

(32) 2013.07.30; 2013.08.09; 2013.12.04;
2013.12.09

(33) US

(43) 2016.06.30

(86) PCT/US2014/048957

(87) WO 2015/017576 2015.02.05

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**РЕГЕНЕРОН ФАРМАСЬЮТИКАЛС,
ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
**Громада Джеспер, Латрес Эстер,
Мёрфи Эндрю Дж., Янкопулос
Джордж Д., Мортон Лори С. (US)**

(74) Представитель:
Угрюмов В.М. (RU)

(56) WO-A1-2013074557
WO-A2-2008031061

TORNETTA M ET AL.: "Antibody Fab display and selection through fusion to the pIX coat protein of filamentous phage", JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., AMSTERDAM, NL, vol. 360, no. 1-2, 31 August 2010 (2010-08-31), pages 39-46, XP027222168, ISSN: 0022-1759 [retrieved on 2010-06-17]

RAJPAL A ET AL.: "A general method for greatly improving the affinity of antibodies by using combinatorial libraries", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, US, vol. 102, no. 24, 1 June 2005 (2005-06-01), pages 8466-8471, XP002347095, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.0503543102

KELLY DAVIS ORCUTT ET AL.: "Engineering an antibody with picomolar affinity to DOTA chelates of multiple radionuclides for pretargeted radioimmunotherapy and imaging", NUCLEAR MEDICINE AND BIOLOGY, ELSEVIER, NY, US, vol. 38, no. 2, 31 August 2010 (2010-08-31), pages 223-233, XP028359724, ISSN: 0969-8051, DOI: 10.1016/J.NUCMEDBIO.2010.08.013 [retrieved on 2010-09-08]

DUFNER P ET AL.: "Harnessing phage and ribosome display for antibody optimisation", TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, vol. 24, no. 11, 1 November 2006 (2006-11-01), pages 523-529, XP027921675, ISSN: 0167-7799 [retrieved on 2006-11-01]

HANES J ET AL.: "PICOMOLAR AFFINITY ANTIBODIES FROM A FULLY SYNTHETIC NAIVE LIBRARY SELECTED AND EVOLVED BY RIBOSOME DISPLAY", NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING GROUP, NEW YORK, NY, US, vol. 18, no. 12, 1 December 2000 (2000-12-01), pages

1287-1292, XP001121946, ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/82407

HOOGENBOOM H R: "Selecting and screening recombinant antibody libraries", NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING GROUP, NEW YORK, NY, US, vol. 23, no. 9, 1 September 2005 (2005-09-01), pages 1105-1116, XP002348401, ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/NBT1126

WARK K L ET AL.: "Latest technologies for the enhancement of antibody affinity", ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 58, no. 5-6, 7 August 2006 (2006-08-07), pages 657-670, XP024892147, ISSN: 0169-409X, DOI: 10.1016/J.ADDR.2006.01.025 [retrieved on 2006-08-07]

GABRIELA A. CANZIANI ET AL.: "Characterization of neutralizing affinity-matured human respiratory syncytial virus F binding antibodies in the sub-picomolar affinity range", JOURNAL OF MOLECULAR RECOGNITION, vol. 25, no. 3, 28 March 2012 (2012-03-28), pages 136-146, XP055156443, ISSN: 0952-3499, DOI: 10.1002/jmr.2149

(57) В настоящем изобретении предусмотрены антитела, которые связываются с активинном А, и способы их применения. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения антитела представляют собой полностью человеческие антитела, которые связываются с активинном А с высокой аффинностью. Антитела согласно настоящему изобретению могут быть использованы для лечения заболеваний и нарушений, характеризующихся снижением мышечной массы или силы, таких как саркопения, кахексия, мышечная травма, мышечная слабость/атрофия, злокачественная опухоль, фиброз и потеря веса. Антитела согласно настоящему изобретению также применимы в сочетании со связывающими GDF8 белками для лечения

заболеваний и нарушений, характеризующихся снижением мышечной массы или силы. Антитела согласно настоящему изобретению также применимы для профилактики, лечения или уменьшения интенсивности нарушений и заболеваний, вызванных, спровоцированных, усугубленных и/или обостренных активин^{ом} А, таких как фиброз почек.

037926 B1

037926 B1

Область техники, к которой относится настоящее изобретение

Настоящее изобретение относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые являются специфичными к активину А, и способам их применения, включая способы применения специфических к активину А антител в сочетании с ингибитором миостатина.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

Активины принадлежат к надсемейству трансформирующих факторов роста бета (TGF- β) и оказывают широкий спектр биологических эффектов на пролиферацию, дифференцировку и апоптоз клеток. Активины представляют собой гомо- или гетеродимеры ингибина β A, ингибина β B, ингибина β C и ингибина β E, различные комбинации которых создают различных представителей группы белка активина. Например, активин А представляет собой гомодимер ингибина β A, а активин В представляет собой гомодимер ингибина β B, тогда как активин АВ представляет собой гетеродимер из ингибина β A и ингибина β B, а активин АС представляет собой гетеродимер из ингибина β A и ингибина β C (Tsuchida, K. et al., Cell Commun Signal 7:15 (2009)).

Активин А связывает и активирует рецепторные комплексы на поверхности клеток, известные как рецепторы активина типа II (типа IIA и типа IIB, также известные как ActRIIA и ActRIIB соответственно). Активация этих рецепторов приводит к фосфорилированию рецептора активина типа I (например, Alk4 или 7), который, в свою очередь, приводит к фосфорилированию белков SMAD 2 и 3, образованию комплексов SMAD (с SMAD4) и перенос комплекса SMAD в ядро клетки, где SMAD2 и SMAD3 функционируют для регулирования транскрипции различных генов (Sozzani, S. and Musso, T., Blood 117(19):5013-5015 (2011)).

Многие другие лиганды связываются и активируют ActRIIB, включая в себя GDF8 (миостатин), активин В, активин АВ, ингибин А, ингибин В, GDF3, GDF11, Nodal, BMP2, BMP4, BMP7, BMP9 и BMP 10. Блокирование взаимодействия ActRIIB с его лигандами может приводить к полезным физиологическим эффектам. Например, GDF8 играет ключевую роль в развитии и поддержании скелетной мышцы, действуя в качестве негативного регулятора мышечной массы (McPherron AC et al. (1997). Nature 387(6628):83-90). Введение ActRIIB-Fc (т.е. внеклеточной части рецептора типа IIB, ActRIIB, стабилизированной путем слияния с доменом Fc IgG) приводит к значительному увеличению массы скелетных мышц и повышает мышечную массу и измерения мышечной силы у мышей (Lee SJ, et al. (2005) Proc Natl Acad Sci U S A 102(50): 18117-18122). Эффективность ActRIIB-Fc ослабляется, но не устраняется у нулевых по Mstn (миостатину) мышей, демонстрируя, что другой лиганд(ы) ActRIIB в дополнение к миостатину может функционировать как негативный регулятор роста мышц. Таким образом, существует потребность в дополнительных ингибиторах сигнализации ActRIIB, которые могут обеспечить клинические преимущества.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

В настоящем изобретении предусмотрены выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с активинном А с равновесной константой диссоциации связывания (K_D), равной менее чем приблизительно 5 пМ, как измерено в анализе поверхностного плазмонного резонанса при температуре 25°C, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: (а) определяющие комплементарность области (CDR) вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 162; и (b) CDR вариабельной области легкой цепи (LCVR) имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 146.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с активинном А с K_D менее чем приблизительно 4 пМ, как измерено в анализе поверхностного плазмонного резонанса при температуре 25°C.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с активинном А с равновесной константой ассоциации связывания (K_a) менее чем приблизительно 500 нМ.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент блокирует связывание по меньшей мере одного рецептора активина А с активинном А.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент блокирует активацию по меньшей мере одного рецептора активина А активинном А.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по существу не блокирует связывание активина А с рецептором активина типа II.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент блокирует связывание активина А с рецептором активина А со значением IC_{50} менее чем приблизительно 80 пМ, как измерено в биоанализе связывания рецептора/лиганда *in vivo* при 25°C.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент блокирует связывание активина А с рецептором активина А со значением IC_{50} менее чем приблизительно 60 пМ, как измерено в биоанализе связывания рецептора/лиганда *in vivo* при 25°C.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения антитело или его антиген-связывающий фрагмент ингибирует связывание активина А с рецептором активина А, выбранным из группы, состоящей из рецептора активина типа IIA (ActRIIA), рецептора активина типа IIB (ActRIIB) и рецептора активина типа I.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения антитело или его антиген-связывающий фрагмент ингибирует опосредованную активинем А активацию пути передачи сигнала комплекса SMAD.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения антитело или его антиген-связывающий фрагмент конкурирует за связывание с активинем А с эталонным антителом, содержащим пару последовательностей вариабельной области тяжелой цепи (HCVR)/вариабельной области легкой цепи (LCVR), выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 138/146 и 194/146.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения антитело или его антиген-связывающий фрагмент связывается с тем же эпитопом на активине А, что и эталонное антитело, содержащее пару последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 138/146 и 194/146.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения антитело или его антиген-связывающий фрагмент содержит пары аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR SEQ ID NO: 162/146.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения антитело или его антиген-связывающий фрагмент содержит домены HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, соответственно выбранные из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 164-166-168-148-150-152.

Фармацевтическая композиция для ингибирования опосредованного активинем А пути передачи сигнала, содержащая антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-14, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

Фармацевтическая композиция для ингибирования опосредованного активинем А пути передачи сигнала, содержащая антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-14, антагонист GDF8 и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения антагонист GDF8 выбирают из группы, состоящей из ингибирующего GDF8 слитого белка, антитела к GDF8 и антигенсвязывающего фрагмента антитела к GDF8.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения антагонист GDF8 представляет собой антитело к GDF8 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR) из HCVR, содержащей SEQ ID NO: 217, и определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR) из LCVR, содержащей SEQ ID NO: 221.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения антагонист GDF8 представляет собой антитело к GDF8 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий:

- a) три HCDR, имеющие SEQ ID NO: 218, SEQ ID NO: 219 и SEQ ID NO: 220 и
- b) три LCDR, имеющие SEQ ID NO: 222, SEQ ID NO: 223 и SEQ ID NO: 224.

В настоящем изобретении также предусмотрено применение антитела или антигенсвязывающего фрагмента для увеличения мышечной массы или силы у субъекта.

В настоящем изобретении также предусмотрено применение фармацевтической композиции для увеличения мышечной массы или силы у субъекта.

В настоящем изобретении также предусмотрено применение антитела или антигенсвязывающего фрагмента для лечения, предупреждения или уменьшения интенсивности заболевания или нарушения, характеризующегося сниженной мышечной массой или силой.

В настоящем изобретении также предусмотрено применение фармацевтической композиции для лечения, предупреждения или уменьшения интенсивности заболевания или нарушения, характеризующегося сниженной мышечной массой или силой.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения заболевание или нарушение, характеризующееся сниженной мышечной массой или силой, выбирают из группы, состоящей из саркопении, кахексии, мышечного повреждения, мышечной слабости/атрофии, злокачественной опухоли, ожирения, сахарного диабета, артрита, рассеянного склероза, мышечной дистрофии, бокового амиотрофического склероза, болезни Паркинсона, остеопороза, остеоартрита, остеопении и метаболического синдрома.

В настоящем изобретении также предусмотрено применение антитела или антигенсвязывающего фрагмента для лечения, предупреждения или уменьшения интенсивности хронического заболевания почек.

В настоящем изобретении также предусмотрено применение фармацевтической композиции для лечения, предупреждения или уменьшения интенсивности хронического заболевания почек.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1 представляет собой матрицу, показывающую результаты перекрестного анализа антитела, в котором первичное антитело к активину А ("антитело-образец") наносили на покрытый античеловеческим FC сенсорный наконечник с последующим проявлением в растворе вторичного анти-

тела к активину А (1 мкМ), предварительно связанного с активинном А. Изображены реакции связывания (числовые значения от 0,22 до 1,84) для каждой комбинации исследуемых антител. Реакции связывания, представленные в белых ячейках с черным шрифтом, указывают на отсутствие конкуренции за связывание активина А, предполагая различные связывающие области.

Фиг. 2: на панели А показано влияние 21-дневного воздействия антитела к GDF8 (H4H1657N2, 10 мг/кг или 30 мг/кг) на среднюю максимальную силу тетанического сокращения по сравнению с изотипическим контрольным антителом. Данные подвергали анализу с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим тестом Тьюки. Достоверность $*p < 0,05$ по отношению к изотипическому контролю ($n=6$, непарный t -критерий Стьюдента); n.s. = статистически недостоверный по сравнению с изотипом в дозе 30 мг/кг. На панели В показано увеличение максимальной силы тетанического сокращения передней большеберцовой (ТА) мышцы у обработанных H4H1657N2 мышей (10 мг/кг), по сравнению с мышами, обработанными изотипическим контрольным антителом, в течение трех недель ($n=6$), при стимуляции электрическим током в диапазоне частоты (от 40 до 100 Гц). Данные выражены в виде среднего значения средней максимальной силы $\pm$ SEM.

Фиг. 3: на панели А показана схема проведения эксперимента для оценки влияния H4H1657N2 во время фазы восстановления от индуцированной подвешиванием задних конечностей мышечной атрофии. На панели В показано процентное изменение в массе ТА и икроножной (GA) мышц для обработанных H4H1657N2 и изотипическим контрольным антителом мышей после восстановления через 7 дней подвешивания задних конечностей (HLS+7 восст.) в сравнении с мышами без периода восстановления через 7 дней подвешивания задних конечностей (HLS) и контрольными мышами (контроль без HLS). Значения выражены как среднее изменение в процентах по сравнению с контрольными значениями без HLS $\pm$ SEM. Анализ данных с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим тестом Тьюки. $*p < 0,05$ достоверность по отношению к группе без HLS. $\#p < 0,05$ достоверность по отношению к группе HLS.

Фиг. 4: на панели А показано влияние введения антитела к активину А H4H10446P2 на массу тела мышей с гиперэкспрессией активина А (в сравнении с изотипическим контролем). Данные анализировали с использованием двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA с повторными измерениями + критерий множественного сравнения Бонеферрони), а затем с помощью теста Тьюки. $*p < 0,05$ по сравнению с изотипическим контролем; $\#p < 0,05$ по сравнению с активинном А+изотипический контроль. На панели В показано влияние антитела к активину А H4H10446P2 на массу передней большеберцовой (ТА) и икроножной (GA) мышц у мышей с гиперэкспрессией активина А (по сравнению с изотипическим контролем). Анализ данных с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим тестом Тьюки. $*p < 0,05$ по отношению к вектору + изотипический контроль; $\#p < 0,05$ по отношению к активину А+изотипический контроль.

Подробное описание настоящего изобретения

Перед тем, как будет представлено описание настоящего изобретения, следует объяснить, что настоящее изобретение не ограничено описанными конкретными способами и экспериментальными условиями, поскольку такие способы и условия могут отличаться. Также следует понимать, что используемая в настоящем документе терминология применяется с целью описания только конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения, поскольку объем настоящего изобретения будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

Если не указано иное, все используемые в настоящем документе технические и научные термины характеризуются тем же значением, которое обычно понимается специалистом с обычной квалификацией в настоящей области техники, к которой принадлежит настоящее изобретение. Используемый в настоящем документе термин "приблизительно", при использовании в отношении конкретного числового значения означает, что значение может изменяться от указанного значения не более чем на 1%.

Например, используемый в настоящем документе термин "приблизительно 100" включает в себя 99 и 101 и все значения между ними (например, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4 и т.д.).

Хотя любые способы и материалы, аналогичные или эквивалентные тем, которые описаны в настоящем документе, могут быть использованы в практике или исследовании настоящего изобретения, описаны предпочтительные способы и материалы.

Антигенспецифические связывающие белки

Используемое в настоящем документе выражение "антигенспецифический связывающий белок" означает белок, содержащий по меньшей мере один домен, который специфически связывается с определенным антигеном. Иллюстративные категории антигенспецифических связывающих белков включают в себя антитела, антигенсвязывающие фрагменты антител, пептиды, которые специфически взаимодействуют с определенным антигеном (например, пептидные антитела), рецепторные молекулы, которые специфически взаимодействуют с конкретным антигеном, и белки, содержащие лигандсвязывающий участок рецептора, который специфически связывается с конкретным антигеном.

В настоящем изобретении предусмотрены антигенспецифические связывающие белки, которые специфически связываются с активинном А, т.е. "специфические к активину А связывающие белки". Ак-

тивины представляют собой гомо- и гетеродимерные молекулы, содержащие бета-субъединицы, т.е. ингибин β A, ингибин β B, ингибин β C и/или ингибин β E. Субъединица β A характеризуется аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 226, а субъединица β B характеризуется аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 228. Активин А представляет собой гомодимер из двух субъединиц β A; активин В представляет собой гомодимер из двух субъединиц β B; активин АВ представляет собой гетеродимер из одной субъединицы β A и одной субъединицы β B; и активин АС представляет собой гетеродимер из одной субъединицы β A и одной субъединицы β C. Специфический к активину А связывающий белок может представлять собой антигенспецифический связывающий белок, который специфически связывается с субъединицей РА. Поскольку субъединица β A находится в молекулах активина А, активина АВ и активина АС, "специфический к активину А связывающий белок" может представлять собой антигенспецифический связывающий белок, который специфически связывается с активином А, а также активином АВ и активином АС (на основании его взаимодействия с субъединицей β A). Таким образом, в соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения специфический к активину А связывающий белок специфически связывается с активином А или активином А и активином АВ, или активином А и активином АС, или активином А, активином АВ и активином АС, но не связывается с другими лигандами ActRIIB, такими как активин В, GDF3, GDF8, BMP2, BMP4, BMP7, BMP9, BMP10, GDF11, Nodal и т.д. Таким образом, согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения специфический к активину А связывающий белок специфически связывается с активином А, но по существу не связывается с активином В или активином С. Согласно другому варианту осуществления специфический к активину А связывающий белок может также связываться с активином В (на основании перекрестной реакции с субъединицей β B, т.е. ингибином РВ). Согласно другому варианту осуществления специфический к активину А связывающий белок представляет собой связывающий белок, который специфически связывается с активином А, но не связывается с каким-либо другим лигандом ActRIIB. Согласно другому варианту осуществления специфический к активину А связывающий белок представляет собой связывающий белок и специфически связывается с активином А и не связывается с любым костным морфогенетическим белком (BMP) (например, BMP2, BMP4, BMP6, BMP9, BMP10). Согласно другому варианту осуществления специфический к активину А связывающий белок представляет собой связывающий белок, который специфически связывается с активином А, но не связывается с любым другим представителем надсемейства трансформирующего фактора роста бета (TGFP).

В настоящем изобретении также предусмотрены антигенспецифические связывающие белки, которые специфически связываются с GDF8, т.е. "специфические к GDF8 связывающие белки". Термин "GDF8" (также называемый "фактор-8 роста и дифференцировки" и "миостатин") означает белок, характеризующийся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 225 (зрелый белок). В соответствии с настоящим изобретением специфические к GDF8 связывающие белки специфически связываются с GDF8, но не связываются с другими лигандами ActRIIB, такими как GDF3, BMP2, BMP4, BMP7, BMP9, BMP 10, GDF11, активин А, активин В, активин АВ, Nodal и т.д.

В контексте настоящего изобретения такие молекулы как ActRIIB-Fc (например, "ACE-031"), которые содержат лиганд-связывающий участок рецептора ActRIIB, не считаются "специфическими к активину А связывающими белками" или "специфическими к GDF8 связывающими белками", потому что такие молекулы связываются с множеством лигандов, кроме GDF8, активина А и активина АВ.

Все ссылки на белки, полипептиды и фрагменты белков в настоящем документе предназначены для обозначения человеческой версии соответствующего белка, полипептида или белкового фрагмента, если явно не указано, что они представляют собой происходящие от отличных от человеческих видов.

Антигенсвязывающие молекулы с двумя различными антигенспецифическими связывающими доменами

Используемый в настоящем документе термин "антигенспецифический связывающий домен" предусматривает полипептиды, содержащие или состоящие из следующего: (i) антигенсвязывающий фрагмент молекулы антитела, (ii) пептид, который специфически взаимодействует с определенным антигеном (например, пептидным антителом), и/или (iii) лиганд-связывающая часть рецептора, которая специфически связывается с конкретным антигеном. Например, в настоящем изобретении предусмотрены биспецифические антитела с одним плечом, содержащим первую пару варибельной области тяжелой цепи/варибельной области легкой цепи (HCVR/LCVR), которая специфически связывается с активином А, и другим плечом, содержащим вторую пару HCVR/LCVR, которая специфически связывается с GDF8.

Специфическое связывание

Используемый в настоящем документе термин "специфически связывается" или тому подобный означает, что антигенспецифический связывающий белок или антигенспецифический связывающий домен образуют комплекс с конкретным антигеном, характеризующийся константой диссоциации (K_D), составляющей 500 мкМ или менее, и не связывается с другими неродственными антигенами при обычных условиях исследований. "Неродственные антигены" представляют собой белки, пептиды или полипептиды, которые характеризуются менее чем 95% аминокислотной идентичностью друг к другу. Способы определения того, специфически ли связываются две молекулы друг с другом, хорошо известны в настоящей

области техники и предусматривают, например, равновесный диализ, поверхностный плазмонный резонанс и тому подобные. Например, антигенспецифический связывающий белок или его антигенспецифический связывающий домен, как он использован в контексте настоящего изобретения, содержит молекулы, которые связываются с конкретным антигеном (например, активинем А и/или АВ, или GDF8) или его частью с K_D , равной менее чем приблизительно 500 пМ, менее чем приблизительно 400 пМ, менее чем приблизительно 300 пМ, менее чем приблизительно 200 пМ, менее чем приблизительно 100 пМ, менее чем приблизительно 90 пМ, менее чем приблизительно 80 пМ, менее чем приблизительно 70 пМ, менее чем приблизительно 60 пМ, менее чем приблизительно 50 пМ, менее чем приблизительно 40 пМ, менее чем приблизительно 30 пМ, менее чем приблизительно 20 пМ, менее чем приблизительно 10 пМ, менее чем приблизительно 5 пМ, менее чем приблизительно 4 пМ, менее чем приблизительно 2 пМ, менее чем приблизительно 1 пМ, менее чем приблизительно 0,5 пМ, менее чем приблизительно 0,2 пМ, менее чем приблизительно 0,1 пМ или менее чем приблизительно 0,05 пМ, при измерении в анализе поверхностного плазмонного резонанса.

Используемый в настоящем документе антигенспецифический связывающий белок или антигенспецифический связывающий домен "не связывается" с указанной молекулой (например, "не связывается с GDF11", "не связывается с BMP9", "не связывается с BMP10" и т.д.), если белок или связывающий домен при исследовании на связывание с молекулой при температуре 25°C в анализе поверхностного плазмонного резонанса проявляет K_D , превышающую 50,0 нМ, или не проявляет какое-либо связывание в таком анализе или эквивалентном ему.

Используемый в настоящем документе термин "поверхностный плазмонный резонанс" относится к оптическому явлению, которое позволяет проводить анализ в реальном времени взаимодействий путем обнаружения изменений концентраций белка в биосенсоре матрицы, например, с использованием системы BIAcore™ (Biacore Life Sciences division of GE Healthcare, Piscataway, NJ).

Используемый в настоящем документе термин " K_D " означает равновесную константу диссоциации определенного белок-белкового взаимодействия (например, взаимодействия антитело-антиген). Если не указано иное, раскрытые в настоящем документе значения K_D относятся к значениям K_D , определяемым с помощью анализа поверхностного плазмонного резонанса при температуре 25°C.

Антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител

Как указано выше, антигенспецифический связывающий белок может содержать или состоять из антитела или антигенсвязывающего фрагмента антитела. Кроме того, в случае антигенсвязывающих молекул, содержащих два различных антигенспецифических связывающих домена, один или оба из антигенспецифических связывающих доменов могут содержать или состоять из антигенсвязывающего фрагмента антитела.

Используемый в настоящем документе термин "антитело, которое связывается с активинем" или "антитело к активину" предусматривает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают растворимый фрагмент белка активина А, а также могут связываться с содержащим субъединицу активина βA гетеродимером активина.

Используемый в настоящем документе термин "антитело" означает любую антигенсвязывающую молекулу или молекулярный комплекс, содержащий по меньшей мере одну определяющую комплементарность область (CDR), которая специфически связывается или взаимодействует с определенным антигеном (например, активинем А). Термин "антитело" предусматривает молекулы иммуноглобулина, содержащие четыре полипептидные цепи, две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, взаимосвязанные дисульфидными связями, а также их мультимеры (например, IgM). Каждая тяжелая цепь содержит вариабельную область тяжелой цепи (сокращенно в настоящем документе представлена как HCVR или V_H) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена C_{H1} , C_{H2} и C_{H3} . Каждая легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи (сокращенно в настоящем документе представлена как LCVR или V_L) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один домен (C_{L1}). Области V_H и V_L могут дополнительно подразделяться на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), перемежающиеся с областями, которые представляют собой более консервативные, называемые каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от amino-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Согласно различным вариантам осуществления настоящего изобретения FR антитела к активину А (или их антигенсвязывающая часть) может быть идентична последовательностям зародышевой линии человека или может быть естественным или искусственным образом модифицирована. Аминокислотная консенсусная последовательность может быть определена на основании прямого анализа двух или более CDR.

Используемый в настоящем документе термин "антитело" также предусматривает антигенсвязывающие фрагменты полноразмерных молекул антител. Используемые в настоящем документе термины "антигенсвязывающая часть" антитела, "антигенсвязывающий фрагмент" антитела и тому подобное предусматривает любой природный, ферментативно получаемый, синтетический или сконструированный с помощью геной инженерии полипептид или гликопротеин, который специфически связывается с анти-

геном с образованием комплекса. Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут быть получены, например, из полноразмерных молекул антитела с использованием любых подходящих стандартных техник, таких как техники протеолитического расщепления или рекомбинантной генной инженерии, предусматривающих управление и экспрессию ДНК, кодирующей переменный и необязательно константный домены антитела. Такая ДНК известна и/или легко доступна, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК (в том числе, например, библиотек фагов-антител) или может быть синтезирована. ДНК можно секвенировать и управлять химически или с использованием техник молекулярной биологии, например, расположить один или несколько переменных и/или константных доменов в подходящую конфигурацию или вводить кодоны, создавать остатки цистеина, изменять, добавлять или удалять аминокислоты и т.д.

Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают в себя: (i) фрагменты Fab; (ii) фрагменты F(ab')₂; (iii) фрагменты Fd; (iv) фрагменты Fv; (v) одноцепочечные молекулы Fv (scFv); (vi) фрагменты dAb и (vii) минимальные блоки распознавания, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гипервариабельную область антитела (например, выделенную определяющую комплементарность область (CDR), такую как пептид CDR3), или пептид FR3-CDR3-FR4 с ограниченной конформационной свободой. Другие сконструированные молекулы, такие как специфические к домену антитела, однодоменные антитела, антитела с удаленными доменами, химерные антитела, антитела с привитыми CDR, диатела, триатела, тетратела, минитела, нанотела (например, одновалентные нанотела, двухвалентные нанотела и т.д.), иммунофармацевтические средства на основе модульного белка малого размера (SMIP) и переменные домены акулы Ignar, также охватываются используемым в настоящем документе выражением "антигенсвязывающий фрагмент".

Антигенсвязывающий фрагмент антитела, как правило, будет содержать по меньшей мере один переменный домен. Переменный домен может быть любого размера или аминокислотной композиции и обычно содержит по меньшей мере одну CDR, которая примыкает к или находится в рамке считывания с одним или несколькими каркасными последовательностями. В антигенсвязывающих фрагментах, содержащих домен V_H, связанный с доменом V_L, домены V_H и V_L могут быть расположены относительно друг друга в любом подходящем расположении. Например, переменная область может быть димерной и содержать димеры V_H-V_H, V_H-V_L или V_L-V_L. Альтернативно антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный домен V_H или V_L.

Согласно некоторым вариантам осуществления антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать по меньшей мере один переменный домен, ковалентно связанный по меньшей мере с одним константным доменом. Неограничивающие иллюстративные конфигурации переменных и константных доменов, которые могут быть найдены в пределах антигенсвязывающего фрагмента антитела согласно настоящему изобретению, включают в себя:

- (i) V_H-C_H1; (ii) V_H-C_H2; (iii) V_H-C_H3; (iv) V_H-C_H1-C_H2; (v) V_H-C_H1-C_H2-C_H3; (vi) V_H-C_H2-C_H3; (vii) V_H-C_L; (viii) V_L-C_H1; (ix) V_L-C_H2; (x) V_L-C_H3; (xi) V_L-C_H1-C_H2; (xii) V_L-C_H1-C_H2-C_H3; (xiii) V_L-C_H2-C_H3 и (xiv) V_L-C_L.

В любой конфигурации переменных и константных доменов, включая в себя какие-либо перечисленные выше иллюстративные конфигурации, переменные и константные домены могут быть либо непосредственно связаны друг с другом, либо могут быть связаны посредством полного или частичного шарнира или линкерной области. Шарнирная область может состоять по меньшей мере из 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или более) аминокислот, которые приводят к гибкой или полугибкой связи между соседними переменными и/или константными доменами в одной полипептидной молекуле. Кроме того, антигенсвязывающий фрагмент антитела согласно настоящему изобретению может содержать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) любой из конфигураций, перечисленных выше, переменного и константного домена в нековалентной связи друг с другом и/или с одним или несколькими мономерными доменами V_H или V_L, например с помощью дисульфидной связи(ей).

Как в случае с полноразмерными молекулами антител, антигенсвязывающие фрагменты могут быть моноспецифическими или мультиспецифическими (например, биспецифическими). Мультиспецифический антигенсвязывающий фрагмент антитела будет, как правило, содержать по меньшей мере два различных переменных домена, причем каждый переменный домен способен специфически связываться с отдельным антигеном или другим эпитопом на том же антигене. Любой формат мультиспецифических антител, включая в себя форматы описанных в настоящем документе иллюстративных биспецифических антител, может быть адаптирован для использования в контексте антигенсвязывающего фрагмента антитела согласно настоящему изобретению с использованием обычных техник, доступных в настоящей области техники.

Антитела согласно настоящему изобретению могут функционировать посредством комплементзависимой цитотоксичности (CDC) или антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC). "Комплементзависимая цитотоксичность" (CDC) относится к лизису экспрессирующих антиген клеток с помощью антитела согласно настоящему изобретению в присутствии комплемента. "Антитело-

зависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность" (ADCC) относится к опосредованной клетками реакции, в которой неспецифические цитотоксические клетки, которые экспрессируют рецепторы Fc (FcR) (например, клетки натуральные киллеры (NK), нейтрофилы и макрофаги), распознают связанное антитело на клетке-мишени и, таким образом, приводят к лизису клетки-мишени. CDC и ADCC могут быть измерены с помощью анализов, которые хорошо известны и доступны в настоящей области техники. (См., например, патенты США №5500362 и 5821337 и Clynes et al, PNAS USA 95:652-656 (1998).) Константная область антитела важна в способности антитела фиксировать комплемент и опосредовать зависимость от клеток цитотоксичность. Таким образом, изотип антитела может быть выбран на основании того, желательно ли для антитела опосредовать цитотоксичность.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения антитела к активину А согласно настоящему изобретению представляют собой человеческие антитела. Используемый в настоящем документе термин "человеческое антитело" предназначен для включения антитела, содержащего переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Человеческие антитела согласно настоящему изобретению могут содержать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека (например, мутации, введенные случайным или сайт-специфическим мутагенезом *in vitro* или путем соматической мутации *in vivo*), например, в CDR, и в частности CDR3. Тем не менее, используемый в настоящем документе термин "человеческое антитело" не предусматривает антитела, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии других видов млекопитающих, таких как мышь, были привиты на человеческие каркасные последовательности.

Антитела согласно настоящему изобретению могут согласно некоторым вариантам осуществления представлять собой рекомбинантные человеческие антитела. Используемый в настоящем документе термин "рекомбинантное человеческое антитело" предназначен для включения всех антител человека, которые получены, экспрессированы, созданы или выделены рекомбинантными способами, такими как антитела, экспрессированные с использованием рекомбинантного вектора экспрессии, трансфицированного в клетку-хозяина (описано дополнительно ниже), антитела, выделенные из рекомбинантной, комбинаторной библиотеки человеческих антител (описано дополнительно ниже), антитела, выделенные из животного (например, мыши), которое представляет собой трансгенное для генов иммуноглобулина человека (см., например, Taylor et al., Nucl Acids Res 20:6287-6295 (1992)), или антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любыми другими средствами, которые предполагают использование сплайсинг последовательностей гена человеческого иммуноглобулина в другие последовательности ДНК. Такие рекомбинантные человеческие антитела содержат переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Согласно некоторым вариантам осуществления, однако, такие рекомбинантные человеческие антитела подвергаются мутагенезу *in vitro* (или, когда используется животное, трансгенное по последовательностям Ig человека, соматический мутагенез *in vivo*) и, таким образом, аминокислотные последовательности областей V_H и V_L рекомбинантных антител представляют собой последовательности, которые, не смотря на то, что получены из и связаны с последовательностями V_H и V_L зародышевой линии человека, не могут существовать в природе в репертуаре антител зародышевой линии человека *in vivo*.

Человеческие антитела могут существовать в двух формах, которые связаны с шарнирной неоднородностью. В одной форме молекула иммуноглобулина содержит стабильный четырехцепочечный конструктор, составляющий приблизительно 150-160 кДа, в котором димеры удерживаются вместе с помощью межцепочечной дисульфидной связи между тяжелыми цепями. Во второй форме димеры не связаны с помощью межцепочечных дисульфидных связей и образуются молекулы, составляющие приблизительно 75-80 кДа, состоящие из ковалентно связанных легкой и тяжелой цепей (полуантитело). Эти формы были чрезвычайно трудно отделить, даже после аффинной очистки.

Частота появления второй формы в различных интактных изотипах IgG обусловлена, но не ограничена, структурными различиями, связанными с изотипом шарнирной области антитела. Замещение одной аминокислоты в шарнирной области шарнира IgG4 человека может значительно уменьшить появление второй формы (Angal et al. Molecular Immunology 30:105 1993)) до уровней, как правило, наблюдаемых с использованием шарнира IgG1 человека. Настоящее изобретение охватывает антитела, характеризующиеся наличием одной или нескольких мутаций в области петли, C_H2 или C_H3, которые могут быть желательными, например, в производстве, для повышения выхода желаемой формы антитела.

Используемый в настоящем документе термин "выделенное антитело" означает антитело, которое было идентифицировано и отделено и/или восстановлено по меньшей мере из одного компонента его природной среды. Например, антитело, которое было отделено или удалено по меньшей мере из одного компонента организма, или из ткани, или клетки, в которой антитело существует в природе или производится естественным путем, представляет собой "выделенное антитело" для целей настоящего изобретения. Выделенное антитело также включает в себя антитело *in situ* внутри рекомбинантной клетки. Выделенные антитела представляют собой антитела, которые были подвергнуты по меньшей мере одной стадии очистки или выделения. Согласно некоторым вариантам осуществления выделенное антитело может быть по существу свободным от другого клеточного материала и/или химических веществ.

Используемый в настоящем документе термин "нейтрализующее" или "блокирующее" антитело предназначен для обозначения антитела, связывание которого с активинном А: (i) препятствует взаимодействию между активинном А и рецептором активина (например, рецептором активина типа IIA, рецептором активина типа IIB, рецептором активина типа I и т.д.); (ii) препятствует образованию комплексов активин-рецептор активина и/или (iii) приводит к ингибированию по меньшей мере одной биологической функции активина А. Ингибирование, вызванное нейтрализующим или блокирующим активин А антителом, не обязательно должно быть полным до тех пор, пока он не обнаружится с использованием соответствующего анализа. Иллюстративные анализы для обнаружения ингибирования активина А описаны в действующих примерах.

Описанные в настоящем документе антитела к активину А могут содержать одну или несколько аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасных областях и/или CDR переменных доменов тяжелой и легкой цепей по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии, из которой антитела были получены. Такие мутации могут быть легко установлены путем сравнения раскрытых в настоящем документе аминокислотных последовательностей с последовательностями зародышевой линии, доступными, например, из общих баз данных последовательностей антител. Настоящее изобретение включает в себя антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые получены из любой из раскрытых в настоящем документе аминокислотных последовательностей, причем одна или несколько аминокислот в одной или нескольких каркасных областях и/или CDR мутируют до соответствующего остатка(ов) последовательности зародышевой линии, из которой антитело было получено, или до соответствующего остатка(ов) другой последовательности зародышевой линии человека, или до консервативной аминокислотной замены соответствующего остатка(ов) зародышевой линии (такие изменения последовательности называются в настоящем документе все вместе как "мутации зародышевой линии"). Специалист с обычной квалификацией в настоящей области техники, начиная с описанных в настоящем документе последовательностей переменной области тяжелой и легкой цепи, может легко произвести многочисленные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или несколько отдельных мутаций зародышевой линии или их комбинации. Согласно некоторым вариантам осуществления все остатки каркаса и/или CDR в доменах V_H и/или V_L мутируют к первоначальному виду остатков, найденных в исходной последовательности зародышевой линии, из которой антитело было получено. Согласно другим вариантам осуществления только некоторые остатки мутируют к первоначальному виду исходной последовательности зародышевой линии, например, только мутированные остатки найдены в первых 8 аминокислотах FR1 или в последних 8 аминокислотах FR4, или только мутированные остатки найдены в CDR1, CDR2 или CDR3. Согласно другим вариантам осуществления один или несколько остатков из каркасной области и/или CDR мутируют до соответствующего остатка(ов) другой последовательности зародышевой линии (т.е. последовательности зародышевой линии, которая отличается от последовательности зародышевой линии, из которой антитело изначально происходит). Кроме того, антитела согласно настоящему изобретению могут содержать любую комбинацию двух или более мутаций зародышевой линии в каркасной области и/или CDR, например, когда некоторые отдельные остатки мутируют до соответствующего остатка определенной последовательности зародышевой линии в то время, когда некоторые другие остатки, которые отличаются от исходной последовательности зародышевой линии, поддерживаются или мутируют до соответствующего остатка другой последовательности зародышевой линии. После получения антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или несколько мутаций зародышевой линии, могут быть легко исследованы на наличие одного или нескольких желательных свойств, таких как, улучшенная специфичность связывания, увеличенная аффинность связывания, улучшенные или расширенные антагонистические или агонистические биологические свойства (в зависимости от обстоятельств), пониженная иммуногенность и т.д. Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, полученные в этом общем виде, охватываются настоящим изобретением.

В настоящем изобретении также предусмотрены антитела к активину А, содержащие варианты любой из раскрытых в настоящем документе аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, содержащих одну или несколько консервативных замен. Например, настоящее изобретение включает в себя антитела к активину А, содержащие аминокислотные последовательности HCVR, LCVR и/или CDR, например с 10 или менее, с 8 или менее, с 6 или менее, с 4 или менее и т.д. консервативными аминокислотными заменами, по сравнению с любой из раскрытых в настоящем документе аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR.

Термин "эпитоп" относится к антигенной детерминанте, которая взаимодействует с конкретным антигенсвязывающим сайтом в переменной области молекулы антитела, известным как паратоп. Один антиген может содержать более одного эпитопа. Таким образом, различные антитела могут связываться с разными областями на антигене и могут характеризоваться различными биологическими эффектами. Эпитопы могут быть либо конформационными, либо линейными. Конформационный эпитоп производится с помощью пространственно совмещенных аминокислот из различных сегментов линейной полипептидной цепи. Линейный эпитоп представляет собой эпитоп, полученный с помощью смежных аминокислотных остатков в полипептидной цепи. В определенных обстоятельствах эпитоп может включать в

себя фрагменты сахаридов, фосфорильные группы или сульфонильные группы на антигене.

Термин "существенная идентичность" или "по существу идентичный" в отношении нуклеиновой кислоты или ее фрагмента показывает, что при оптимальном выравнивании с соответствующими нуклеотидными вставками или делециями с другой нуклеиновой кислотой (или ее комплементарной цепью), существует идентичность нуклеотидной последовательности, составляющая по меньшей мере приблизительно 95%, а более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 96, 97, 98 или 99% оснований нуклеотидов, как измерено с помощью любого известного алгоритма идентичности последовательностей, такого как FASTA, BLAST или Gap, как описано ниже. Молекула нуклеиновой кислоты, характеризующаяся существенной идентичностью с эталонной молекулой нуклеиновой кислоты, может в некоторых случаях кодировать полипептид, содержащий такую же или по существу аналогичную аминокислотную последовательность, что и полипептид, кодируемый эталонной молекулой нуклеиновой кислоты.

Применительно к полипептидам термин "существенное сходство" или "по существу сходный" означает, что две пептидные последовательности при оптимальном выравнивании, например, с помощью программ GAP или BESTFIT с использованием штрафа за делецию по умолчанию, характеризуются идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 95%, еще более предпочтительно идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 98 или 99%. Предпочтительно положения остатков, которые не идентичны, отличаются консервативными аминокислотными заменами. "Консервативная аминокислотная замена" представляет собой ту, в которой аминокислотный остаток замещен другим аминокислотным остатком, содержащим боковую цепь (R группу) со сходными химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). В общем, консервативная аминокислотная замена не будет существенно изменять функциональные свойства белка. В тех случаях, когда две или более аминокислотные последовательности отличаются друг от друга консервативными заменами, процент идентичности последовательности или степень сходства можно повышать для коррекции консервативной природы замещения. Средства для такой подстройки хорошо известны специалистам в настоящей области техники. См., например, Pearson, W.R., *Methods Mol Biol* 24: 307-331 (1994). Иллюстративные группы аминокислот, содержащие боковые цепи со сходными химическими свойствами, включают в себя (1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; (2) алифатические гидроксильные боковые цепи: серин и треонин; (3) амидсодержащие боковые цепи: аспарагин и глутамин; (4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; (5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; (6) кислотные боковые цепи: аспартат и глутамат и (7) серосодержащие боковые цепи: цистеин и метионин. Предпочтительные группы консервативных замен аминокислот представляют собой следующие: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин. Кроме того, консервативное замещение представляет собой какое-либо изменение, характеризующееся положительным значением в матрице логарифмического правдоподобия PAM250, раскрытой в Gonnet et al, *Science* 256: 1443-1445 (1992). "Умеренно консервативное" замещение представляет собой какое-либо изменение, характеризующееся неотрицательным значением в матрице логарифмического правдоподобия PAM250.

Сходство последовательностей для полипептидов, которое также называют идентичностью последовательностей, как правило, измеряется с помощью программного обеспечения для анализа последовательностей. Программное обеспечение для анализа белка находит соответствия между сходными последовательностями с использованием измерений сходства, закрепленного за различными заменами, делециями и другими модификациями, включающими в себя консервативные аминокислотные замены. Например, программное обеспечение GCG содержит программы, такие как Gap и BESTFIT, которые могут быть использованы с параметрами по умолчанию для определения гомологии последовательностей или идентичности последовательностей между близкородственными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды от различных видов организмов или между белком дикого типа и его мутантом. См., например, GCG Version 6.1. Полипептидные последовательности также можно сравнивать с FASTA с использованием установок по умолчанию или рекомендованных параметров, программы в GCG Version 6.1. В FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) предусмотрено выравнивание и процент идентичности последовательности областей наилучшего перекрытия между искомой последовательностью и последовательностью поиска (см., например, Pearson, W.R., *Methods Mol Biol* 132: 185-219 (2000)). Другой предпочтительный алгоритм при сравнении последовательности согласно настоящему изобретению с базой данных, содержащей большое количество последовательностей от различных организмов, представляет собой компьютерную программу BLAST, особенно BLASTP или TBLASTN, с использованием параметров по умолчанию. См., например, Altschul et al., *J Mol Biol* 215:403-410 (1990) and Altschul et al., *Nucleic Acids Res* 25:3389-402 (1997).

Биологические характеристики антител

В настоящем изобретении предусмотрены антитела к активину А и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с активином А с высокой аффинностью. Например, настоящее изобретение включает в себя антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, которые связываются с активином А (например, при 25°C или 37°C) с K_D менее чем приблизительно 30 нМ, как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формата определения, как определено

менее чем приблизительно 240 пМ, менее чем приблизительно 230 пМ, менее чем приблизительно 220 пМ, менее чем приблизительно 210 пМ, менее чем приблизительно 200 пМ, менее чем приблизительно 190 пМ, менее чем приблизительно 180 пМ, менее чем приблизительно 170 пМ, менее чем приблизительно 160 пМ, менее чем приблизительно 150 пМ или менее чем приблизительно 140 мкМ, как измерено в основанном на клетках блокирующем биоанализе, например, с помощью формата анализа, определенного в примере 5 в настоящем документе, или по существу аналогичном анализе. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению ингибируют активацию сложного пути трансдукции сигнала SMAD с помощью связывания активина АС с рецепторами активина типа I или II со значением IC_{50} менее чем приблизительно 1 нМ, менее чем приблизительно 900 пМ, менее чем приблизительно 800 пМ, менее чем приблизительно 750 пМ, менее чем приблизительно 700 пМ, менее чем приблизительно 650 пМ, менее чем приблизительно 600 пМ или менее чем приблизительно 580 пМ, как измерено в основанном на клетках блокирующем биоанализе, например, с помощью формата анализа, определенного в примере 5 в настоящем документе, или по существу аналогичном анализе.

Антитела согласно настоящему изобретению могут обладать одним или несколькими из указанных выше биологических характеристик или любой их комбинацией. Другие биологические характеристики антител согласно настоящему изобретению будут очевидны специалисту в настоящей области техники из рассмотрения настоящего описания, включающего в себя действующие приведенные в настоящем документе примеры.

Антитела к активину А, содержащие варианты Fc

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения предусмотрены антитела к активину А, содержащие домен Fc, содержащий одну или несколько мутаций, которые увеличивают или уменьшают связывание антитела с рецептором FcRn, например при кислом pH, по сравнению с нейтральным pH. Например, в настоящем изобретении предусмотрены антитела к активину А, содержащие мутацию в области C_H2 или C_H3 домена Fc, причем мутация(и) увеличивает сродство домена Fc к FcRn в кислой среде (например, в эндосоме, где pH составляет от приблизительно 5,5 до приблизительно 6,0). Такие мутации могут приводить к увеличению полужизни антитела в сыворотке при введении животному. Не ограничивающие примеры таких модификаций Fc включают в себя, например, модификацию в положении 250 (например, Е или Q); 250 и 428 (например, L или P); 252 (например, L/Y/F/W или T); 254 (например, S или T) и 256 (например, S/R/Q/E/D или T); или модификацию в положении 428 и/или 433 (например, H/L/R/S/P/Q или K) и/или 434 (например, А, W, Н, F или Y [N434A, N434W, N434H, N434F или N434Y]); или модификацию в положении 250 и/или 428; или модификацию в положении 307 или 308 (например, 308F, V308F) и 434. Согласно одному варианту осуществления модификация предусматривает модификацию 428L (например, M428L) и 434S (например, N434S); модификацию 428L, 259I (например, V259I) и 308F (например, V308F); модификацию 433K (например, H433K) и 434 (например, 434Y); модификацию 252, 254 и 256 (например, 252Y, 254T и 256E); модификацию 250Q и 428L (например, T250Q и M428L); и модификацию 307 и/или 308 (например, 308F или 308P). Согласно еще одному варианту осуществления модификация предусматривает модификацию 265 А (например, D265A) и/или 297A (например, N297A).

Например, в настоящем изобретении предусмотрены антитела к активину А, содержащие домен Fc, содержащий одну или несколько пар или групп мутаций, выбранных из группы, состоящей из 250Q и 248L (например, T250Q и M248L); 252Y, 254T и 256E (например, M252Y, S254T и T256E); 428L и 434S (например, M428L и N434S); 257I и 311I (например, P257I и Q311I); 257I и 434H (например, P257I и N434H); 376V и 434H (например, D376V и N434H); 307A, 380A и 434A (например, T307A, E380A и N434A) и 433K и 434F (например, H433K и N434F). Все возможные комбинации вышеуказанных мутаций домена Fc, а также другие мутации в раскрытых в настоящем документе вариативных доменах антител включены в объем настоящего изобретения.

В настоящем изобретении также предусмотрены антитела к активину А, содержащие химерную константную область тяжелой цепи (CH), причем химерная область CH содержит сегменты, происходящие от областей CH более чем одного изотипа иммуноглобулина. Например, антитела согласно настоящему изобретению могут содержать химерную область CH, содержащую часть или весь домен CH2, полученный из молекулы человеческого IgG1, человеческого IgG2 или человеческого IgG4, в сочетании с частью или всем доменом CH3, полученным из молекулы человеческого IgG1, человеческого IgG2 или человеческого IgG4. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела согласно настоящему изобретению содержат химерную область CH, содержащую химерную шарнирную область. Например, химерный шарнир может содержать аминокислотную последовательность "верхнего шарнира" (аминокислотные остатки с положения 216 по 227 в соответствии с нумерацией Eu), полученную из шарнирной области человеческого IgG1, человеческого IgG2 или человеческого IgG4, в сочетании с последовательностью "нижнего шарнира" (аминокислотные остатки с положения 228 по 236 в соответствии с нумерацией Eu), полученной из шарнирной области человеческого IgG1, человеческого IgG2 или человеческого IgG4. Согласно некоторым вариантам осуществления химерная шарнирная область содержит аминокислотные остатки, полученные из верхнего шарнира человеческого IgG1 или человеческого IgG4, и аминокис-

кислотные остатки, полученные из нижней петли человеческого IgG2. Антитело, содержащее описанную в настоящем документе химерную область СН, согласно некоторым вариантам осуществления может демонстрировать модифицированные эффекторные функции Fc без отрицательного воздействия на терапевтические или фармакокинетические свойства антитела. (См., например, предварительную заявку на патент США № 61/759578, поданную 1 февраля 2013 г.).

Картирование эпитопов и связанные с ним технологии

В настоящем изобретении предусмотрены антитела к активину А, которые взаимодействуют с одной или несколькими аминокислотами, обнаруженными в активине А (например, в сайте связывания рецептора активина типа II). Эпитоп, с которым связываются антитела, может состоять из одного непрерывной последовательности из 3 или более (например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более) аминокислот, расположенных в пределах субъединицы активина β А. Альтернативно эпитоп может состоять из множества несмежных аминокислот (или аминокислотных последовательностей), расположенных в пределах димера активина А.

Могут быть использованы различные техники, известные специалистам в настоящей области техники, для определения того, "взаимодействует ли антитело с одной или несколькими аминокислотами" в пределах полипептида или белка. Иллюстративные способы предусматривают, например, обычный анализ перекрестного блокирования, такой, как описан в *Antibodies*, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY), анализ аланин-сканирующий мутагенез, пептидный блот-анализ (Reineke, *Methods Mol Biol* 248: 443-463 (2004)) и анализ расщепления пептидов. Кроме того, также могут быть использованы такие способы как удаление эпитопа, извлечение эпитопа и химическая модификация антигенов (Tomer, *Protein Science* 9:487-496 (2000)). Другой способ, который может быть использован для идентификации аминокислот в полипептиде, с которым взаимодействует антитело, представляет собой водород-дейтериевый обмен, обнаруживаемый с помощью масс-спектрометрии. В общих чертах способ водород-дейтериевого обмена предусматривает мечение дейтерием представляющего интерес белка с последующим связыванием антитела с меченым дейтерием белком. Далее комплекс белок/антитело переносят в воду, чтобы позволить водород-дейтериевому обмену происходить на всех остатках, за исключением остатков, защищенных антителом (которые остаются мечеными дейтерием). После диссоциации антитела белок-мишень подвергают расщеплению протеазой и масс-спектрометрическому анализу, тем самым открывая меченные дейтерием остатки, которые соответствуют конкретным аминокислотам, с которыми взаимодействует антитело. См., например, Ehring, *Analytical Biochemistry* 267(2):252-259 (1999); Engen and Smith, *Anal. Chem.* 73:256A-265A (2001).

В настоящем изобретении дополнительно предусмотрены антитела к активину А, которые связываются с тем же эпитопом, что и любое из конкретных иллюстративных антител, описанных в настоящем документе (например, H4N10423P, H4N10424P, H4N10426P, H4N10429P, H4N10430P, H4N10432P2, H4N10433P2, H4N10436P2, H4N10437P2, H4N10438P2, H4N10440P2, H4N10442P2, H4N10445P2, H4N10446P2, H4N10447P2, H4N10448P2, H4N10452P2, H4N10468P2, H2aM10965N и т.д.). Аналогичным образом в настоящем изобретении также предусмотрены антитела к активину А, которые конкурируют за связывание с активином А с любым из конкретных иллюстративных антител, описанных в настоящем документе (например, H4N10423P, H4N10424P, H4N10426P, H4N10429P, H4N10430P, H4N10432P2, H4N10433P2, H4N10436P2, H4N10437P2, H4N10438P2, H4N10440P2, H4N10442P2, H4N10445P2, H4N10446P2, H4N10447P2, H4N10448P2, H4N10452P2, H4N10468P2, H2aM10965N и т.д.). Например, в настоящем изобретении предусмотрены антитела к активину А, которые перекрестно конкурируют за связывание с активином А с одним или несколькими антителами "Bin 1", как определено в примере 5 в настоящем документе (например, H4N10423P, H4N10446P2, H4N10468P2 и H4N10442P2). В настоящем изобретении предусмотрены антитела к активину А, которые перекрестно конкурируют за связывание с активином А с одним или несколькими антителами "Bin 2", как определено в примере 5 в настоящем документе (например, H4N10429, H4N10430P, H4N10432P2, H4N10436P2 и H4N10440P2).

Можно легко определить, связывается ли антитело с тем же эпитопом или конкурирует за связывание с эталонным антителом к активину А путем применения стандартных способов, известных в настоящей области техники, примеры которых приведены в настоящем документе. Например, чтобы определить, связывается ли исследуемое антитело с тем же эпитопом, что и эталонное антитело к активину А согласно настоящему изобретению, эталонному антителу дают связаться с активином А (или содержащим субъединицу β А гетеродимером). Далее оценивают способность исследуемого антитела связываться с активином А. Если исследуемое антитело способно связываться с активином А после насыщающего связывания с эталонным антителом к активину А, можно сделать вывод, что исследуемое антитело связывается с другим эпитопом, чем у эталонного антитела к активину А. С другой стороны, если исследуемое антитело не способно связываться с активином А при насыщающем связывании с эталонным антителом к активину А, то исследуемое антитело может связываться с тем же эпитопом, что и эпитоп, связываемый с эталонным антителом к активину А согласно настоящему изобретению. Могут быть выполнены дополнительные рутинные эксперименты (например, анализы мутации пептидов и связывания), чтобы подтвердить, из-за чего наблюдается отсутствие связывания исследуемого антитела на самом деле: из-за

связывания с тем же эпитопом, что и эталонное антитело, или стерическое блокирование (или другое явление) несет ответственность за отсутствие наблюдаемого связывания. Эксперименты такого рода могут быть выполнены с использованием ELISA, RIA, Biotac, проточной цитометрии или любого другого количественного или качественного анализа связывания антитела, доступного в настоящей области техники. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения два антитела связываются с тем же (или перекрывающимся) эпитопом, если, например, 1-, 5-, 10-, 20- или 100-кратный избыток одного антитела ингибирует связывание другого по меньшей мере на 50%, но предпочтительно на 75, 90 или даже 99%, как измерено в анализе конкурентного связывания (см., например, Junghans et al., *Cancer Res.* 50:1495-1502 (1990)). Альтернативно считается, что два антитела связываются с одним и тем же эпитопом, если по существу все аминокислотные мутации в антигене, которые уменьшают или устраняют связывание одного антитела, уменьшают или устраняют связывание другого. Считается, что два антитела характеризуются наличием "перекрывающихся эпитопов", если только есть подмножество аминокислотных мутаций, которые снижают или устраняют связывание одного антитела, уменьшают или устраняют связывание другого.

Чтобы определить, конкурирует ли антитело за связывание (или перекрестно конкурирует за связывание) с эталонным антителом к активину А, выполняется описанная выше методология связывания в двух настройках: в первой настройке эталонному антителу дают связаться с белком активином А (или содержащим субъединицу β А гетеродимером) при насыщающих условиях с последующей оценкой связывания исследуемого антитела с молекулой активина А. Во второй настройке исследуемому антителу дают связаться с активином А при насыщающих условиях с последующей оценкой связывания эталонного антитела с активином А. Если в обеих настройках только первое (насыщаемое) антитело способно связываться с активином А, то можно сделать вывод, что исследуемое антитело и эталонное антитело конкурируют за связывание с активином А (см., например, формат анализа, описанный в примере 4 настоящего документа, в котором исследуемое антитело к активину А захватывается на сенсорные накопечники, которые затем погружают в раствор, содержащий эталонное антитело к активину А, предварительно связанное с активином А). Как будет понятно специалисту в настоящей области техники, антитело, которое конкурирует за связывание с эталонным антителом, не обязательно связывается с тем же эпитопом, что и эталонное антитело, но стерически может блокировать связывание эталонного антитела путем связывания перекрывающего или смежного эпитопа.

Антитела к активину А согласно настоящему изобретению могут связываться с эпитопом на активине А, который находится в пределах или вблизи сайта связывания с рецептором активина типа II, непосредственно блокировать взаимодействие между активином А и рецептором активина типа II и опосредованно блокировать взаимодействие между активином А и рецептором активина типа I. Антитела к активину А согласно настоящему изобретению могут связываться с эпитопом на активине А, который находится внутри или вблизи сайта связывания для рецептора активина типа I и непосредственно блокировать взаимодействие между активином А и рецептором активина типа I. Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения антитело к активину А согласно настоящему изобретению, которое связывается с активином А на или вблизи сайта связывания рецептора активина типа I, не блокирует взаимодействие между активином А и рецептором активина типа II.

Получение человеческих антител

Способы получения моноклональных антител, включающих в себя полностью человеческие моноклональные антитела, известны в настоящей области техники. Любые такие известные способы могут быть использованы в контексте настоящего изобретения, чтобы получить человеческие антитела, которые специфически связываются с человеческим активином А.

С использованием технологии VELOCIMMUNE™, например, или любого другого известного способа получения полностью человеческих моноклональных антител, высокоаффинные химерные антитела к человеческому активину А представляют собой первоначально выделенные с вариательной областью человека и константной областью мыши. Как и в экспериментальном разделе ниже, антитела характеризуются и отбираются с желательными характеристиками, включающими в себя аффинность, селективность, эпитоп и т.п. Если необходимо, мышиные константные области заменяют желаемой человеческой константной областью, например, дикого типа или модифицированного IgG1 или IgG4, чтобы получить полностью человеческое антитело к активину А. В то время как выбранная константная область может варьировать в зависимости от конкретного использования, характеристики высокой аффинности связывания антигена и специфичности к мишени находятся в вариательной области. В некоторых случаях, полностью человеческие антитела к активину А выделяют непосредственно из антигенположительных В-клеток.

Биоэквиваленты

Антитела к активину А и фрагменты антител согласно настоящему изобретению охватывают белки, содержащие аминокислотные последовательности, которые отличаются от таковых описанных антител, но которые сохраняют способность связываться с человеческим активином А. Такие варианты антител и фрагменты антител содержат одну или несколько добавок, делеций или замен аминокислот, по

сравнению с исходной последовательностью, но проявляют биологическую активность, которая по существу эквивалентна таковой описанных антител. Кроме того, кодирующие антитела к активину А последовательности ДНК согласно настоящему изобретению охватывают последовательности, которые содержат одну или несколько добавок, делеций или замен нуклеотидов, по сравнению с раскрытой последовательностью, но которые кодируют антитело к активину А или фрагмент антитела, которые по существу биоэквивалентны антителу к активину А или фрагменту антитела согласно настоящему изобретению. Примеры таких вариантов аминокислотных последовательностей и последовательностей ДНК описаны выше.

Два антигенсвязывающих белка или антитела считаются биологически эквивалентными, если, например, они представляют собой фармацевтические эквиваленты или фармацевтические альтернативы, чья скорость и степень абсорбции значительно не различается при введении в той же молярной дозе в сходных условиях эксперимента, либо в одной, либо в множественной дозировке. Некоторые антитела будут рассматриваться эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, если они эквивалентны в степени их абсорбции, но не в их скорости абсорбции, и все еще могут считаться биоэквивалентными, потому что такие различия в скорости поглощения представляют собой преднамеренные и отражены в маркировке и не представляют собой необходимые для достижения эффективных концентраций лекарственных средств в организме при, например, продолжительном использовании, и считаются медицински незначительными для конкретного изучаемого лекарственного средства.

Согласно одному варианту осуществления два антигенсвязывающих белка представляют собой биологически эквивалентные, если нет клинически значимых различий в их безопасности, чистоте и активности.

Согласно одному варианту осуществления два антигенсвязывающих белка представляют собой биологически эквивалентные, если пациент один или несколько раз может переключаться между эталонным продуктом и биологическим продуктом без ожидаемого увеличения риска развития нежелательных явлений, включая в себя клинически существенные изменения в иммуногенности или уменьшенную эффективность, по сравнению с продолжением терапии без такого переключения.

Согласно одному варианту осуществления два антигенсвязывающих белка представляют собой биологически эквивалентные, если они оба действуют с помощью общего механизма или механизмов действия для состояния или состояний применения, в той степени, в какой такие механизмы известны.

Биоэквивалентность может быть продемонстрирована с помощью способов *in vivo* и *in vitro*. Измерения биоэквивалентности предусматривают, например, (a) исследование *in vivo* у людей и других млекопитающих, в котором концентрация антитела или его метаболитов измеряется в крови, плазме, сыворотке или другой биологической жидкости в качестве функции времени; (b) исследование *in vitro*, которое коррелирует и достаточно прогнозируемо из данных человеческой биодоступности *in vivo*; (c) исследование *in vivo* у людей и других млекопитающих, в котором соответствующий острый фармакологический эффект антитела (или его мишени) определяется как функция времени; и (d) в хорошо контролируемом клиническом испытании, которое устанавливает безопасность, эффективность или биодоступность или биоэквивалентность антитела.

Биоэквивалентные варианты антител к активину А согласно настоящему изобретению могут быть сконструированы, например, путем получения различных замен остатков или последовательностей или удаления концевых или внутренних остатков или последовательностей, не нужных для биологической активности. Например, остатки цистеина, не существенные для биологической активности, могут быть удалены или заменены другими аминокислотами, чтобы предотвратить образование ненужных или неправильных внутримолекулярных дисульфидных мостиков при ренатурации. В других контекстах биоэквивалентные антитела могут включать в себя варианты антител к активину А, содержащие аминокислотные изменения, которые модифицируют характеристики гликозилирования антител, например, мутации, которые устраняют или удаляют гликозилирование.

Видовая избирательность и видовая перекрестная реактивность

В настоящем изобретении в соответствии с некоторыми вариантами осуществления предусмотрены антитела к активину А, которые связываются с человеческим активином А, но не активином А от других видов. Настоящее изобретение также включает в себя антитела к активину А, которые связываются с человеческим активином А и активином А от одного или нескольких отличных от человеческих видов. Например, антитела к активину А согласно настоящему изобретению могут связываться с человеческим активином А и могут связываться или не связываться, в зависимости от обстоятельств, с одним или несколькими активинами А от мыши, крысы, морской свинки, хомячка, песчанки, свиньи, кошки, собаки, кролика, козы, овцы, коровы, лошади, верблюда, яванского макака, мартышки, шимпанзе и макака-резуса. В соответствии с некоторыми иллюстративными вариантами выполнения настоящего изобретения предусмотрены антитела к активину А, которые специфически связываются с человеческим активином А (например, активином А или содержащим субъединицу β А гетеродимером) и активином А яванского макака (например, *Macaca fascicularis*).

Иммуноконъюгаты

Настоящее изобретение охватывает моноклональные антитела к активину А, конъюгированные с

терапевтическим фрагментом ("иммуноконъюгат"), таким как цитотоксин, химиотерапевтическое лекарственное средство, иммунодепрессант или радиоизотоп. Цитотоксические средства включают в себя любое средство, которое представляет собой вредное для клеток. Примеры подходящих цитотоксических средств и химиотерапевтических средств для образования иммуноконъюгатов известны в настоящей области техники (см., например, WO 05/103081).

Мультиспецифические антитела

Антитела согласно настоящему изобретению могут быть моноспецифическими, биспецифическими или мультиспецифическими. Мультиспецифические антитела могут быть специфическими к различным эпитопам одного полипептида-мишени или могут содержать антигенсвязывающие домены, специфические для более чем одного полипептида-мишени. См., например, Tutt et al., *J Immunol* 147:60-69 (1991); Kufer et al., *Trends Biotechnol* 22:238-244 (2004). Антитела к активину А согласно настоящему изобретению могут быть связаны или совместно экспрессированы с другой функциональной молекулой, например другим пептидом или белком. Например, антитело или его фрагмент может быть функционально связан (например, с помощью химического связывания, генетического слияния, нековалентной ассоциации или иным образом) с одной или несколькими другими молекулярными структурами, такими как другое антитело или фрагмент антитела с получением биспецифического или полиспецифического антитела со вторичной специфичностью связывания. Например, в настоящем изобретении предусмотрены биспецифические антитела, причем одно плечо иммуноглобулина представляет собой специфическое к человеческому активину А или его фрагменту, а другое плечо иммуноглобулина представляет собой специфическое ко второй терапевтической мишени или конъюгировано с терапевтическим фрагментом. Один из вариантов осуществления настоящего изобретения предусматривает биспецифические антитела, причем одно плечо иммуноглобулина представляет собой специфическое к человеческому активину А или его фрагменту, а другое плечо иммуноглобулина представляет собой специфическое к GDF8.

Иллюстративный биспецифический формат антител, который может быть использован в контексте настоящего изобретения, включает в себя использование первого домена C_{H3} иммуноглобулина (Ig) и второго домена C_{H3} Ig, причем первый и второй домены C_{H3} Ig отличаются друг от друга по меньшей мере одной аминокислотой и причем по меньшей мере одно отличие аминокислоты уменьшает связывание биспецифического антитела к белку А по сравнению с биспецифическим антителом, у которого отсутствует отличие аминокислот (см., например, патент США № 8586713). Согласно одному варианту осуществления первый домен C_{H3} Ig связывается с белком А, а второй домен C_{H3} Ig содержит мутацию, которая уменьшает или отменяет связывание белка А, такую как модификация H95R (по нумерации экзонов IMGT; H435R по нумерации EU). Второй C_{H3} может дополнительно содержать модификацию Y96F (по IMGT; Y436F по EU). Дополнительные модификации, которые могут быть обнаружены во втором C_{H3} , включают в себя: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M и V82I (по LMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M и V422I по EU) в случае антител IgG1; N44S, K52N и V82I (LMGT; N384S, K392N и V422I по EU) в случае антител IgG2 и Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q, V82I и L105P (по LMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q, V422I и L445P по EU) в случае антител IgG4. Вариации по описанному выше формату биспецифических антител находятся в пределах объема настоящего изобретения.

Другие иллюстративные биспецифические форматы, которые могут быть использованы в контексте настоящего изобретения, включают в себя без ограничения, например, основанные на scFv или диателах биспецифические форматы, слияния IgG-scFv, двойной вариабельный домен (DVD)-Ig, квадрама, выступы-во-впадины, с общей легкой цепью (например, общая легкая цепь с выступами-во-впадины и т.д.), CrossMab, CrossFab; (SEED)тело, с лейциновой молнией, дуотело, IgG1/IgG2, Fab двойного действия (DAF)-IgG и Mab² биспецифические форматы (см., например, Klein et al., *mAbs* 4:6, 1-11 (2012) и цитируемые в этом отношении ссылки для рассмотрения вышеуказанных форматов). Биспецифические антитела также могут быть сконструированы с использованием конъюгации пептида/нуклеиновой кислоты, например, где неприродные аминокислоты с ортогональной химической реактивностью используют для создания конъюгатов сайтспецифических антител-олигонуклеотидов, которые затем подвергаются самосборке в многомерные комплексы с определенным составом, валентностью и геометрией. (См., например, Kazane et al., *J Am Chem Soc.* 135(1):340-346 (2013)).

Терапевтический состав и введение

В настоящем изобретении предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие антитела к активину А или их антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению. Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению составляют с подходящими носителями, вспомогательными веществами и другими средствами, которые обеспечивают улучшенный перенос, доставку, толерантность и тому подобное. Множество подходящих составов можно найти в фармакологическом справочнике, известном всем фармацевтам: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Эти составы содержат, например, порошки, пасты, мази, желе, воски, масла, липиды, содержащие липиды (катионные или анионные) везикулы (например, LLPOFECTIN™, Life Technologies, Carlsbad, CA), конъюгаты ДНК, безводные абсорбционные пасты, эмульсии масло-в-воде и вода-в-масле, эмульсии карбовакса (полиэтиленгликоли различных молекулярных весов), полутвердые гели и полу-

твердые смеси, содержащие карбовакс. См. также Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA, J Pharm Sci Technol 52:238-311 (1998).

Доза антитела, вводимого пациенту, может варьировать в зависимости от возраста и размера пациента, заболевания-мишени, состояний, пути введения и тому подобного. Предпочтительная доза, как правило, рассчитывается в соответствии с массой тела или площадью поверхности тела. Когда антитело согласно настоящему изобретению используется для лечения состояния или заболевания, связанного с активностью активина А у взрослого пациента, может быть предпочтительным внутривенное введение антитела согласно настоящему изобретению, как правило, в разовой дозе, составляющей приблизительно от 0,01 до приблизительно 20 мг/кг массы тела, более предпочтительно от приблизительно 0,02 до приблизительно 7, от приблизительно 0,03 до приблизительно 5 или от приблизительно 0,05 до приблизительно 3 мг/кг массы тела. В зависимости от тяжести состояния, частота и продолжительность лечения может быть скорректирована. Эффективные дозы и график введения антитела к активину А могут быть определены эмпирически; например, прогресс пациента может контролироваться с помощью периодической оценки, а доза соответствующим образом корректироваться. Кроме того, межвидовое масштабирование дозировок можно выполнить с помощью хорошо известных способов в настоящей области техники, (например, Mordenti et al., Pharmaceut Res 8:1351 (1991)).

Известны и могут быть использованы различные системы доставки для введения фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, например инкапсулирование в липосомы, микрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать антитело или другой терапевтический белок согласно настоящему изобретению, опосредованный рецептором эндоцитоз (см., например, Wu et al., J Biol Chem 262:4429-4432 (1987)). Антитела и другие терапевтически активные компоненты согласно настоящему изобретению также могут быть доставлены с помощью техник генной терапии. Способы введения предусматривают без ограничения внутрикожный, внутримышечный, внутрибрюшинный, внутривенный, подкожный, интраназальный, эпидуральный и оральный путь введения. Композиция может быть введена любым удобным способом, например, путем инфузии или болюсной инъекции, путем абсорбции через эпителиальные или кожно-слизистые накладки (например, слизистую оболочку полости рта, прямой кишки и слизистую оболочку кишечника и т.д.) и может быть введена вместе с другими биологически активными средствами. Введение может быть системным или местным.

Фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может быть доставлена подкожно или внутривенно с помощью стандартной иглы и шприца. Кроме того, по отношению к подкожной доставке шприц-ручка легко находит применение в доставке фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению. Такой шприц-ручка может быть многоразовым или одноразовым. Повторно используемый шприц-ручка, как правило, использует сменный картридж, содержащий фармацевтическую композицию. После того как вся фармацевтическая композиция в картридже была введена и картридж пуст, пустой картридж можно легко снять и заменить на новый картридж, который содержит фармацевтическую композицию. Шприц-ручка может быть использован повторно. В одноразовом шприце-ручке отсутствует сменный картридж. Скорее всего одноразовый шприц-ручка поставляется предварительно заполненным фармацевтической композицией, находящейся в резервуаре внутри устройства. После того, как резервуар опорожняется от фармацевтической композиции, все устройство выбрасывается.

Многочисленные многоразовые устройства-ручки и устройства доставки в виде шприца-ручки применяют при подкожной доставке фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению. Примеры включают в себя без ограничения AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Вудсток, Великобритания), ручку DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Bergdorf, Швейцария), ручку HUMALOG MIX 75/25™, ручку HUMALOG™, ручку HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly & Co., Индианаполис, Индиана), NOVOPEN™ I, II и III (Novo Nordisk, Копенгаген, Дания), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Копенгаген, Дания), ручку BD™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, Нью-Джерси), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ и OPTICLIK™ (sanofi-aventis, Франкфурт, Германия), чтобы назвать только некоторые из них. Примеры одноразовых шприцов-ручек, характеризующихся применением при подкожной доставке фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению включают в себя без ограничения ручку SOLOSTAR™ (Sanofi-Aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) и KWIKPEN™ (Eli Lilly), шприц-ручку SURECLICK™ (Amgen, Thousand Oaks, Калифорния), PENLET™ (Haselmeier, Штутгарт, Германия), EPIPEN (Dey, L.P.), ручку HUMIRA™ (Abbott Labs, Эбботт Парк Иллинойс), чтобы назвать только некоторые из них.

В некоторых ситуациях фармацевтическая композиция может быть доставлена в системе с контролируемым высвобождением. Согласно одному варианту осуществления может быть использован насос (см. Langer, выше; Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201 (1987)). Согласно другому варианту осуществления могут быть использованы полимерные материалы; см. Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), 1974, CRC Pres., Boca Raton, Florida. Согласно еще одному варианту осуществления система с регулируемым высвобождением может быть помещена в непосредственной близости от мишени композиции, таким образом, требуя только часть системной дозы (см., например, Goodson, 1984, in Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, pp. 115-138). Другие системы с контроли-

руемым высвобождением описаны в обзоре Langer, Science 249:1527-1533 (1990).

Инъекционные препараты могут включать в себя лекарственные формы для внутривенных, подкожных, внутривидеальных и внутримышечных инъекций, капельных инфузий и т.д. Эти препараты для инъекций могут быть получены широко известными способами. Например, препараты для инъекций могут быть получены, например, путем растворения, суспендирования или эмульгирования антитела или его соли, описанной выше, в стерильной водной среде или масляной среде, обычно используемой для инъекций. В качестве водной среды для инъекций используется, например, физиологический раствор, изотонический раствор, содержащий глюкозу и другие вспомогательные средства и т.п., которые могут быть использованы в комбинации с соответствующим солюбилизирующим средством, таким как спирт (например, этанол), многоатомный спирт (например, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль), неионное поверхностно-активное вещество (например, полисорбат 80, HCO-50 (полиоксиэтилен (50 моль) аддукт гидрированного касторового масла)) и т.п. В качестве масляной среды используется, например, кунжутное масло, соевое масло и т.п., которые могут быть использованы в сочетании с солюбилизирующим средством, таким как бензилбензоат, бензиловый спирт и т.п. Инъекции, полученные таким образом, предпочтительно заполняют в соответствующую ампулу.

Предпочтительно описанные выше фармацевтические композиции для перорального или парентерального применения получают в лекарственных формах в виде единичной дозы, подходящей, чтобы соответствовать дозе активных ингредиентов. Такие лекарственные формы в виде единичной дозы включают в себя, например, таблетки, пилюли, капсулы, инъекции (ампулы), суппозитории и т.п. Количество содержащегося вышеупомянутого антитела в общем составляет приблизительно от 5 до приблизительно 500 мг на дозированную форму в виде единичной дозы; особенно в форме инъекции предпочтительно, чтобы вышеуказанное антитело содержалось в дозе от приблизительно 5 до приблизительно 100 мг и в дозе от приблизительно 10 до приблизительно 250 мг для других дозированных форм.

Терапевтическое применение антител

Антитела согласно настоящему изобретению пригодны, в частности, для лечения, профилактики и/или облегчения любого заболевания или нарушения, связанного с или опосредованного экспрессией, сигнализацией или активностью активина А, или подвергаемого лечению путем блокирования взаимодействия между активинном А и рецептором активина (например, ActRIIA, ActRIIB, рецептором активина типа I и т.д.) или иным образом ингибирования активности и/или сигнализации активина А. Например, в настоящем изобретении предусмотрены способы лечения состояний или заболеваний, которые могут быть вылечены, ослаблены или улучшены путем увеличения мышечной силы/мощности и/или мышечной массы и/или мышечной функции у пациента, либо путем выгодного изменения метаболизма (процессинга углеводов, жиров и белков) путем специфического связывания активина А и не связывания других лигандов ActRIIB, или путем специфического связывания активина А и GDF8 и не связывания других лигандов ActRIIB. Например, в настоящем изобретении предусмотрены способы увеличения мышечной силы/мощности, и/или мышечной массы, и/или мышечной функции у субъекта или лечения заболевания или нарушения, характеризующегося снижением мышечной массы или силы у субъекта, путем введения субъекту специфического к активину А связывающего белка. В настоящем изобретении также предусмотрены способы увеличения мышечной силы/мощности, и/или мышечной массы, и/или мышечной функции у субъекта или лечения заболевания или нарушения, характеризующегося снижением мышечной массы или силы у субъекта, путем введения субъекту специфического к активину А связывающего белка и специфического к GDF8 связывающего белка. Любой из раскрытых или упомянутых в настоящем документе специфических к активину А связывающих белков и/или специфических к GDF8 связывающих белков может быть использован в контексте этих аспектов настоящего изобретения. Например, терапевтические способы настоящего изобретения предусматривают введение субъекту антитела к активину А и/или антитела к GDF8.

Таким образом, в контексте описанных в настоящем документе способов лечения антитело к активину А может быть введено в виде монотерапии (т.е. в качестве единственного терапевтического средства) или в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами (например, антителом к GDF8), дополнительные примеры которых описаны в настоящем документе в других местах.

В способах, которые предусматривают введение специфического к активину А связывающего белка и специфического к GDF8 связывающего белка субъекту, специфический к активину А связывающий белок и специфический к GDF8 связывающий белок может быть введен субъекту в то же или по существу то же время, например, в одной терапевтической дозе или в виде двух отдельных доз, которые вводят одновременно или в течение менее чем приблизительно 5 мин между друг другом. Альтернативно специфический к активину А связывающий белок и специфический к GDF8 связывающий белок может быть введен субъекту последовательно, например, в виде отдельных терапевтических доз, разделенных во времени друг от друга более чем на 5 мин.

В настоящем изобретении также предусмотрены способы увеличения мышечной силы/мощности, и/или мышечной массы, и/или мышечной функции у субъекта или лечения заболевания или нарушения, характеризующегося снижением мышечной массы или силы у субъекта, путем введения субъекту анти-

генсвязывающей молекулы, содержащей специфический к активину А связывающий домен и специфический к GDF8 связывающий домен. Любая из раскрытых или упомянутых в настоящем документе антигенсвязывающих молекул может быть использована в контексте данного аспекта настоящего изобретения. Например, терапевтические способы согласно настоящему изобретению предусматривают введение субъекту биспецифического антитела, содержащего первый вариабельный домен, содержащий пару HCVR/LCVR, который специфически связывается с активинном А, и второй вариабельный домен, содержащий пару HCVR/LCVR, который специфически связывается с GDF8.

Композиции согласно настоящему изобретению могут быть введены субъекту вместе с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами, включающими в себя, например, ингибиторы фактора роста, иммуносупрессанты, противовоспалительные средства, метаболические ингибиторы, ингибиторы ферментов и цитотоксические/цитостатические средства. Дополнительное терапевтическое средство(а) можно вводить до, одновременно с или после введения специфических к активину А и GDF8 связывающих белков согласно настоящему изобретению.

Иллюстративные заболевания, нарушения и состояния, которые можно лечить композициями согласно настоящему изобретению, включают в себя без ограничения саркопению, кахексию (либо идиопатическую, либо вторичную по отношению к другим состояниям, например злокачественной опухоли, хронической почечной недостаточности или хронической обструктивной болезни легких), повреждение мышц, травму мышц, мышечную слабость и мышечную атрофию, например мышечную атрофию или слабость, вызванную или связанную с бездействием, например мышечной иммобилизацией, постельным режимом, повреждением, медицинским воздействием или хирургическим вмешательством (например, перелом шейки бедра, замещение тазобедренного сустава, замещение коленного сустава и других суставов, травмы сухожилий или связок, такие как разрывы переднего отдела крестообразной связки (ACL) и/или медиальной коллатеральной связки (MCL) и т.д.), мышечную дистрофию (например, миотоническую, Дюшенна, Беккера, тазового пояса, плече-лопаточно-лицевую (FSHD, известную также как болезнь Ландузи-Дежерина), врожденную, акулофарингеальную, дистальную, Эмери-Дрейфуса и т.д.), вызванную глюкокортикоидами миопатию, реабилитацию после инсульта (например, реабилитацию гемипареза после инсульта) или при необходимости механической вентиляции. Композиции согласно настоящему изобретению также могут быть использованы для лечения, предотвращения или облегчения таких заболеваний как злокачественная опухоль, ожирение, сахарный диабет, артрит, рассеянный склероз, мышечная дистрофия, боковой амиотрофический склероз, болезнь Паркинсона, остеопороз, остеоартрит, остеопения и метаболические синдромы (включающие в себя без ограничения сахарный диабет, ожирение, нарушения питания, атрофию органов, хроническую обструктивную болезнь легких и анорексию). Дополнительные заболевания, нарушения и состояния, которые могут быть предотвращены, излечены и/или облегчены с использованием композиций согласно настоящему изобретению, включают в себя сепсис, хроническую сердечную недостаточность, доброкачественные и злокачественные феохромоцитомы, миомы/лейомиому матки, преэклампсию, келоидные рубцы и гипертрофические рубцы и гипертонию легочной артерии.

Улучшенная специфичность связывания и активность

В настоящем изобретении предусмотрены способы увеличения мышечной силы/мощности, и/или мышечной массы, и/или мышечной функции у субъекта или лечения заболевания или нарушения, характеризующегося снижением мышечной массы или силы у субъекта, или лечения заболевания или нарушения, вызванного, спровоцированного или усугубленного активностью активина А, не вызывая нежелательных явлений, связанных с введением молекул, которые связываются с несколькими (например, 3 или более) лигандами ActRIIB. Другими словами, способы с использованием антитела к активину А или его антигенсвязывающих белков (например, при которых антитело к активину А только значительно связывается с активинном А) могут лечить заболевание или нарушение, не вызывая нежелательные или побочные эффекты, наблюдаемые с молекулами, которые связываются с несколькими лигандами ActRIIB. Например, клиническая молекула, называемая ACE-031 (Acceleron Pharma, Inc., Cambridge, MA), представляет собой мультимер, состоящий из внеклеточной части ActRIIB, слитой с доменом Fc IgG (эта молекула также упоминается в настоящем документе как "ActRIIB-Fc"). ActRIIB-Fc связывается с активинном А, а также другими лигандами, такими как ActRIIB, например с активинном В, GDF8, GDF11, BMP9, BMP 10 и TGFP, и, как известно, вызывает различные нежелательные явления при введении пациентам. Важно отметить, что авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что специфически ингибирующие активин А и GDF8 (например, путем введения антитела к активину А и антитела к GDF8), в то время как не ингибирующие другие лиганды ActRIIB, такие как активин В, GDF11, BMP9, BMP 10 и TGFP, приводят к увеличению мышечной массы, которое по меньшей мере эквивалентно тому, которое наблюдается при введении ActRIIB-Fc, не вызывая нежелательных явлений, связанных со связывающими средствами, такими как ActRIIB-Fc.

Комбинированные способы лечения и составы

В настоящем изобретении предусмотрены композиции и терапевтические составы, содержащие любое из описанных в настоящем документе антител к активину А в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтически активными компонентами, и способы лечения, предусматри-

вающие введение таких комбинаций нуждающимся в этом субъектам. В настоящем изобретении также предусмотрены композиции и терапевтические композиции, содержащие любое из описанных в настоящем документе антител к активину А в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтически активными компонентами, и способы лечения, предусматривающие введение таких комбинаций нуждающимся в этом субъектам. Например, антитела к активину А согласно настоящему изобретению также можно вводить и/или совместно составлять в комбинации с противовирусными препаратами, антибиотиками, анальгетиками, кортикостероидами, стероидами, кислородом, антиоксидантами, металлохелатами, IFN-гамма и/или нестероидными противовоспалительными средствами. Антитела к активину А согласно настоящему изобретению могут быть также введены как часть схемы лечения, которая также включает в себя лучевую терапию и/или обычную химиотерапию (например, в контексте способов лечения злокачественной опухоли или ингибирования роста опухоли). Любой из вышеупомянутых дополнительных терапевтически активных компонентов может быть введен в сочетании с любым из антител к активину А согласно настоящему изобретению для лечения любого заболевания или нарушения, при котором введение антитела к активину А эффективно, включая в себя, например, саркопению, кахексию, травмы мышц, мышечную слабость и атрофию мышц. Любой из вышеупомянутых дополнительных терапевтически активных компонентов может быть также введен в комбинации с любым из антител к активину А согласно настоящему изобретению вместе с ингибитором GDF8 (например, антителом к GDF8).

Дополнительный терапевтически активный компонент(ы) можно вводить субъекту до введения антитела к активину А согласно настоящему изобретению. Например, первый компонент может считаться вводимым "до" второго компонента, если первый компонент вводят за 1 неделю, за 72 ч, за 60 ч, за 48 ч, за 36 ч, за 24 ч, за 12 ч, за 6 ч, за 5 ч, за 4 ч, за 3 ч, за 2 ч, за 1 ч, за 30 мин, за 15 мин, за 10 мин, за 5 мин или менее чем за 1 мин до введения второго компонента. Согласно другим вариантам осуществления дополнительный терапевтически активный компонент(ы) можно вводить субъекту после введения антитела к активину А согласно настоящему изобретению. Например, первый компонент может считаться вводимым "после" второго компонента, если первый компонент вводят через 1 мин после, через 5 мин после, через 10 мин после, через 15 мин после, через 30 мин после, через 1 ч после, через 2 ч после, через 3 ч после, через 4 ч после, через 5 ч после, через 6 ч после, через 12 ч после, через 24 ч после, через 36 ч после, через 48 ч после, через 60 ч после, через 72 ч после введения второго компонента. Согласно другим вариантам осуществления дополнительный терапевтически активный компонент(ы) можно вводить субъекту одновременно с введением антитела к активину А согласно настоящему изобретению. "Параллельное" введение для целей настоящего изобретения предусматривает, например, введение антитела к активину А и дополнительного терапевтически активного компонента субъекту в одной лекарственной форме или в отдельных лекарственных формах, вводимых субъекту в течение приблизительно 30 мин или менее между друг другом. При введении в виде отдельных лекарственных форм каждая дозированная форма может быть введена тем же путем (например, как антитело к активину А, так и дополнительный терапевтически активный компонент может быть введен внутривенно, подкожно, в стекловидное тело и т.д.); альтернативно каждая дозированная форма может быть введена другим путем (например, антитело к активину А можно вводить местно (например, в стекловидное тело), а дополнительный терапевтически активный компонент можно вводить системно). В любом случае введение компонентов в виде однократной дозированной формы, в отдельных дозированных формах по тому же пути или в отдельных дозированных формах различными путями считается "одновременным введением" для целей настоящего изобретения. Для целей настоящего изобретения введение антитела к активину А "до", "одновременно с" или "после" (как эти термины определены в настоящем документе выше) введения дополнительного терапевтически активного компонента рассматривают как введение антитела к активину А "в сочетании с" дополнительным терапевтически активным компонентом.

В настоящем изобретении предусмотрены фармацевтические композиции, в которых антитело к активину А согласно настоящему изобретению совместно составлены с одним или несколькими из дополнительных терапевтически активных компонентов, как описано в настоящем документе в другом месте.

Дозировка

Количество активного ингредиента (например, антител к активину А, антител к GDF8 в комбинации с антителами к активину А или биспецифическими антителами, которые специфически связываются с активинем А и GDF8), которое может быть введено субъекту, составляет в общем случае терапевтически эффективное количество. Используемое в настоящем документе словосочетание "терапевтически эффективное количество" означает дозу антигенспецифических связывающих белков и/или их антигенсвязывающих молекул, которая приводит к заметному увеличению одного или нескольких из следующих параметров: вес тела, мышечная масса (например, масса передней большеберцовой (TA) мышцы, масса икроножной (GA) мышцы, масса четырехглавой (Quad) мышцы и т.д.), мышечная сила/мощность и/или мышечная функция. Например, "терапевтически эффективное количество" специфического к активину А связывающего белка и/или специфического к GDF8 связывающего белка предусматривает, например, количество специфического к активину А связывающего белка и/или специфического к GDF8 связывающего белка, которое при введении исследуемому субъекту вызывает увеличение мышечной массы TA или GA по меньшей мере на 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60% или более, по сравнению с контролем.

ными обработанными субъектами, например, как показано в примере 7 в настоящем документе.

В случае антител согласно настоящему изобретению (например, антител к активину А, антител к GDF8 в комбинации с антителами к активину А или биспецифических антител, которые специфически связываются с активинном А и GDF8), терапевтически эффективное количество может составлять от приблизительно 0,05 мг до приблизительно 600 мг; например, приблизительно 0,05 мг, приблизительно 0,1 мг, приблизительно 1,0 мг, приблизительно 1,5 мг, приблизительно 2,0 мг, приблизительно 10 мг, приблизительно 20 мг, приблизительно 30 мг, приблизительно 40 мг, приблизительно 50 мг, приблизительно 60 мг, приблизительно 70 мг, приблизительно 80 мг, приблизительно 90 мг, приблизительно 100 мг, приблизительно 110 мг, приблизительно 120 мг, приблизительно 130 мг, приблизительно 140 мг, приблизительно 150 мг, приблизительно 160 мг, приблизительно 170 мг, приблизительно 180 мг, приблизительно 190 мг, приблизительно 200 мг, приблизительно 210 мг, приблизительно 220 мг, приблизительно 230 мг, приблизительно 240 мг, приблизительно 250 мг, приблизительно 260 мг, приблизительно 270 мг, приблизительно 280 мг, приблизительно 290 мг, приблизительно 300 мг, приблизительно 310 мг, приблизительно 320 мг, приблизительно 330 мг, приблизительно 340 мг, приблизительно 350 мг, приблизительно 360 мг, приблизительно 370 мг, приблизительно 380 мг, приблизительно 390 мг, приблизительно 400 мг, приблизительно 410 мг, приблизительно 420 мг, приблизительно 430 мг, приблизительно 440 мг, приблизительно 450 мг, приблизительно 460 мг, приблизительно 470 мг, приблизительно 480 мг, приблизительно 490 мг, приблизительно 500 мг, приблизительно 510 мг, приблизительно 520 мг, приблизительно 530 мг, приблизительно 540 мг, приблизительно 550 мг, приблизительно 560 мг, приблизительно 570 мг, приблизительно 580 мг, приблизительно 590 мг, приблизительно 600 мг, приблизительно 610 мг, приблизительно 620 мг, приблизительно 630 мг, приблизительно 640 мг, приблизительно 650 мг, приблизительно 660 мг, приблизительно 670 мг, приблизительно 680 мг, приблизительно 690 мг, приблизительно 700 мг, приблизительно 710 мг, приблизительно 720 мг, приблизительно 730 мг, приблизительно 740 мг, приблизительно 750 мг, приблизительно 760 мг, приблизительно 770 мг, приблизительно 780 мг, приблизительно 790 мг, приблизительно 800 мг, приблизительно 810 мг, приблизительно 820 мг, приблизительно 830 мг, приблизительно 840 мг, приблизительно 850 мг, приблизительно 860 мг, приблизительно 870 мг, приблизительно 880 мг, приблизительно 890 мг, приблизительно 900 мг, приблизительно 910 мг, приблизительно 920 мг, приблизительно 930 мг, приблизительно 940 мг, приблизительно 950 мг, приблизительно 960 мг, приблизительно 970 мг, приблизительно 980 мг, приблизительно 990 мг или приблизительно 1000 мг соответствующего антитела.

Количество антитела согласно настоящему изобретению (например, антител к активину А, антител к GDF8 в комбинации с антителами к активину А или биспецифических антител, которые специфически связываются с активинном А и GDF8), содержащееся в отдельных дозах, может быть выражено в терминах миллиграмм антитела на килограмм массы тела пациента (например, мг/кг). Например, антитела к активину А, к GDF8 и/или к активину А/к GDF8 биспецифические антитела согласно настоящему изобретению можно вводить пациенту в дозе, составляющей приблизительно от 0,0001 до приблизительно 50 мг/кг массы пациента (например, 0,1 мг/кг, 0,5 мг/кг, 1,0 мг/кг, 1,5 мг/кг, 2,0 мг/кг, 2,5 мг/кг, 3,0 мг/кг, 3,5 мг/кг, 4,0 мг/кг, 4,5 мг/кг, 5,0 мг/кг, 5,5 мг/кг, 6,0 мг/кг, 6,5 мг/кг, 7,0 мг/кг, 7,5 мг/кг, 8,0 мг/кг, 8,5 мг/кг, 9,0 мг/кг, 9,5 мг/кг, 10,0 мг/кг, 10,5 мг/кг, 11,0 мг/кг, 11,5 мг/кг, 12,0 мг/кг, 12,5 мг/кг, 13,0 мг/кг, 13,5 мг/кг, 14,0 мг/кг, 14,5 мг/кг, 15,0 мг/кг, 15,5 мг/кг, 16,0 мг/кг, 16,5 мг/кг, 17,0 мг/кг, 17,5 мг/кг, 18,0 мг/кг, 18,5 мг/кг, 19,0 мг/кг, 19,5 мг/кг, 20,0 мг/кг и т.д.).

Композиции согласно настоящему изобретению могут содержать равные количества специфического к активину А связывающего белка и специфического к GDF8 связывающего белка. Альтернативно количество специфического к активину А связывающего белка в композиции может быть меньше или больше, чем количество специфического к GDF8 связывающего белка. Специалист с обычной квалификацией в настоящей области техники с использованием рутинного экспериментирования сможет определить соответствующие количества отдельных компонентов в композициях согласно настоящему изобретению, необходимые для получения желаемого терапевтического эффекта.

Схемы введения

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения несколько доз активного ингредиента (например, антитела к активину А, антитела к GDF8, вводимого в комбинации с антителом к активину А, фармацевтической композицией, содержащей комбинацию антитела к активину А и любое из дополнительных терапевтически активных средств, упомянутых в настоящем документе, включая в себя, например, антитело к GDF8 или биспецифическое антитело, которое специфически связывается с активинном А и GDF8) можно вводить субъекту в течение определенного периода времени. Способы в соответствии с данным аспектом настоящего изобретения предусматривают последовательное введение субъекту многократных доз активного ингредиента согласно настоящему изобретению. Используемый в настоящем документе термин "последовательное введение" означает, что каждую дозу активного ингредиента вводят субъекту в различное время, например, в разные дни, разделенные заданным интервалом (например, часами, днями, неделями или месяцами). В настоящем изобретении предусмотрены способы, которые предусматривают последовательное введение пациенту одной начальной дозы активного ингредиента с последующей одной или несколькими вторичными дозами активного ингредиента и необязательно с последующей одной или более третичными дозами активного ингредиента.

Термины "начальная доза", "вторичные дозы" и "третичные дозы" относятся к временной последовательности введения активного ингредиента, например, антитела к активину А согласно настоящему изобретению, или комбинированной терапии согласно настоящему изобретению, например, антитело к активину А и антитело к GDF8. Таким образом, "начальная доза" представляет собой дозу, которая вводится в начале схемы лечения (также называемая как "исходная доза"); "вторичные дозы" представляют собой дозы, которые вводятся после первоначальной дозы; и "третичные дозы" представляют собой дозы, которые вводятся после вторичных доз. Начальные, вторичные и третичные дозы могут содержать такое же количество активного ингредиента, например, антитела к активину А, но, как правило, могут отличаться друг от друга с точки зрения частоты введения. Согласно некоторым вариантам осуществления, однако, количество активного ингредиента, например, антитела к активину А, содержащегося в начальной, вторичной и/или третичной дозах, отличается друг от друга (например, повышается или понижается по мере необходимости) во время лечения. Согласно некоторым вариантам осуществления две или более (например, 2, 3, 4 или 5) дозы вводят в начале схемы лечения в виде "насыщающих доз" с последующими дозами, которые вводят на менее частой основе (например, "поддерживающие дозы").

Согласно некоторым иллюстративным вариантам осуществления настоящего изобретения каждую вторичную и/или третичную дозу вводят через от 1 до 26 (например, через

1, 1½, 2, 2½, 3, 3½, 4, 4½, 5, 5½, 6, 6½, 7, 7½, 8, 8½, 9, 9½, 10, 10½, 11,

11½, 12, 12½, 13, 13½, 14, 14½, 15, 15½, 16, 16½, 17, 17½, 18, 18½, 19, 19½, 20, 20½, 21,

21½, 22, 22½, 23, 23½, 24, 24½, 25, 25½, 26, 26½

или более) недель сразу после непосредственно предшествующей дозы. Используемая в настоящем документе фраза "непосредственно предшествующая доза" означает, в последовательности нескольких введений, дозу активного ингредиента, например антитела к активину А, которую вводят пациенту перед введением ближайшей следующей дозы в последовательности без промежуточных доз.

Способы в соответствии с данным аспектом настоящего изобретения могут предусматривать введение пациенту любого количества вторичных и/или третичных доз активного ингредиента согласно настоящему изобретению, например антитела к активину. Например, согласно некоторым вариантам осуществления пациенту вводят только одну вторичную дозу. Согласно другим вариантам осуществления пациенту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) вторичных доз. Кроме того, согласно некоторым вариантам осуществления пациенту вводят только одну третичную дозу. Согласно другим вариантам осуществления пациенту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) третичных доз.

Согласно вариантам осуществления, предусматривающим несколько вторичных доз, каждая вторичная доза может быть введена с той же частотой, что и другие вторичные дозы. Например, каждая вторичная доза может быть введена пациенту через от 1 до 2 недель или от 1 до 2 месяцев после непосредственно предшествующей дозы. Кроме того, согласно вариантам осуществления, предусматривающим несколько третичных доз, каждая третичная доза может быть введена с той же частотой, что и другие третичные дозы. Например, каждая третичная доза может быть введена пациенту через от 2 до 12 недель после непосредственно предшествующей дозы. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения частота, с которой вторичные и/или третичные дозы вводят пациенту, может изменяться в ходе режима лечения. Частота введения также может быть скорректирована в течение курса лечения врачом в зависимости от потребностей конкретного пациента после клинического обследования.

В настоящем изобретении предусмотрены схемы введения, при которых от 2 до 6 насыщающих доз вводят пациенту с первой частотой (например, один раз в неделю, раз в две недели, раз в три недели, раз в месяц, раз в два месяца и т.д.), с последующим введением двух или более доз пациенту с меньшей частотой. Например, в соответствии с этим аспектом настоящего изобретения, если насыщающие дозы вводят с частотой один раз в месяц, то поддерживающие дозы можно вводить пациенту один раз в шесть недель, один раз в два месяца, раз в три месяца и т.д.

Диагностические применения антител

Антитела к активину А согласно настоящему изобретению могут также использоваться для обнаружения и/или измерения активина А или экспрессирующих активин А клеток в образце, например, для диагностических целей. Например, антитело к активину А или его фрагмент может быть использован для диагностики состояния или заболевания, характеризующегося аберрантной экспрессией (например, избыточной экспрессией, недостаточной экспрессией, отсутствием экспрессии и т.д.) активина А. Иллюстративные диагностические анализы для активина А могут предусматривать, например, контактирование образца, полученного от пациента, с антителом к активину А согласно настоящему изобретению, причем антитело к активину А метят обнаруживаемой меткой или репортерной молекулой. Альтернативно немеченое антитело к активину А может быть использовано в диагностических применениях в сочетании со вторичным антителом, которое само по себе представляет собой обнаруживаемую метку. Обнаруживаемая метка или репортерная молекула может представлять собой радиоизотоп, такой как ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{125}I , или флуоресцентный или хемилюминесцентный фрагмент, такой как флуоресцеинизотиоцианат или

родамин; или такой фермент как щелочная фосфатаза, бета-галактозидаза, пероксидаза хрена или люцифераза. Конкретные иллюстративные анализы, которые могут быть использованы для обнаружения или измерения активина А в образце, включают в себя фермент-связанный иммуносорбентный анализ (ELISA), радиоиммунный анализ (RIA) и сортировку активированных флуоресценцией клеток (FACS).

Образцы, которые могут быть использованы в качестве диагностических анализов активина А в соответствии с настоящим изобретением, включают в себя любые ткани или жидкие образцы, получаемые от пациента, которые содержат обнаруживаемые количества белка активина А или его фрагменты, при нормальных или патологических состояниях. Как правило, содержание активина А в конкретном образце, полученном от здорового пациента (например, пациента, не страдающего от заболевания или состояния, связанного с аномальным содержанием или активностью активина А), будет измеряться, чтобы первоначально установить исходное, или стандартное, содержание активина А. Это исходное содержание активина А затем можно сравнить с содержанием активина А, измеренным в образцах, полученных от индивидуумов, подозреваемых в наличии связанного с активинем А заболевания или состояния.

Примеры

Следующие примеры изложены для того, чтобы обеспечить специалистов в настоящей области техники полным раскрытием и описанием того, как создавать и использовать способы и композиции согласно настоящему изобретению, и не предназначены для ограничения объема того, что изобретатели считают своим изобретением. Были предприняты усилия, чтобы обеспечить точность в отношении используемых чисел (например, количеств, температуры и т.п.), но некоторые экспериментальные ошибки и отклонения должны учитываться. Если не указано иное, части представляют собой части по массе, молекулярная масса представляет собой среднюю молекулярную массу, температура выражается в градусах Цельсия и давление равно или близко к атмосферному.

Пример 1. Создание человеческих антител к активину А Иммуноген, содержащий белок активин А (димер ингибина β А) вводили непосредственно с адъювантом, чтобы стимулировать иммунный ответ, мыши VELOCIMMUNE®, содержащей ДНК, кодирующую вариабельные области тяжелой и легкой цепи каппа иммуноглобулина человека. Иммунный ответ антитела контролировали с помощью специфического к активину А иммуноферментного анализа. Когда достигали желаемого иммунного ответа, спленоциты собирали и сливали с клетками мышины миеломы, чтобы сохранить их жизнеспособность и образовать гибридомные клеточные линии. Линии клеток гибридомы подвергали скринингу и выбирали для идентификации клеточных линий, которые продуцируют специфические к активину А антитела. С использованием этой техники получали несколько химерных антител к активину А (например, антител, обладающих вариабельными доменами человека и константными доменами мыши). Иллюстративное антитело, полученное таким способом, представляет собой H2aM10965N. Вариабельные домены человека из химерных антител впоследствии клонировали на константные домены человека, чтобы получить полностью человеческие антитела к активину А, как описано в настоящем документе.

Антитела к активину А также выделяли непосредственно из антиген-положительных В-клеток без слияния с клетками миеломы, как описано в патенте США 2007/0280945A1. С использованием этого способа получали несколько полностью человеческих антител к активину А (т.е. антител, обладающих вариабельными доменами человека и константными доменами человека); иллюстративные антитела, полученные таким образом, обозначали следующим образом: H4N10423P, H4N10429P, H4N10430P, H4N10432P2, H4N10440P2, H4N10442P2, H4N10436P2 и H4N10446P2.

Некоторые биологические свойства иллюстративных антител к активину А, получаемых в соответствии со способами этого примера, подробно описаны в приведенных ниже примерах.

Пример 2. Аминокислотные последовательности вариабельной области тяжелой и легкой цепи

В табл. 1 представлены пары аминокислотных последовательностей вариабельных областей тяжелой и легкой цепи выбранных антител к активину А и соответствующие идентификаторы антител. Соответствующие идентификаторы последовательностей нуклеиновых кислот представлены в табл. 2.

Таблица 1. Идентификаторы аминокислотных последовательностей

Обозначение аминокислот	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H4N10423P	2	4	6	8	10	12	14	16
H4N10424P	18	20	22	24	26	28	30	32
H4N10426P	34	36	38	40	42	44	46	48
H4N10429P	50	52	54	56	58	60	62	64
H4N10430P	66	68	70	72	74	76	78	80
H4N10432P2	82	84	86	88	90	92	94	96
H4N10433P2	98	100	102	104	90	92	94	96
H4N10436P2	106	108	110	112	90	92	94	96
H4N10437P2	114	116	118	120	90	92	94	96
H4N10438P2	122	124	126	128	90	92	94	96
H4N10440P2	130	132	134	136	90	92	94	96
H4N10442P2	138	140	142	144	146	148	150	152
H4N10445P2	154	156	158	160	146	148	150	152
H4N10446P2	162	164	166	168	146	148	150	152
H4N10447P2	170	172	174	176	146	148	150	152
H4N10448P2	178	180	182	184	146	148	150	152
H4N10452P2	186	188	190	192	146	148	150	152
H4N10468P2	194	196	198	200	146	148	150	152
H2aM10965N	202	204	206	208	210	212	214	216

Таблица 2. Идентификаторы последовательностей нуклеиновых кислот

Обозначение антитела	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H4N10423P	1	3	5	7	9	11	13	15
H4N10424P	17	19	21	23	25	27	29	31
H4N10426P	33	35	37	39	41	43	45	47
H4N10429P	49	51	53	55	57	59	61	63
H4N10430P	65	67	69	71	73	75	77	79
H4N10432P2	81	83	85	87	89	91	93	95
H4N10433P2	97	99	101	103	89	91	93	95
H4N10436P2	105	107	109	111	89	91	93	95
H4N10437P2	113	115	117	119	89	91	93	95
H4N10438P2	121	123	125	127	89	91	93	95
H4N10440P2	129	131	133	135	89	91	93	95
H4N10442P2	137	139	141	143	145	147	149	151
H4N10445P2	153	155	157	159	145	147	149	151
H4N10446P2	161	163	165	167	145	147	149	151
H4N10447P2	169	171	173	175	145	147	149	151
H4N10448P2	177	179	181	183	145	147	149	151
H4N10452P2	185	187	189	191	145	147	149	151
H4N10468P2	193	195	197	199	145	147	149	151
H2aM10965N	201	203	205	207	209	211	213	215

Антитела, как правило, называют в настоящем документе в соответствии со следующей номенклатурой: префикс Fc (например, "H1M", "H2aM", "H4N"), за которым следует числовой идентификатор (например, "10423", "10424" или "10426", как показано в табл. 1 и 2), а затем суффикс "P", "P2" или "N". Таким образом, в соответствии с этой номенклатурой, антитело может называться в настоящем документе как, например, "H4N10423P", "H4N10432P2", "H2aM10965N" и т.д. Префиксы H1M, H2M и H4N на обозначениях антител, используемых в настоящем документе, указывают на определенный изотип области Fc антитела. Например, антитело "H2aM" содержит Fc мышинного IgG2a, тогда как антитело "H4N" содержит Fc IgG4 человека. Как будет понятно специалисту в настоящей области техники, антитело, характеризующееся определенным изотипом Fc, может быть преобразовано в антитело с другим изотипом Fc (например, антитело с Fc мышинного IgG2a может быть преобразовано в антитело с IgG4 человека и т.д.), но в любом случае, вариабельные домены (включающие в себя CDR), которые обозначены числовыми идентификаторами, показанными в табл. 1, останутся такими же, а связывающие свойства, как ожидается, могут быть одинаковыми или по существу аналогичными, независимо от природы домена Fc.

Контрольные конструкторы, используемые в следующих примерах

Контрольные молекулы к активину А включали в следующие примеры для сравнительных целей. Контрольное антитело, обозначенное в настоящем документе как контроль 1, представляет собой чело-

веческое антитело к активину А с последовательностями варибельного домена тяжелой и легкой цепи "A1", как изложено в патенте США № 8309082. Контроль 2 представляет собой антитело к человеческому рецептору активина типа II (анти-ActR2B mAb), раскрытое как MOR8159 в заявке на патент США № 2012/0237521 A1. Контроль 3 представляет собой мышинное моноклональное антитело к активину А от R&D Systems, Миннеаполис, Миннесота (номер по каталогу MAB3381). Контроль 4 представляет собой слитую молекулу рецептора активина типа IIb-Fc (растворимый внеклеточный домен рецептора активина RIIb, полученный с С-концевым слитым белком Fc человеческого IgG1 (E23-P133 из NP_001097, за которым следует линкер Gly-Ser, а за ним - С-концевое слияние Fc IgG1 человека), последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 227.

Пример 3. Связывание антител с человеческим активином А, определяемое с помощью поверхностного плазмонного резонанса.

Аффинности связывания и кинетические константы связывания антигена с выбранными очищенными моноклональными антителами к активину А человека определяли с использованием биосенсорного анализа поверхностного плазмонного резонанса в режиме реального времени (Biacore T200 или Biacore 4000, GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ) при 25 и 37°C. Антитела, экспрессированные в виде либо Fc мыши (префикс H2aM), либо Fc человека (префикс H4H), захватывали на своих соответствующих сенсорных поверхностях к Fc (формат захвата моноклональных антител). Антитела к активину А захватывали на поверхности либо козьих поликлональных антител к IgG мыши (GE Healthcare, #BR-1008-38), либо мышинных моноклональных антител к IgG человека (GE Healthcare, #BR-1008-39), созданной путем прямого аминного соединения с сенсорным чипом Biacore CM5. Кинетические эксперименты проводили с использованием либо HBS-EP (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM ЭДТА, 0,05% поверхностно-активное вещество P20, при pH 7,4), либо PBS-P (10 mM фосфат натрия, 2,7 mM KCl, 137 mM NaCl, 0,02% NaN₃, 0,05% поверхностно-активное вещество P20, pH 7,4) в качестве как рабочего буфера, так и буфера образца. Скорости ассоциации антиген-антитело измеряли путем введения различных концентраций (4-кратные разведения в пределах от 50 до 0,2 нМ) либо активина А (R&D Systems, # 338-AC-050/CF), активина В (R&D Systems, # 659-AB-025/CF), активина АВ (R&D Systems, # 1006-AB-005), активина АС (R&D Systems, # 4879-AC/CF), или ингибина Е (Novus Biologicals, #H00083729-P01) на поверхность захвата антител. Ассоциацию антитело-антиген контролировали в течение 240 с, пока диссоциация в буфере не наблюдалась в течение 600 с. Константы кинетических скоростей ассоциации и диссоциации определяли путем обработки и подгонки данных с использованием программного обеспечения Scrubber версии 2.0с. Равновесные константы диссоциации связывания (KD) и диссоциативное время полураспада ($t^{1/2}$) затем рассчитывали из кинетических констант скоростей как: $K_D (M) = k_d/k_a$ и $t^{1/2} (мин) = [\ln 2 / (60 * k_d)]$. Кинетические параметры связывания для различных моноклональных антител к активину А показаны в табл. 3-10 (NB=не наблюдается связывание в используемых условиях; NT=не исследовали).

Таблица 3. Характеристики связывания антител к активину А с активинном А при температуре 25°C

Антитело	Кол-во захваченных моноклон. антител (RU $\pm$ SE)	Активин А-20 нМ (RU)	k_a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_d (с ⁻¹)	K_D (молярн.)	$t_{1/2}$ (мин)
H4H10423P	86,2 $\pm$ 0,7	19,4	3,33E+06	1,09E-04	3,26E-11	106,4
H4H10424P	337	82	3,14E+06	7,19E-04	2,29E-10	16
H4H10426P	81	23	1,18E+07	7,00E-04	5,95E-11	16
H4H10429P	115,2 $\pm$ 1	24,9	7,82E+06	6,39E-05	8,17E-12	180,8
H4H10430P	90,3 $\pm$ 4,2	19,4	4,75E+07	1,67E-04	3,52E-12	69
H4H10432P2	109,6 $\pm$ 1,2	20,7	1,57E+07	<i>5,00E-05</i>	$\leq 3,18E-12$	≥ 231
H4H10433P2	102	16	1,42E+07	5,77E-04	4,06E-11	20
H4H10436P2	113,6 $\pm$ 0,6	23,2	8,85E+06	1,68E-04	1,90E-11	68,7
H4H10437P2	167	30	1,58E+07	2,13E-03	1,34E-10	5
H4H10438P2	124	25	1,20E+07	5,88E-04	4,92E-11	20
H4H10440P2	79,2 $\pm$ 0,7	12,9	3,76E+06	9,28E-05	2,47E-11	124,5
H4H10442P2	139,3 $\pm$ 1	31,3	1,10E+07	<i>5,00E-05</i>	$\leq 4,55E-12$	≥ 231
H4H10445P2	149	43	2,40E+06	<i>5,00E-05</i>	$\leq 2,08E-11$	≥ 231
H4H10446P2	104,6 $\pm$ 0,7	24,1	1,29E+07	<i>5,00E-05</i>	$\leq 3,88E-12$	≥ 231
H4H10447P2	164	43	2,36E+06	<i>5,00E-05</i>	$\leq 2,12E-11$	≥ 231
H4H10448P2	244	64	4,76E+06	<i>5,00E-05</i>	$\leq 1,05E-11$	≥ 231
H4H10452P2	191	55	4,69E+06	<i>5,00E-05</i>	$\leq 1,07E-11$	≥ 231
H4H10468P2	93 $\pm$ 0,1	21,7	7,86E+06	<i>5,00E-05</i>	$\leq 6,36E-12$	≥ 231
H2aM10965N	393	76	1,48E+06	1,10E-03	7,45E-10	10
Контроль 1	84,7 $\pm$ 0,3	15,9	7,26E+06	9,92E-05	1,37E-11	116,4

Для значений K_D , которые выделены курсивом, не наблюдалась диссоциация анализата при этих экспериментальных условиях и, следовательно, значение k_d было зафиксировано на $5,0E-05$ с⁻¹

Таблица 4. Характеристики связывания антител к активину А с активинном А при 37°C

Антитело	Кол-во захваченных моноклон. антител (RU $\pm$ SE)	Активин А-20 нМ (RU)	k_a (M ⁻¹ c ⁻¹)	k_d (c ⁻¹)	K_D (молярн.)	$t_{1/2}$ (мин)
H4H10423P	101 $\pm$ 1,4	25,2	3,95E+06	5,00E-05	$\leq 1,26E-11$	≥ 231
H4H10424P	231	58	4,59E+06	3,64E-03	7,94E-10	3
H4H10426P	71	21	1,61E+07	1,98E-03	1,23E-10	6
H4H10429P	150,8 $\pm$ 5,3	31,4	1,33E+07	5,00E-05	$\leq 3,75E-12$	≥ 231
H4H10430P	109,3 $\pm$ 1,3	25,0	3,80E+07	1,51E-04	3,97E-12	76,5
H4H10432P2	141,8 $\pm$ 1,6	25,1	2,30E+07	5,00E-05	$\leq 2,18E-12$	≥ 231
H4H10433P2	85	12	2,00E+07	1,07E-03	5,37E-11	11
H4H10436P2	139,8 $\pm$ 1,4	29,4	1,49E+07	5,00E-05	$\leq 3,35E-12$	≥ 231
H4H10437P2	115	20	2,04E+07	4,68E-03	2,29E-10	2
H4H10438P2	99	18	1,87E+07	2,38E-03	1,27E-10	5
H4H10440P2	98,6 $\pm$ 1,1	15,3	6,37E+06	3,28E-04	5,15E-11	35,2
H4H10442P2	181 $\pm$ 2,5	40,5	1,44E+07	5,00E-05	$\leq 3,48E-12$	≥ 231
H4H10445P2	120	36	4,33E+06	5,00E-05	$\leq 1,15E-11$	≥ 231
H4H10446P2	137,2 $\pm$ 1,7	31,5	1,54E+07	5,00E-05	$\leq 3,25E-12$	≥ 231
H4H10447P2	126	36	4,69E+06	5,00E-05	$\leq 1,07E-11$	≥ 231
H4H10448P2	175	49	7,86E+06	5,00E-05	$\leq 6,36E-12$	≥ 231
H4H10452P2	146	43	7,94E+06	5,00E-05	$\leq 6,30E-12$	≥ 231
H4H10468P2	98,7 $\pm$ 0,7	24,5	1,22E+07	5,00E-05	$\leq 4,10E-12$	≥ 231
H2aM10965N	435	80	2,35E+06	4,15E-03	1,77E-09	3
Контроль 1	93,9 $\pm$ 0,7	18,0	8,99E+06	5,00E-05	$\leq 5,56E-12$	≥ 231

Для значений K_D , которые выделены курсивом, не наблюдалась диссоциация анализата при этих экспериментальных условиях и, следовательно, значение k_d было зафиксировано на 5,0E-05 c⁻¹

Таблица 5. Характеристики связывания антител к активину А с активинном В при температуре 25°C

Антитело	Кол-во захваченных моноклон. антител (RU $\pm$ SE)	50 нМ связан. активина (RU)	k_a (M ⁻¹ c ⁻¹)	k_d (c ⁻¹)	K_D (молярн.)	$t_{1/2}$ (мин)
H4H10423P	83,1 $\pm$ 0,6	4,7	4,89E+05	3,02E-02	6,18E-08	0,4
H4H10429P	112,3 $\pm$ 0,7	26,4	3,49E+06	1,31E-02	3,75E-09	0,9
H4H10432P2	104,4 $\pm$ 1,8	5,1	NB	NB	NB	NB
H4H10436P2	110,8 $\pm$ 3,9	32,8	9,52E+06	5,28E-04	5,54E-11	21,9
H4H10440P2	75,7 $\pm$ 0,8	18,8	1,06E+06	1,16E-03	1,09E-09	10,0
H4H10442P2	136 $\pm$ 0,7	3,4	NB	NB	NB	NB
H4H10430P	88 $\pm$ 0,5	3,9	NB	NB	NB	NB
H4H10446P2	101,5 $\pm$ 0,4	3,6	NB	NB	NB	NB
H4H10468P2	92,5 $\pm$ 0,2	6,2	NB	NB	NB	NB
Контроль 1	84,1 $\pm$ 0,3	6,4	NB	NB	NB	NB

Таблица 6. Характеристики связывания антител к активину А с активинном В при температуре 37°C

Антитело	Кол-во захваченных моноклон. антител (RU $\pm$ SE)	50 нМ связан. активина (RU)	k_a (M ⁻¹ c ⁻¹)	k_d (c ⁻¹)	K_D (молярн.)	$t_{1/2}$ (мин)
H4H10423P	96 $\pm$ 1,2	4,4	NB	NB	NB	NB
H4H10429P	142,8 $\pm$ 1,3	25,3	3,43E+06	3,43E-02	9,98E-09	0,3
H4H10432P2	134,1 $\pm$ 1,7	5,1	NB	NB	NB	NB
H4H10436P2	132 $\pm$ 1,4	38,1	9,78E+06	1,36E-03	1,39E-10	8,5
H4H10440P2	94 $\pm$ 4,5	20,9	1,28E+06	4,19E-03	3,29E-09	2,8
H4H10442P2	173,1 $\pm$ 1,4	4,4	NB	NB	NB	NB
H4H10430P	105,8 $\pm$ 1,3	3,6	NB	NB	NB	NB
H4H10446P2	131,4 $\pm$ 1,2	3,8	NB	NB	NB	NB
H4H10468P2	95,5 $\pm$ 1	3,4	NB	NB	NB	NB
Контроль 1	90,2 $\pm$ 0,9	2,7	NB	NB	NB	NB

Таблица 7. Характеристики связывания антител к активину А с активинном АВ при температуре 25°C

Антитело	Кол-во захваченных моноклон. антител (RU $\pm$ SE)	50 нМ связан. активина (RU)	k_a (M ⁻¹ c ⁻¹)	k_d (c ⁻¹)	K_D (молярн.)	$t_{1/2}$ (мин)
H4H10423P	81,3 $\pm$ 0,5	14,7	6,13E+05	2,03E-02	3,31E-08	0,6
H4H10429P	110,7 $\pm$ 0,5	40,0	4,53E+06	1,03E-04	2,28E-11	111,7
H4H10432P2	101,2 $\pm$ 1,6	38,3	4,00E+06	2,27E-03	5,68E-10	5,1
H4H10436P2	107,5 $\pm$ 0,3	28,2	7,66E+06	2,61E-04	3,41E-11	44,2
H4H10440P2	73,7 $\pm$ 0,4	15,5	2,97E+06	5,26E-04	1,77E-10	22,0
H4H10442P2	133,3 $\pm$ 0,6	34,6	5,53E+06	1,77E-03	3,20E-10	6,5
H4H10430P	86,9 $\pm$ 0,5	33,0	1,17E+07	2,17E-04	1,85E-11	53,3
H4H10446P2	99,8 $\pm$ 0,4	31,9	4,99E+06	4,06E-03	8,15E-10	2,8
H4H10468P2	92,1 $\pm$ 0,2	34,7	3,76E+06	2,09E-03	5,56E-10	5,5
Контроль 1	83,5 $\pm$ 0,6	31,1	3,44E+06	2,83E-04	8,22E-11	40,9

Таблица 8. Характеристики связывания антител к активину А с активинном АВ при температуре 37°C

Антитело	Кол-во захваченных моноклон. антител (RU $\pm$ SE)	50 нМ связан. активина (RU)	k_a (M ⁻¹ c ⁻¹)	k_d (c ⁻¹)	K_D (молярн.)	$t_{1/2}$ (мин)
H4H10423P	90,8 $\pm$ 1,2	21,7	8,80E+05	2,13E-02	2,42E-08	0,5
H4H10429P	137,7 $\pm$ 1,2	50,0	6,47E+06	4,88E-04	7,55E-11	23,6
H4H10432P2	127,7 $\pm$ 1,3	44,4	5,40E+06	5,92E-03	1,10E-09	2,0
H4H10436P2	126,8 $\pm$ 0,8	33,9	1,03E+07	4,58E-04	4,43E-11	25,2
H4H10440P2	88,9 $\pm$ 1,7	17,7	5,20E+06	1,63E-03	3,14E-10	7,1
H4H10442P2	166,5 $\pm$ 1,7	45,9	9,17E+06	4,25E-03	4,64E-10	2,7
H4H10430P	101,6 $\pm$ 1,2	41,0	1,01E+07	5,41E-04	5,35E-11	21,3
H4H10446P2	126,6 $\pm$ 1,2	41,5	6,08E+06	8,17E-03	1,34E-09	1,4
H4H10468P2	92,2 $\pm$ 0,8	34,5	5,03E+06	4,43E-03	8,80E-10	2,6
Контроль 1	86,4 $\pm$ 0,6	29,3	3,77E+06	7,38E-04	1,96E-10	15,7

Таблица 9. Характеристики связывания антител к активину А с активинном АС при температуре 25°C

Антитело	Кол-во захваченных моноклон. антител (RU $\pm$ SE)	50 нМ связан. активина (RU)	k_a (M ⁻¹ c ⁻¹)	k_d (c ⁻¹)	K_D (молярн.)	$t_{1/2}$ (мин)
H4N10423P	79,9 $\pm$ 0,4	-0,8	NB	NB	NB	NB
H4N10429P	108,9 $\pm$ 0,5	28,0	9,13E+05	9,10E-05	9,97E-11	126,9
H4N10432P2	101,6 $\pm$ 0,7	34,9	6,29E+05	1,87E-03	2,98E-09	6,2
H4N10436P2	106,7 $\pm$ 0,4	30,1	6,98E+05	1,56E-03	2,24E-09	7,4
H4N10440P2	73,5 $\pm$ 0,4	11,8	5,13E+05	2,27E-04	4,42E-10	50,8
H4N10442P2	132,5 $\pm$ 3,1	18,6	1,31E+06	2,05E-03	1,57E-09	5,6
H4N10430P	85,1 $\pm$ 0,3	23,6	1,23E+06	1,09E-02	8,86E-09	1,1
H4N10446P2	96,9 $\pm$ 0,5	12,6	1,04E+06	1,22E-02	1,18E-08	0,9
H4N10468P2	91,4 $\pm$ 0,3	17,2	7,98E+05	5,92E-03	7,41E-09	2,0
Контроль 1	82,5 $\pm$ 0,3	22,3	5,58E+05	2,25E-03	4,03E-09	5,1

Таблица 10. Характеристики связывания антител к активину А с активинном АС при температуре 37°C

Антитело	Кол-во захваченных моноклон. антител (RU $\pm$ SE)	50 нМ связан. активина (RU)	k_a (M ⁻¹ c ⁻¹)	k_d (c ⁻¹)	K_D (молярн.)	$t_{1/2}$ (мин)
H4N10423P	85,9 $\pm$ 1,1	0,0	NB	NB	NB	NB
H4N10429P	132,6 $\pm$ 1,2	35,7	1,34E+06	6,20E-04	4,62E-10	18,6
H4N10432P2	123,8 $\pm$ 1,4	34,6	7,22E+05	9,02E-03	1,25E-08	1,3
H4N10436P2	122,9 $\pm$ 1,3	32,6	8,81E+05	3,31E-03	3,75E-09	3,5
H4N10440P2	86,6 $\pm$ 2,7	13,3	7,18E+05	7,55E-04	1,05E-09	15,3
H4N10442P2	160,1 $\pm$ 1,5	21,4	1,46E+06	5,99E-03	4,10E-09	1,9
H4N10430P	96,8 $\pm$ 1	25,3	1,20E+06	2,00E-02	1,67E-08	0,6
H4N10446P2	120,3 $\pm$ 1	14,4	9,59E+05	2,16E-02	2,25E-08	0,5
H4N10468P2	88,4 $\pm$ 0,8	10,7	7,19E+05	1,24E-02	1,73E-08	0,9
Контроль 1	83,2 $\pm$ 0,9	15,6	6,51E+05	6,52E-03	1,00E-08	1,8

Как показано в табл. 3 и 4, антитела к активину А согласно настоящему изобретению связывались с активинном А со значениями K_D в диапазоне от менее чем 3,18 пМ (т.е. $\leq 3,18E-12$) до 745 пМ (т.е. 7,45E-10) при температуре 25°C и со значениями K_D в диапазоне от менее чем 2,18 пМ (т.е. $\leq 2,18E-12$) до 1,77 нМ (1,77E-09) при 37°C. Как показано в табл. 5 и 6, несколько антител к активину А (т.е. H4N10432P2, H4N10442P2, H4N10430P2, H4N10446P2 и H4N10468P2) не показали измеримое связывание с активинном В при температуре 25 или 37°C. Некоторые из антител продемонстрировали измеримое связывание с активинном АВ со значениями K_D в диапазоне от приблизительно 18,5 пМ (т.е. 1,85E-11) до 33,1 нМ (т.е. 3,31E-08) при температуре 25°C (табл. 7) и приблизительно от 44,3 пМ (т.е. 4,43E-11) до 24,2 нМ (т.е. 2,42E-08) при 37°C (табл. 8). Некоторые из антител продемонстрировали измеримое связывание с активинном АС со значениями K_D в диапазоне от приблизительно 99,7 пМ (т.е. 9,97E-11) до 11,8 нМ (т.е. 1,18E-08) при температуре 25°C (табл. 9) и приблизительно от 462 пМ (т.е. 4,62E-10) до 22,5 нМ (т.е. 2,25E-08) при 37°C (табл. 10). Кроме того, ни одно из исследуемых антител к активину А согласно настоящему изобретению не продемонстрировало измеримое связывание с ингибином Е (данные не показаны).

Пример 4. Связывание антител с представителями семейства TGF-бета, определяемое с помощью поверхностного плазменного резонанса.

Моноклональные антитела к активину А исследовали на степень перекрестной реактивности связывания к панели представителей семейства TGF-бета. Для эксперимента связывания использовали прибор

Biacore 4000. Антитела H4N10429P, H4N10430P, H4N10436P2, H4N10442P2, H4N10446P2; контроль 4 (ActR2B, растворимый экто доменный белок, полученный с С-концевым тегом Fc IgG1 человека (ActR2B-hFc; SEQ ID NO: 227)) и изотипическое контрольное антитело захватывали на биосенсорном чипе CM4Biacore, который сначала дериватизировали аминным сочетанием с моноклональным мышинным антителом к человеческому Fc (GE, № в каталоге BR-1008-39). Все исследования связывания Biacore проводили в рабочем буфере HBS-T (0,01 М HEPES pH 7,4, 0,5 М NaCl, 3 мМ ЭДТА, 0,5 мг/мл бычьего сывороточного альбумина, 0,05% в объемном отношении поверхностно-активное вещество P20). Лиганды представителей семейства человеческих TGF-бета приобретали в R&D Systems (активин А, # 338-AC; активин В, # 659-AB; активин АВ, # 1066-AB; активин АС, # 4879-AC; BMP2, # 355-BM; hBMP4, # 314-BP; hBMP6, # 507-BP; hBMP7, # 354-BP; hBMP9, # 3209-BP; hBMP10, # 2926-BP; hGDF8, # 788-G8; hGDF11, # 1958 GD). Все измерения связывания проводили при 37°C. Уровни захвата, варьировавшие начиная от 60 до 200 единиц ответа (RU), получали для каждого из антител или растворимого рецептора. На захватывающую поверхность с антителами вводили лиганды семейства TGF-бета в концентрациях, варьировавших в диапазоне от 3,1 нМ до 200 нМ. Полученные значения для объемов анализа 200 нМ приведены в табл. 11.

Таблица 11. Связывание моноклональных антител к активину А с лигандами семейства EGF-Р человека при 37°C

Исследуемые лиганды семейства TGF-бета	Реакция связывания (резонансные единицы) для 200 нМ лиганда семейства TGF-бета, вводимого на захватывающую сенсорную поверхность с антителами							
	H4N10429P	H4N10430P	H4N10436P2	H4N10442P2	H4N10446P2	H4N8925C	Контроль 4 (ActR2B-hFc) (положительный контроль)	Изотипическое контрольное моноклональное
Активин А	56,8	69,1	56,5	63,9	53,2	67,6	70,9	-0,1
Активин В	51,5	0,4	60,1	-1,8	2,6	0,3	68,0	1,9
Активин АВ	76,5	95,0	54,3	65,2	66,7	102,0	59,5	-0,1
Активин АС	43,1	34,8	55,6	14,2	15,2	32,5	59,4	-0,1
hBMP2	3,6	-1,7	14,9	-2,3	3,3	-4,0	36,9	-1,0
hBMP4	1,1	-0,6	19,3	-0,7	0,8	-0,5	26,4	0,4
hBMP6	4,6	5,7	4,0	1,1	5,3	4,8	86,3	5,1
hBMP7	9,2	6,4	13,6	1,5	5,7	4,5	64,2	4,3
hBMP9	33,4	-0,6	11,7	0,0	-0,3	-0,1	32,3	-1,0
hBMP10	32,4	0,3	22,5	-0,7	0,5	0,0	34,2	0,3
GDF8	-0,4	-0,1	-0,5	0,5	0,7	-0,1	25,8	0,5
GDF11	1,6	3,0	0,0	1,0	1,8	3,3	24,2	3,0

Наблюдаемые реакции связывания захваченных антител к активину А с введенными лигандами семейства TGF-бета при 200 нМ можно сравнить с реакциями связывания отрицательного контрольного антитела (изотипического контрольного моноклонального антитела), которое обеспечивает меру неспецифического связывания на фоновом уровне, и с реакциями связывания ActR2B-hFc, которое, как наблюдалось, связывается со всей панелью исследуемых представителей семейства TGF-бета и поэтому служит в качестве положительного контрольного лиганд-связывающего белка (табл. 11). Из этого сравнения было обнаружено, что некоторые из антител (например, H4N10430, H4N10442, H4N20446) связывались с активинном А, активинном АВ, активинном АС, но не существенно с активинном В или лигандами BMP или GDF. Было также обнаружено, что некоторые из антител связывались с более широкой перекрестной реактивностью с дополнительными лигандами семейства TGF-бета. Например, H4N10429P связывалось в значительной мере с активинном А, активинном В, активинном АВ, активинном АС, а также BMP9 и BMP10. H4N10436P2 показало заметное связывание с активинном А, активинном В, активинном АВ, активинном АС, BMP2, BMP4, BMP7, BMP9 и BMP 10. Из этих данных было показано, что антитела с

различными специфичностями связывания с лигандами семейства TGF-бета могут быть получены после иммунизации мышей лигандом активина А.

Пример 5. Перекрестный конкурентный анализ антител к активину А.

Перекрестный конкурентный анализ проводили, чтобы оценить способность панели из 9 антител (Н4Н10446Р2, Н4Н10468Р2, Н4Н10442Р2, Н4Н10423Р, Н4Н10430Р, Н4Н10429Р, Н4Н10432Р2, Н4Н10436Р2 и Н4Н10440Р2) конкурировать друг с другом за связывание с человеческим активином А. Два изотипических контрольных антитела и два контрольных антитела к активину А, контроль 1 (человеческое антитело к активину А с последовательностями варьируемых доменов тяжелой и легкой цепи "А1", как указано в патенте США № 8309082) и контроль 3 (МAB3381, доступный от R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN) также включили в анализы. Все анализы проводили при 25°C со скоростью встряхивания микротитрационного планшета 1000 об/мин в буфере Octet HBST (0,01 М HEPES pH 7,4, 0,15 М NaCl, 3 мМ ЭДТА, 0,05% в объемном отношении поверхностно-активное вещество Р20, 0,1 мг/мл БСА) в соответствии с инструкциями изготовителя (ForteBio Corp., Менло-Парк, Калифорния). Кратко, количество антитела к активину А, дающего реакцию связывания приблизительно 1,8 нм, захватывали на покрытых антителами к Fc человека сенсорных наконечниках Octet (ForteBio, # 18-0015) путем погружения наконечников на 5 мин в растворы с концентрацией 10 мкг/мл каждого антитела к активину А. Все остальные сайты связывания к hFc на наконечниках блокировали путем инкубации наконечников в растворе с концентрацией 50 мкг/мл несущественных антител в течение 5 мин. Сенсорные наконечники затем погружали в лунки, содержащие раствор 50 нМ активина А (R&D Systems, # 338-AC/CF), предварительно связанного с 1 мкМ второго антитела к активину А. Связывание второго раствора антитела к активину А/активина А с покрытым антителом к активину А сенсорным наконечником наблюдали в течение 5 мин при 1000 об/мин. Реакцию комплекса моноклональное антитело/активин А, связывающегося с покрытым антителом к активину А сенсорным наконечником, сравнивали и определяли конкурентоспособное/неконкурентоспособное поведение различных моноклональных антител к активину А. Результаты представлены на фиг. 1.

На фиг. 1 реакции конкурентного связывания приведены в черном или светло-сером цвете и указывают на то, что соответствующие пары антител конкурируют друг с другом за связывание с активином А. Светло-серые ячейки с черным шрифтом представляют собой реакцию связывания для самостоятельной конкуренции между теми же антителами. Черные ячейки с белым шрифтом представляют собой антитела, которые конкурируют за связывание с активином А в обоих направлениях, независимо от порядка связывания. Темно-серые ячейки с черным шрифтом представляют собой показания для изотипических контрольных (т.е. не связывающихся) антител, что указывает на отсутствие связывания изотипических контрольных антител с комплексами антитело к активину А-активин А (когда изотипические контрольные антитела связаны с сенсорным наконечником Octet) или отсутствие связывания изотипических контрольных антител с активином А (когда изотипические контрольные антитела используют в качестве второго антитела в лунках с активином А). Белые ячейки с черным шрифтом представляют собой отсутствие конкуренции между антителами, что указывает на то, что антитела содержат различные связывающие эпитопы на активине А.

Четыре антитела, Н4Н10446Р2, Н4Н10468Р2, Н4Н10442Р2 и Н4Н10423Р, двунаправленно конкурируют друг с другом за связывание с активином А. Кроме того, эти четыре антитела не конкурируют с контролем 1 или контролем 3 за связывание. Три из этих четырех антител к активину А, Н4Н10446Р2, Н4Н10468Р2 и Н4Н10442Р2, перекрестно не конкурируют с любыми другими антителами к активину А. Одно из четырех антител (Н4Н10423Р) также двунаправленно конкурирует с Н4Н10430Р за связывание с активином А. Пять антител, Н4Н10430Р, Н4Н10429, Н4Н10432Р2, Н4Н10436Р2 и Н4Н10440Р2, двунаправленно конкурируют друг с другом за связывание с активином А, а также с контролем 1 и контролем 3. Четыре из этих пяти антител (т.е. Н4Н10429, Н4Н10432Р2, Н4Н10436Р2 и Н4Н10440Р2) перекрестно не конкурируют с любыми другими антителами к активину А, в то время как Н4Н10423Р также перекрестно конкурирует с Н4Н10430Р, как отмечалось выше.

Результаты этого примера показывают, что антитела к активину А согласно настоящему изобретению могут быть сгруппированы в два различных "контейнера" на основе характеристик эпитопов связывания: контейнер 1 содержит Н4Н10423Р, Н4Н10446Р2, Н4Н10468Р2 и Н4Н10442Р2. Контейнер 2 содержит Н4Н10429, Н4Н10430Р, Н4Н10432Р2, Н4Н10436Р2 и Н4Н10440Р2. Кроме того, одно антитело из каждого контейнера, т.е. Н4Н10423Р и Н4Н10430Р, перекрестно конкурирует друг с другом.

Результаты этого примера показывают, что антитела контейнера 1 связываются с различными областями на активине А, в отличие от антител контейнера 2.

Пример 6. Ингибирование опосредованной активином А активации рецептора и передачи сигналов комплексом SMAD с антителами к активину А.

Для дополнительной характеристики антител к активину А настоящего изобретения разработали биоанализ для обнаружения активации рецепторов активина типа IIA и IIB (ActRIIA и ActRIIB, соответственно) и последующего фосфорилирования и активации рецептора активина типа I. Взаимодействие между ActRIIA и ActRIIB и активином приводит к индукции различных клеточных процессов, включающих в себя регулирование роста, метастазов злокачественных клеток и дифференциации эмбрио-

нальных стволовых клеток (Tsuchida, K. et al., Cell Commun Signal 7:15 (2009)). Фосфорилирование и активация рецептора типа I ведет к фосфорилированию белков SMAD 2 и 3, которые образуют активированные комплексы SMAD, приводящие к регуляции транскрипции генов.

Для обнаружения активации пути сигнальной трансдукции комплекса SMAD через связывание активина с рецепторами активина типа II клеточную линию рабдомиосаркомы человека A204 (ATCC, # HTB-82) трансфицировали с репортерной плазмидой Smad 2/3-люцифераза (CAGA $\times$ 12-Luc; Dennler, 1998), чтобы создать клеточную линию A204/CAGA $\times$ 12-Luc. Клетки A204/CAGA $\times$ 12-Luc поддерживали в 5A Маккоя (Irvine Scientific, # 9090), дополненной 10% фетальной бычьей сывороткой (FBS), пенициллин/стрептомицин/глутамином и 250 мкг/мл G418. Для биологического анализа клетки A204/CAGA $\times$ 12-Luc высевали в 96-луночные планшеты для анализа в количестве 10000 клеток/луночку в среде с низким содержанием сыворотки, 0,5% FBS и OPTIMEM (Invitrogen, # 31985-070) и инкубировали при 37°C и 5% CO₂ в течение ночи. Чтобы определить дозовый ответ лиганда, активин А (R&D Systems, #338-AC), активин В (R&D Systems, #659-AB), активин АВ (R&D Systems, #1066-AB) и активин АС (R&D Systems, #4879-AC/CF) серийно разводили в соотношении 1:3 от 100 до 0,002 нМ и добавляли к клеткам, начиная с контроля, не содержащего активин. Наблюдали, что активин А, активин В, активин АВ и активин АС активировали клеточную линию A204/CAGA $\times$ 12-Luc со значениями EC₅₀ 99 пМ, 47 пМ, 19 пМ и 4,4 нМ соответственно. Для измерения ингибирования антитела серийно разводили 1:3 от 100 до 0,002 нМ, от 1000 до 0,02 нМ или от 300 до 0,005 нМ, включая в себя контрольные образцы, содержащие либо соответствующее изотипическое контрольное антитело, либо не содержащие антитела, и добавляли к клеткам с постоянной концентрацией 100 пМ активина А, 50 пМ активина В, 30 пМ активина АВ или 4 нМ активина АС. Также в этом анализе в качестве положительного блокирующего контроля использовали контроль 4 (ActRIIB-HFC; SEQ ID No: 227). Через 5,5 ч инкубации при 37°C и 5% CO₂ добавляли субстрат OneGlo (Promega, # E6051) и затем определяли активность люциферазы с использованием прибора Victor X (Perkin Elmer). Полученные результаты анализировали с использованием нелинейной регрессии (4-параметровая логистика) с программным обеспечением Prism 5 (GraphPad).

Как показано в табл. 12, антитела к активину А согласно настоящему изобретению блокировали 100 пМ активина А со значениями IC₅₀ от 39 пМ до 3,5 нМ, в то время, как контроль 1 блокировал с IC₅₀, равной 83 пМ. Подмножество антител к активину А согласно настоящему изобретению исследовали на блокирование активина В, АВ и АС. Четыре из 9 исследованных антител блокировали 50 пМ активина В со значениями IC₅₀, варьирующими в диапазоне от 130 пМ до 100 нМ. Пять антител согласно настоящему изобретению, которые исследовали на возможность блокады активина В, блокировали только при высоких концентрациях антител, в то время как контроль 1 не показал какой-либо измеримой блокады активина В. Восемь исследованных антител согласно настоящему изобретению блокировали 30 пМ активина АВ со значениями IC₅₀, варьирующими в диапазоне от 100 пМ до 8,2 нМ, в то время как контроль 4 блокировал с IC₅₀, равной 540 пМ. Только одно антитело, H4N10423P, продемонстрировало слабую блокаду активина АВ. Семь из 8 исследованных антител блокировали 4 нМ активина АС со значениями IC₅₀, варьирующими в диапазоне от 580 пМ до 6,5 нМ, в то время как контроль 4 блокировал со значением IC₅₀ 1,1 нМ. Одно антитело, H4N10423P, не демонстрировало какой-либо блокады активина АС. Как мышиный IgG (изотипический контроль mIgG), так и человеческий IgG (изотипический контроль hIgG) отрицательные контроли не блокировали активацию лиганда рецепторов.

Таблица 12. Ингибирование активина А, активина В, активина АВ и активина АС с помощью антител к активину А (IC₅₀ [М])

Константа:	Активин А	Активин В	Активин АВ	Активин АС
Антитело				
H4N10423P	2,0E-10		Слабое блокирование	Слабое блокирование
H4N10424P	7,6E-10			
H4N10426P	2,3E-10			

H4N10429P	1,6E-10	7,9E-08	2,9E-10	5,8E-10
H4N10430P	6,1E-11	Блокирование в высокой концентрации	1,0E-10	9,3E-10
H4N10432P2	1,1E-10	Блокирование в высокой концентрации	8,0E-10	2,8E-09
H4N10433P2	1,5E-10	1,0E-07		
H4N10436P2	2,0E-10	1,3E-10	1,4E-10	1,3E-09
H4N10437P2	2,9E-10	Блокирование в высокой концентрации		
H4N10438P2	2,6E-10			
H4N10440P2	2,8E-10	5,2E-09	4,3E-10	7,5E-10
H4N10442P2	5,6E-11		2,2E-09	6,5E-09
H4N10445P2	5,3E-11			
H4N10446P2	4,7E-11	Блокирование в высокой концентрации	8,2E-09	5,6E-09
H4N10447P2	7,8E-11			
H4N10448P2	4,6E-11			
H4N10452P2	5,8E-11			
H4N10468P2	3,9E-11	Блокирование в высокой концентрации	2,3E-09	3,4E-09
H2aM10965N	3,5E-09			
Изотипич. контроль mIgG	Отсутствие блокир-я			
Изотипич. контроль hIgG	Отсутствие блокир-я	Отсутствие блокир-я	Отсутствие блокир-я	Отсутствие блокир-я
Контроль 1	8,3E-11	Отсутствие блокир-я	5,4E-10	1,1E-09

Биологический анализ с использованием клеток A204/CAGA×12-Luc также можно стимулировать с помощью GDF8 (R&D Systems, Cat # 788-G8/CF) и GDF11 (R&D Systems, Cat # 1958-GD-010/CF). Для проверки функционального ингибирования этих лигандов антителами к активину А анализ проводили с использованием описанных выше условий, но с заменой GDF8 или GDF11 для активирующего лиганда, в результате чего значения EC_{50} составляли 188 пМ и 84 пМ соответственно. В этом анализе активация с помощью постоянной концентрации 0,50 нМ GDF8 или 0,40 нМ GDF11 полностью блокировалась контролем 4 со значениями IC_{50} 298 пМ и 214 пМ соответственно. Используя эти же постоянные концентрации лигандов, не наблюдалось ингибирование ни GDF8, ни GDF11 антителами к активину А, H4N10446P2 и H4N10430P, при исследовании до 100 нМ антител. В отдельный день антитела к активину А, H4N10429P и H4N10436P2, исследовали на ингибирование в этом анализе в присутствии постоянных концентраций 250 пМ GDF8 или 250 пМ GDF11, и никакого ингибирования не наблюдалось после инкубации клеток с концентрацией до 150 нМ исследуемых антител к активину А; только GDF8 и GDF11 в этом анализе проявляли значения EC_{50} 124 пМ и 166 пМ соответственно. Эти данные показывают, что антитела к активину А, H4N10446P2, H4N10430P, H4N10429P и H4N10436P2, не функционально ингибируют GDF8 или GDF11.

Пример 7. Стимулирование гипертрофии скелетных мышц с использованием антител к активину А.

Гипертрофию скелетных мышц, вызванную введением специфического к миостатину антагониста, антитела к GDF8 H4N1657N2 (смотрите патент США 2011-0293630 A1), или сочетания H4N1657N2 и различных антител к активину А, оценивали у мышей SCID CB17. Степень гипертрофии измеряли по отношению к воздействию соответствующим изотипическим контрольным антителом. Кроме того, в эти исследования было включено лечение внеклеточным доменом человеческого ActRIIB, полученного с С-концевым доменом Fc человеческого IgG1 (контроль 4, SEQ ID NO: 227). Ранее было показано, что контроль 4 индуцирует гипертрофии мышц *in vivo*, а также связывается и блокирует активность нескольких лигандов представителей семейства TGF-бета (Souza, TA et al. Mol Endocrinol 22:2689-702 (2008); Lee, SJ et al. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 102(50): 18117-22 (2005)).

В общей сложности исследовали восемь антител к активину А согласно настоящему изобретению и контроль 1 в сочетании с H4N1657N2 или в одиночку в восьми исследованиях, в сравнении с группами изотипического контроля, контроля 4, одного H4N1657N2 или контроля 2 (антитела к активину RIIb, содержащего VH/VL антитела MOR08159, описанного в патенте США 2010/0272734 A1). Для исследований самцов мышей CB17 SCID (Taconic, #CB17SC-M) приблизительно 10 недельного возраста делили в соответствии с массой тела на 6 групп по 5 мышей. Группы мышей обрабатывали в каждом исследовании, как описано в табл. 13.

Таблица 13. Антитела и контроль, изучаемые в исследованиях мышечной гипертрофии in vivo

Исслед. #	Исследуемые образцы	Дозировка 1	Интервалы дозирования дозировки 1	Дозировка 2	Интервалы дозирования дозировки 2
1	Изотипический контроль	10 мг/кг	дни 0, 3 и 7	8 мг/кг	день 14
	H4H1657N2	10 мг/кг	дни 0, 3 и 7	8 мг/кг	день 14
	Контроль 4	10 мг/кг	дни 0, 3 и 7	8 мг/кг	день 14
	H4H10423P+H4H1657N2	10 мг/кг+10 мг/кг	дни 0, 3 и 7	8 мг/кг+8 мг/кг	день 14
2	H4H10432P2+H4H1657N2	10 мг/кг+10 мг/кг	дни 0, 3 и 7	8 мг/кг+8 мг/кг	день 14
	H4H10442P2+H4H1657N2	10 мг/кг+10 мг/кг	дни 0, 3 и 7	8 мг/кг+8 мг/кг	день 14
	Изотипический контроль	10 мг/кг	дни 0, 3 и 7	8 мг/кг	день 14
	H4H1657N2	10 мг/кг	дни 0, 3 и 7	8 мг/кг	день 14
	Контроль 4	10 мг/кг	дни 0, 3 и 7	8 мг/кг	день 14
	H4H10429P+H4H1657N2	10 мг/кг+10 мг/кг	дни 0, 3 и 7	8 мг/кг+8 мг/кг	день 14
	H4H10436P2+H4H1657N2	10 мг/кг+10 мг/кг	дни 0, 3 и 7	8 мг/кг+8 мг/кг	день 14
3	H4H10440P2+H4H1657N2	10 мг/кг+10 мг/кг	дни 0, 3 и 7	8 мг/кг+8 мг/кг	день 14
	Изотипический контроль	10 мг/кг	дни 0, 3, 7 и 14	N/A	
	H4H1657N2	10 мг/кг	дни 0, 3, 7 и 14		
	Контроль 4	10 мг/кг	дни 0, 3, 7 и 14		
	H4H10446P2+H4H1657N2	10 мг/кг+10 мг/кг	дни 0, 3, 7 и 14		
	H4H10430P+H4H1657N2	10 мг/кг+10 мг/кг	дни 0, 3, 7 и 14		
4	Изотипический контроль	25 мг/кг	дни 0, 3, 7 и 14	N/A	
	H4H1657N2	10 мг/кг	дни 0, 3, 7 и 14		
	H4H10430P	10 мг/кг	дни 0, 3, 7 и 14		
	H4H10430P+H4H1657N2	2 мг/кг+10 мг/кг	дни 0, 3, 7 и 14		
	H4H10430P+H4H1657N2	10 мг/кг+10 мг/кг	дни 0, 3, 7 и 14		
	H4H10430P+H4H1657N2	25 мг/кг+10 мг/кг	дни 0, 3, 7 и 14		
5	Изотипический контроль	25 мг/кг	дни 0, 3, 7 и 14	N/A	
	H4H1657N2	10 мг/кг	дни 0, 3, 7 и 14		
	H4H10446P2	10 мг/кг	дни 0, 3, 7 и 14		
	H4H10446P2+H4H1657N2	2 мг/кг+10 мг/кг	дни 0, 3, 7 и 14		
	H4H10446P2+H4H1657N2	10 мг/кг+10 мг/кг	дни 0, 3, 7 и 14		
	H4H10446P2+H4H1657N2	25 мг/кг+10 мг/кг	дни 0, 3, 7 и 14		
6	Изотипический контроль	10 мг/кг	дни 0, 3, 7, 14 и 21	N/A	
	H4H1657N2	10 мг/кг	дни 0, 3, 7, 14 и 21		
	Контроль 4	10 мг/кг	дни 0, 3, 7, 14 и 21		
	Контроль 1	10 мг/кг	дни 0, 3, 7, 14 и 21		
	Контроль 1+H4H1657N2	10 мг/кг+10 мг/кг	дни 0, 3, 7, 14 и 21		
7	Изотипический контроль	10 мг/кг	дни 0, 3, 7 и 14	N/A	
	Контроль 4	10 мг/кг	дни 0, 3, 7 и 14		
	Контроль 2	25 мг/кг	дни 0, 3, 7 и 14		
	H4H10430P+H4H1657N2	10 мг/кг+10 мг/кг	дни 0, 3, 7 и 14		
	H4H10446P2+H4H1657N2	10 мг/кг+10 мг/кг	дни 0, 3, 7 и 14		
8	Изотипический контроль	25 мг/кг	дни 0, 3, 7 и 14	N/A	
	H4H1657N2	10 мг/кг	дни 0, 3, 7 и 14		
	Контроль 4	25 мг/кг	дни 0, 3, 7 и 14		
	Контроль 2	25 мг/кг	дни 0, 3, 7 и 14		
	H4H10423P+H4H1657N2	25 мг/кг+10 мг/кг	дни 0, 3, 7 и 14		
	H4H10430P+H4H1657N2	25 мг/кг+10 мг/кг	дни 0, 3, 7 и 14		

Для исследований 1-5, 7 и 8 антитела и контроль 4 вводили подкожно в дозе 10 мг/кг каждого белка дважды в течение первой недели эксперимента (день 0 и 3) и один раз в дозе 10 мг/кг каждого белка в течение второй недели (день 7). Окончательную дозу антитела или контроля 4 в течение третьей недели (день 14) вводили подкожно в дозе 8 мг в/кг для исследований #1 и #2 или 10 мг/кг для исследования #3-#8 (табл. 13). На 21 день мышей умерщвляли и измеряли общую массу тела каждой мыши. Для исследо-

вания 6 антитела вводили в течение того же времени, что и в предыдущих исследованиях 1-5, но воздействие продлили до 28 суток с дополнительной инъекцией в день 21. Переднюю большеберцовую (ТА) и икроножную (ГА) мышцы от каждой мыши иссекали и взвешивали. Массы тканей нормировали к исходной массе тела и рассчитывали процентное изменение средней массы по средней массе в группе обработки изотипическим контрольным антителом. Результаты, обобщенные в таблицах 14-21, выражены в виде среднего процентного увеличения по сравнению с изотипическим контролем $\pm$ стандартная ошибка среднего.

Таблица 14. Процентное изменение масс тела и мышц по сравнению с воздействием изотипическим контролем, исследование 1

	Изотипический контроль	H4H1657N2	Контроль 4	H4H10423P + H4H1657N2	H4H10432P2 + H4H1657N2	H4H10442P2 + H4H1657N2
Доза	10 мг/кг	10 мг/кг	10 мг/кг	10 мг/кг + 10 мг/кг	10 мг/кг + 10 мг/кг	10 мг/кг + 10 мг/кг
Масса тела	0,00 $\pm$ 0,91	10,99 $\pm$ 0,48	18,45 $\pm$ 0,89	13,36 $\pm$ 1,10	12,84 $\pm$ 0,98	12,09 $\pm$ 0,78
ТА мышца	0,00 $\pm$ 1,15	19,54 $\pm$ 2,67	45,80 $\pm$ 1,47	32,03 $\pm$ 2,12	24,83 $\pm$ 2,95	40,76 $\pm$ 2,59
ГА мышца	0,00 $\pm$ 0,89	26,46 $\pm$ 3,63	31,91 $\pm$ 1,40	27,58 $\pm$ 1,61	26,39 $\pm$ 1,87	30,62 $\pm$ 2,32

Как показано в табл. 14 в первом исследовании, контроль 4 индуцировал значительную гипертрофию во всех исследованных мышцах с увеличением мышечной массы ТА на 45,80 $\pm$ 1,47% и ГА на 31,91 $\pm$ 1,4% по сравнению с обработанными изотипическим контролем мышцами. Воздействие только H4H1657N2 также индуцировало гипертрофию ТА мышцы (увеличение 19,54 $\pm$ 2,67%) и ГА мышцы (увеличение 26,46 $\pm$ 3,63%), но оно было менее эффективным, чем воздействие контролем 4. Сочетание H4H1657N2 + H4H10442P2 индуцировало подобные увеличения средней массы мышц ТА (40,76 $\pm$ 2,59%) и ГА (30,62 $\pm$ 2,32%) по сравнению с мышцами, обработанными контролем 4. Комбинированные воздействия H4H1657N2/H4H10423P и H4H1657N2/H4H10432P2 не вызывали увеличений средней массы ТА так сильно, в отличие от индуцированного обработкой H4H1657N2/H4H10442P или контролем 4 увеличения.

Таблица 15. Процентное изменение массы тела и мышц по сравнению с воздействием изотипическим контролем, исследование 2

	Изотипический контроль	H4H1657N2	Контроль 4	H4H10423P + H4H1657N2	H4H10432P2 + H4H1657N2	H4H10442P2 + H4H1657N2
Доза	10 мг/кг	10 мг/кг	10 мг/кг	10 мг/кг + 10 мг/кг	10 мг/кг + 10 мг/кг	10 мг/кг + 10 мг/кг
Масса тела	0,00 $\pm$ 2,53	4,12 $\pm$ 2,19	11,22 $\pm$ 1,71	7,17 $\pm$ 1,57	7,89 $\pm$ 0,37	1,89 $\pm$ 1,39
ТА мышца	0,00 $\pm$ 3,59	16,70 $\pm$ 2,73	43,47 $\pm$ 2,37	34,14 $\pm$ 2,55	29,31 $\pm$ 1,59	14,55 $\pm$ 2,22
ГА мышца	0,00 $\pm$ 3,54	18,54 $\pm$ 3,48	29,24 $\pm$ 2,22	26,24 $\pm$ 3,11	26,55 $\pm$ 2,41	15,65 $\pm$ 2,66

Как показано в табл. 15, во втором исследовании контроль 4 индуцировал гипертрофию во всех исследованных мышцах с увеличением на 43,47 $\pm$ 2,37% средней мышечной массы ТА и на 29,24 $\pm$ 2,22% средней мышечной массы ГА, по сравнению с обработанными изотипическим контролем мышцами. В этом исследовании воздействие только H4H1657N2 также индуцировало увеличение средней массы мышц ТА и ГА (на 16,7 $\pm$ 2,73% и 18,54 $\pm$ 3,48%, соответственно) по сравнению с обработанными изотипическим контролем мышцами, но эти средние увеличения были меньше, чем таковые, наблюдаемые для обработанной контролем 4 группы. Комбинированные воздействия H4H1657N2/H4H10429P и H4H1657N2/H4H10436P2 индуцировали увеличение средней массы ТА (34,14 $\pm$ 2,55% и 29,31 $\pm$ 1,59% соответственно) и средней массы ГА (26,24 $\pm$ 3,11% и 26,55 $\pm$ 2,41% соответственно), которые находились между увеличениями, наблюдаемыми для одного H4H1657N2 или контроля 4. Сочетание H4H1657N2/H4H10440P2 не индуцировало увеличение средних масс ТА или ГА так сильно, как индукция двумя другими комбинациями в этом исследовании или обработка контролем 4.

Таблица 16. Процентное изменение массы тела и мышц по сравнению с воздействием изотипическим контролем, исследование 3

	Изотипический контроль	H4H1657N2	Контроль 4	H4H10446P2 + H4H1657N2	H4H10430P + H4H1657N2
--	------------------------	-----------	------------	------------------------	-----------------------

Доза	10 мг/кг	10 мг/кг	10 мг/кг	10 мг/кг + 10 мг/кг	10 мг/кг + 10 мг/кг
Масса тела	0,00 ± 2,00	1,43 ± 1,14	18,92 ± 3,53	10,90 ± 2,51	8,88 ± 1,58
ТА мышца	0,00 ± 2,13	14,19 ± 3,19	39,90 ± 3,58	40,01 ± 3,67	28,30 ± 3,27
GA мышца	0,00 ± 1,62	15,73 ± 0,58	34,01 ± 2,87	31,29 ± 2,60	21,55 ± 2,30

Как показано в табл. 16, в третьем исследовании контроль 4 индуцировал гипертрофию во всех исследованных мышцах с увеличением на 39,90±3,58% средней мышечной массы ТА и на 34,01±2,87% средней мышечной массы GA по сравнению с обработанными изотипическим контролем мышцами. Воздействие только H4N1657N2 также индуцировало увеличение средней мышечной массы ТА (14,19±3,19%) и GA (15,73±0,58%) по сравнению с обработанными изотипическим контролем мышцами, но эти средние увеличения были меньше, чем таковые, наблюдаемые для обработанной контролем 4 группы. Комбинированное воздействие H4N1657N2/H4N10446P2 индуцировало аналогичное увеличение средней мышечной массы ТА (40,01±3,67%) и GA (31,29±2,60%), как и для мышей, получавших контроль 4. Комбинированное воздействие H4N1657N2/H4N10430P индуцировало увеличение средней мышечной массы ТА (28,30±3,27%) и GA (21,55±2,30%), которое находилось между увеличениями, наблюдаемыми для одного H4N1657N2 и комбинированного воздействия H4N1657N2/H4N10446P2.

Таблица 17. Процентное изменение массы тела и мышц по сравнению с воздействием изотипическим контролем, исследование 4

	Изотипический контроль	H4N1657N2	H4N10430P	H4N10430P + H4N1657N2	H4N10430P + H4N1657N2	H4N10430P + H4N1657N2
Доза	25 мг/кг	10 мг/кг	10 мг/кг	2 мг/кг + 10мг/кг	10 мг/кг + 10 мг/кг	25мг/кг + 10 мг/кг
Масса тела	0,00 ± 0,57	9,89 ± 0,98	4,20 ± 1,00	14,53 ± 0,80	12,61 ± 1,81	13,78 ± 1,58
ТА мышца	0,00 ± 3,04	21,05 ± 2,64	7,83 ± 2,74	39,02 ± 3,55	40,20 ± 2,48	44,92 ± 5,70
GA мышца	0,00 ± 2,71	22,85 ± 2,28	8,86 ± 1,24	27,57 ± 1,26	22,46 ± 5,03	30,22 ± 2,97

Как показано в табл. 17, в четвертом исследовании H4N1657N2 индуцировал гипертрофию во всех исследованных мышцах с увеличением на 21,05±2,64% средней мышечной массы ТА и на 22,85±2,28% средней мышечной массы GA по сравнению с обработанными изотипическим контролем мышцами. В этом исследовании воздействие одного H4N10430P немного увеличивало массу мышц по сравнению с обработанными изотипическим контролем мышцами, но значения не были статистически значимыми. Комбинированное воздействие H4N1657N2 и H4N10430P в количестве 10 и 2 мг/кг соответственно индуцировало увеличение средней мышечной массы ТА (39,02±3,55%) и GA (27,57±1,26%), которое было больше в ТА мышцах, чем наблюдаемое при воздействии только H4N1657N2 или H4N10430P. Комбинированное воздействие H4N1657N2 и H4N10430P в количестве 10 и 10 мг/кг соответственно индуцировало увеличение средней мышечной массы ТА (40,20±2,48%) и GA (22,46±5,03%), которое было больше в ТА мышце, чем наблюдаемое при воздействии только H4N1657N2 или H4N10430P. Комбинированное воздействие H4N1657N2 и H4N10430P в количестве 10 и 25 мг/кг соответственно индуцировало увеличение средней мышечной массы ТА (44,92±5,70%) и GA (30,22±2,97%), которое было больше в ТА мышце, чем наблюдаемое при воздействии только H4N1657N2 или H4N10430P.

Таблица 18. Процентное изменение массы тела и мышц по сравнению с воздействием изотипическим контролем, исследование 5

	Изотипический контроль	H4N1657N2	H4N10446P2	H4N10446P2 + H4N1657N2	H4N10446P2 + H4N1657N2	H4N10446P2 + H4N1657N2
Доза	25 мг/кг	10 мг/кг	10 мг/кг	2 мг/кг + 10мг/кг	10 мг/кг + 10 мг/кг	25мг/кг + 10 мг/кг
Масса тела	0,00 ± 1,23	10,94 ± 1,03	0,29 ± 1,33	14,26 ± 1,45	12,61 ± 1,26	16,31 ± 2,04
ТА мышца	0,00 ± 2,20	25,40 ± 1,35	3,70 ± 1,67	51,29 ± 4,20	49,64 ± 4,08	49,79 ± 5,46
GA мышца	0,00 ± 2,92	22,82 ± 1,97	2,70 ± 1,06	39,24 ± 3,08	35,56 ± 3,39	35,14 ± 3,49

Как показано в табл. 18, в пятом исследовании H4N1657N2 индуцировал гипертрофию в исследо-

ванных мышцах с увеличением на $25,4 \pm 1,35\%$ средней мышечной массы ТА и на $22,82 \pm 1,97\%$ средней мышечной массы ГА по сравнению с обработанными изотипическим контролем мышами. В этом исследовании воздействие одним Н4Н10446Р2 индуцировало низкий уровень мышечной гипертрофии с увеличением на $3,70 \pm 1,67\%$ средней мышечной массы ТА и на $2,70 \pm 1,06\%$ средней мышечной массы ГА по сравнению с обработанными изотипическим контролем мышами. Комбинированное воздействие Н4Н1657Н2 и Н4Н10446Р2 в количестве 10 и 2 мг/кг соответственно индуцировало увеличение средней мышечной массы ТА ($51,29 \pm 4,20\%$) и ГА ($39,24 \pm 3,08\%$), которое было больше, чем наблюдаемое при воздействии только Н4Н1657Н2 или Н4Н10446Р2. Комбинированное воздействие Н4Н1657Н2 и Н4Н10446Р2, каждое в дозе 10 мг/кг, индуцировало увеличение средней мышечной массы ТА ($49,64 \pm 4,08\%$) и ГА ($35,56 \pm 3,39\%$), которое было больше, чем наблюдаемое при воздействии только Н4Н1657Н2 или Н4Н10446Р2. Комбинированное воздействие Н4Н1657Н2 и Н4Н10446Р2 в дозе 10 и 25 мг/кг соответственно индуцировало увеличение средней мышечной массы ТА ($49,79 \pm 5,46\%$) и ГА ($35,14 \pm 3,49\%$), которое было больше, чем наблюдаемое при воздействии только Н4Н1657Н2 или Н4Н10446Р2.

Таблица 19. Процентное изменение массы тела и мышц по сравнению с воздействием изотипическим контролем, исследование 6

	Изотипический контроль	Контроль 4	Н4Н1657Н2	Контроль 1	Контроль 1 + Н4Н1657Н2
Доза	10 мг/кг	10 мг/кг	10 мг/кг	10 мг/кг	10 мг/кг + 10 мг/кг
Масса тела	$0,00 \pm 0,51$	$17,04 \pm 2,90$	$8,92 \pm 1,26$	$3,52 \pm 0,86$	$15,84 \pm 0,75$
ТА мышца	$0,00 \pm 2,15$	$47,34 \pm 2,63$	$17,21 \pm 2,97$	$4,54 \pm 2,25$	$30,06 \pm 5,51$
ГА мышца	$0,00 \pm 1,71$	$32,17 \pm 3,81$	$21,57 \pm 1,90$	$2,72 \pm 1,30$	$30,72 \pm 3,64$

Как показано в табл. 19, в шестом исследовании контроль 4 индуцировал гипертрофию во всех исследованных мышцах с увеличением на $47,34 \pm 2,63\%$ средней мышечной массы ТА и на $32,17 \pm 3,81\%$ средней мышечной массы ГА по сравнению с обработанными изотипическим контролем мышами. В этом исследовании воздействие только Н4Н1657Н2 также индуцировало увеличение средней мышечной массы ТА и ГА на $17,21 \pm 2,97\%$ и $21,57 \pm 1,90\%$ соответственно по сравнению с обработанными изотипическим контролем мышами, но эти средние увеличения были меньше, чем наблюдаемые для обработанной контролем 4 группы. В этом исследовании воздействие только контролем 1 индуцировало низкий уровень мышечной гипертрофии с увеличением на $4,54 \pm 2,25\%$ средней мышечной массы ТА и на $2,72 \pm 1,30\%$ средней мышечной массы ГА по сравнению с обработанными изотипическим контролем мышами. Комбинированное воздействие Н4Н1657Н2 и контролем 1 в количестве 10 и 10 мг/кг соответственно индуцировало увеличение средней мышечной массы ТА ($30,06 \pm 5,51\%$) и ГА ($30,72 \pm 3,64\%$), которое было больше, чем наблюдаемое при воздействии только Н4Н1657Н2 или контроля 1.

Таблица 20. Процентное изменение массы тела и мышц по сравнению с воздействием изотипическим контролем, исследование 7

	Изотипический контроль	Контроль 4	Контроль 2	Н4Н10430Р + Н4Н1657Н2	Н4Н10446Р2 + Н4Н1657Н2
Доза	10 мг/кг	10 мг/кг	25 мг/кг	10 мг/кг + 10 мг/кг	10 мг/кг + 10 мг/кг
Масса тела	$0,00 \pm 0,90$	$8,17 \pm 3,30$	$19,18 \pm 1,75$	$10,55 \pm 1,48$	$11,67 \pm 0,98$
ТА мышца	$0,00 \pm 2,30$	$34,43 \pm 5,92$	$36,75 \pm 3,88$	$33,13 \pm 2,02$	$41,28 \pm 2,76$
ГА мышца	$0,00 \pm 2,01$	$14,86 \pm 3,65$	$26,41 \pm 3,16$	$22,82 \pm 1,34$	$29,21 \pm 2,62$

Как показано в табл. 20, в седьмом исследовании контроль 4 индуцировал гипертрофию во всех исследованных мышцах с увеличением на $34,43 \pm 5,92\%$ средней мышечной массы ТА и на $14,86 \pm 3,65\%$ средней мышечной массы ГА по сравнению с обработанными изотипическим контролем мышами. В этом исследовании воздействие только контролем 2 индуцировало гипертрофию в исследованных мышцах с увеличением на $36,75 \pm 3,88\%$ средней мышечной массы ТА и на $26,41 \pm 3,16\%$ средней мышечной массы ГА по сравнению с обработанными изотипическим контролем мышами. Комбинированное воздействие Н4Н1657Н2 и Н4Н10430Р в дозе 10 и 10 мг/кг соответственно индуцировало увеличение средней мышечной массы ТА ($33,13 \pm 2,02\%$) и ГА ($22,82 \pm 1,34\%$), которое было между увеличением, наблю-

даемым для одного ActRIIB-Fc и одного контроля 2. Комбинированное воздействие H4N1657N2 и H4N10446P2 в дозе 10 и 10 мг/кг соответственно индуцировало увеличение средней мышечной массы ТА ($41,28 \pm 2,76\%$) и ГА ($29,21 \pm 2,62\%$).

Таблица 21. Процентное изменение массы тела и мышц по сравнению с воздействием изотипическим контролем, исследование 8

	Изотипический контроль	Контроль 4	H4N1657N2	Контроль 2	H4N10423P + H4N1657N2	H4N10430P + H4N1657N2
Доза	25 мг/кг	25 мг/кг	10 мг/кг	25 мг/кг	25 мг/кг + 10 мг/кг	25 мг/кг + 10 мг/кг
Масса тела	$0,00 \pm 0,64$	$19,81 \pm 0,90$	$8,64 \pm 1,30$	$21,56 \pm 1,29$	$10,45 \pm 1,40$	$15,45 \pm 1,18$
ТА мышца	$0,00 \pm 2,72$	$53,74 \pm 5,31$	$18,44 \pm 2,30$	$39,90 \pm 1,69$	$36,33 \pm 3,67$	$43,83 \pm 1,56$
ГА мышца	$0,00 \pm 0,76$	$39,39 \pm 4,56$	$21,17 \pm 1,72$	$25,87 \pm 2,72$	$28,18 \pm 3,11$	$31,24 \pm 1,90$

Как показано в табл. 21, в восьмом исследовании контроль 4 индуцировал гипертрофию во всех исследованных мышцах с увеличением на $53,74 \pm 5,31\%$ средней мышечной массы ТА и на $39,39 \pm 4,56\%$ средней мышечной массы ГА по сравнению с обработанными изотипическим контролем мышцами. В этом исследовании воздействие только H4N1657N2 также индуцировало увеличение средних мышечных масс ТА и ГА $18,44 \pm 2,30\%$ и $21,17 \pm 1,72\%$ соответственно по сравнению с обработанными изотипическим контролем мышцами, но эти средние увеличения были меньше, чем наблюдаемые для обработанной контролем 4 группы. В этом исследовании воздействие одним контролем 2 индуцировало гипертрофию в исследованных мышцах с увеличением на $39,90 \pm 1,69\%$ средней мышечной массы ТА и на $25,87 \pm 2,72\%$ средней мышечной массы ГА по сравнению с обработанными изотипическим контролем мышцами. Комбинированное воздействие H4N1657N2 и H4N10423P в дозе 10 и 25 мг/кг соответственно индуцировало увеличение средних мышечных масс ТА ($36,33 \pm 3,67\%$) и ГА ($28,18 \pm 3,11\%$) по сравнению с обработанными изотипическим контролем мышцами. Комбинированное воздействие H4N1657N2 и H4N10430P в дозе 10 и 25 мг/кг соответственно индуцировало увеличение средних мышечных масс ТА ($43,83 \pm 1,56\%$) и ГА ($31,24 \pm 1,90\%$), которое было между увеличениями, наблюдаемыми при воздействии только контролем 4 и только контролем 2.

Эти исследования показывают, что введение антител к активину А с ингибитором миоостатина может дополнительно усиливать гипертрофию скелетных мышц в значительно большей степени, чем воздействие только ингибитором миоостатина в исследуемых дозах и с исследуемой частотой введения.

Пример 8. Блокирование связывания активина А с использованием антител к активину А.

Способность отобранных антител к активину А блокировать взаимодействие активина А с его рецепторами, ActRIIB и ActRIIA, а также его эндогенным антагонистом, фоллистатином, определяли с использованием прибора Biacore 3000. Для этого эксперимента контроль 4 (человеческий ActRIIB, экспрессированный с С-концевым тегом Fc человека (SEQ ID: 227)), человеческий ActRIIA, экспрессированный с С-концевым тегом Fc человека (hActRIIA-Fc, R&D Systems, # 340-R2-100) или фоллистатин-288 (R&D Systems, # 5836-FS-025) подвергали аминному соединению с сенсорной поверхностью CM5 Biacore. Активин А (R&D Systems, # 338-AC) в фиксированной концентрации 5 нМ либо отдельно, либо в смеси с антителами к активину А, hActRIIA-Fc, hActRIIB-Fc или изотипическим контрольным антителом в конечной концентрации 60 нМ (12-кратный молярный избыток активина А) инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч. Смеси антитело-активин А затем наносили на поверхности со связанным с амином контролем 4, hActRIIA-Fc или фоллистатином-288 при скорости потока 20 мкл/мин. Сигнал связывания (RU) измеряли через 150 секунд после начала введения и этот сигнал вычитали с помощью измеренного значения RU для отрицательной контрольной эталонной поверхности, чтобы определить специфический сигнал связывания. Процент связывания свободного активина А с поверхностями рецепторов или антагонистов в присутствии каждого антитела к активину А рассчитывали как отношение наблюдаемого сигнала специфического связывания, деленного на сигнал специфического связывания от 5 нМ активина А в отсутствие антитела.

Таблица 22. Блокирование связывания активина А с фоллистатином с помощью антител к активину А

Конц-ция моноклон. антитела/белка	Поверхность с фоллистатином-288 (захвач. 3000RU), нормированная к активину А (% связ. RU с/без ингибитора)											
	Н4Н10442Р2	Н4Н10446Р2	Н4Н10430Р	Н4Н10440Р2	Н4Н10429Р	Н4Н10436Р2	Н4Н10423Р	Контроль 1	Контроль 3	hActRIIA-hFc	Контроль 4 (hActRIIB-hFc)	изотипический (-) контроль
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
0,94	73	77	79	76	97	78	120	83	172	156	169	100
1,88	46	54	59	57	80	61	122	68	170	148	163	102
3,75	6	7	15	17	20	16	103	27	145	138	151	97
7,5	3	3	1	4	1	1	97	0	33	116	120	102
15	3	3	1	2	1	1	96	1	5	60	43	102
30	3	3	1	1	2	2	94	1	7	11	1	104
60	3	3	1	0	3	2	93	2	9	13	1	103

Как показано в табл. 22, 6 из 7 исследованных антител к активину А согласно настоящему изобретению, а также как контроль 1, так и контроль 3 блокировали связывание активина А с фоллистатином-288. Одно антитело согласно настоящему изобретению, Н4Н10423Р, не мешало связыванию активина А с фоллистатином-288. Контроль 4 и ActRIIB-Fc блокировали связывание активина А с фоллистатином-288 при более высоких концентрациях.

Таблица 23. Блокирование связывания активина А с hActRIIA-Fc с помощью антител к активину А

Конц-ция моноклон. антитела/белка (нМ)	Поверхность с hActRIIA-hFc (захвач.8000RU), нормированная к активину А (% связ. RU с/без ингибитора)											
	Н4Н10442Р2	Н4Н10446Р2	Н4Н10430Р	Н4Н10440Р2	Н4Н10429Р	Н4Н10436Р2	Н4Н10423Р	Контроль 1	Контроль 3	hActRIIA-hFc	Контроль 4 (hActRIIB-hFc)	изотипический (-) контроль
0,00	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
0,94	114	111	81	75	87	75	112	82	207	236	276	109
1,88	114	115	62	52	66	55	114	66	190	222	266	112
3,75	95	85	19	17	19	16	111	28	139	188	231	110
7,50	105	94	3	6	1	2	110	1	32	128	160	115
15	113	108	2	4	1	2	112	1	1	50	51	116
30	117	98	2	3	1	2	114	1	1	5	2	118
60	118	118	2	3	1	2	116	2	0	3	1	119

Как показано в табл. 23, 4 из 7 исследованных антител к активину А согласно настоящему изобретению, а также как контроль 1, так и контроль 3 блокировали связывание hActRIIA-Fc с активинном А. Три антитела согласно настоящему изобретению, Н4Н10442Р2, Н4Н10446Р2 и Н4Н10423Р, не мешали связыванию активина А с hActRIIA-Fc. Контроль 4 и hActRIIA-Fc блокировали связывание активина А с hActRIIA-Fc.

Таблица 24. Блокирование связывания активина А с hActRIIB-Fc с помощью антител к активину А

Поверхность hActRIIB-hFc (контроль 4) (захвач. 4000RU), нормированная по активину А (% связ. RU с/без ингибитора)												
Концентрация моноклон. антитела/белка (нМ)	Н4Н10442Р2	Н4Н10446Р2	Н4Н10430Р	Н4Н10440Р2	Н4Н10429Р	Н4Н10436Р2	Н4Н10423Р	Контроль 1	Контроль 3	hActRIIA-hFc	Контроль 4 (hActRIIB-hFc)	изотипический (-) контроль
0,00	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
0,94	110	107	80	79	87	80	93	85	135	131	149	105
1,88	106	105	62	58	67	60	78	69	133	129	148	105
3,75	88	76	20	19	19	19	47	31	120	127	144	104
7,50	103	95	4	7	2	3	42	2	33	113	130	107
15	115	115	3	4	2	2	42	2	2	56	51	110
30	122	89	3	4	2	3	41	2	1	5	3	111
60	124	129	3	4	3	4	41	3	2	5	2	115

Как показано в табл. 24, 4 из 7 исследованных антител к активину А согласно настоящему изобретению, а также как контроль 1, так и контроль 3 блокировали связывание активина А с hActRIIB-Fc. Два антитела согласно настоящему изобретению, Н4Н10442Р2 и Н4Н10446Р2, не мешали связыванию активина А с hActRIIB-Fc. Одно антитело согласно настоящему изобретению, Н4Н10423Р, демонстрировало способность к частичному блокированию связывания активина А с hActRIIB-Fc при более высоких концентрациях исследуемого антитела. Как hActRIIB-Fc, так и Fc-hActRIIA блокировали связывание активина А с hActRIIB-Fc.

Пример 9. Влияние Н4Н1657Н2 на мышечную массу и физическую работоспособность.

Влияние антитела к GDF8, Н4Н1657Н2, на мышечную массу и физическую работоспособность оценивали на старых самцах мышей C57BL/6 (19 месяцев).

Мышей распределяли на четыре группы (n=6-8/группу), малоподвижная группа или группа с физическими упражнениями, получавшими подкожные дозы Н4Н1657Н2 или изотипического контрольного антитела (10 мг/кг) два раза в неделю в течение 21 дней (6 инъекций). Мышей в группе с физическими упражнениями подвергали упражнениям, предусматривающим одну тренировку в день, состоящую из 20 мин на беговой дорожке Exer 6M (Columbus Instruments, Columbus, OH) при 10 м/мин с уклоном 5°, пять дней в неделю в течение трех недель подряд. Через три недели лечения измеряли выносливость во всех четырех группах, используя тест истощения на беговой дорожке. Данные анализировали с использованием двухфакторного дисперсионного анализа с последующим тестом HSD Тьюки. Мышечные массы представляли как нормированные массы (т.е. мышечные массы нормировали на массу тела, измеренную в начале эксперимента). Результаты для четырехглавой мышцы приведены в табл. 25 в виде среднего % изменения для каждой группы ($\pm$ стандартная ошибка среднего значения) по сравнению с группой изотипического контрольного антитела.

Таблица 25. Изменение массы четырехглавой мышцы

	Изотипич. контроль (малоподвижн.)	Н4Н1657Н2 (малоподвижн.)	Изотипич. контроль	Н4Н1657Н2 + упражнение
			+ упражнение	
Масса четырехглавой мышцы	0,00 $\pm$ 2,72	15,77 $\pm$ 2,73	9,85 $\pm$ 3,57	17,66 $\pm$ 3,24

% изменение от изотипического контроля. Показаны средние $\pm$ SEM.

Как видно из табл. 25, воздействие Н4Н1657Н2 приводило к значительному росту массы четырехглавых мышц (достоверность $p < 0,01$ по отношению к изотипическому контролю для обеих групп Н4Н1657Н2). Увеличение масс групп мышц задних конечностей (ТА, ГА) заметно у групп старых мышей с упражнениями (17,4%, 12,5% соответственно) и малоподвижных (14,1%, 11,6%, соответственно) по сравнению с обработкой изотипическим контрольным антителом. Наблюдалось небольшое увеличение мышечной массы у занимающихся физическими упражнениями и малоподвижными старыми мышами, получавшими изотипическое контрольное антитело, но это не было статистически значимым (табл. 25).

Влияние воздействия H4N1657N2 на физическую выносливость также исследовали на 19-месячных самцах мышей C57BL/6 (табл. 26).

Таблица 26. Исследование выносливости

	Изотипич. контроль (малоподвижн.)	H4N1657N2 (малоподвижн.)	Изотипич. контроль + упражнение	H4N1657N2 + упражнение
Время бега до истощения (мин)	27,94 ± 4,12	28,54 ± 6,10	50,26 ± 8,56	73,23 ± 4,68
Пройденная до истощения дистанция (м)	428,42 ± 71,91	535,99 ± 155,61	930,06 ± 179,78	1366,65 ± 95,91

В группе подвергнутых физическим упражнениям старых мышей, H4N1657N2 также индуцировало значительное увеличение выносливости, что измерено с помощью времени (73,2 мин против 50,2 мин) и расстояния (1,33 км против 0,93 км) на беговой дорожке по сравнению с группой изотипического контроля (табл. 26). Тем не менее у малоподвижных мышей H4N1657N2 незначительно увеличивало выносливость по сравнению с группой изотипического контроля.

Как в исследовании мышечной массы, H4N1657N2 индуцировало значительное увеличение выносливости, что измерено с помощью времени и расстояния на беговой дорожке, только у выполнявших физические упражнения мышей, но не у малоподвижных мышей. Эти результаты показывают, что H4N1657N2 повышает физическую работоспособность в сочетании с физической подготовкой.

Пример 10. Влияние H4N1657N2 на массу скелетных мышц и изометрическую силу у мышей.

Способность H4N1657N2 индуцировать гипертрофию скелетных мышц оценивали *in vivo* у 9 недельных самцов мышей C57BL/6.

Повторные подкожные дозы H4N1657N2 или изотипического контрольного антитела, в дозе 10 или 30 мг/кг, вводили два раза в неделю в течение 3 недель (n=6). Воздействие H4N1657N2 в течение 21 дня приводило к увеличению массы тела на 4,7±2,3% (n.s.) и 7,1±1,5% (n.s.) соответственно по сравнению с мышцами, получавшими изотипический контроль, вводимый в тех же дозах. Отдельные массы мышц увеличивались следующим образом, по сравнению с изотипическим контролем (10 и 30 мг/кг): передняя большеберцовая (19,4±4,9% ** и 20,6±1,5% **), икроножная: (14,9±2,9% ** и 25,3±1,9% ***) и четырехглавая (17,7±3,6% * и 26,2±3,8% **) мышцы. (Вся статистика по однофакторному дисперсионному анализу с ретроспективным анализом Тьюки (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; n.s. = статистически не отличается).)

Увеличение массы передней большеберцовой (ТА) мышцы сопровождалось ростом изометрической силы *ex vivo*, указывая на способность поддерживать как мышечную функцию, так и массу. Мышей, которые предварительно получали повторные подкожные дозы H4N1657N2 или изотипического контрольного антитела (в дозе 10 мг/кг, вводимой дважды в неделю в течение 3 недель, n=6 на группу), отдельно анестезировали и выдерживали в газе изофлуране, а ТА мышцы вырезали и помещали в насыщенную кислородом баню с лактатом рингера с постоянно поддерживаемой температурой 25°C. Верхний конец ТА крепко привязывали к погруженной стойке в бане, а дистальное сухожилие привязывали к рычагу 305C (Cambridge Systems). Оптимальную длину определяли, чуть растягивая ТА и затем исследуя силу, создаваемую стимуляцией 1 Гц при минимальном напряжении. Мышцы ТА повторно растягивали и стимулировали, пока не наблюдался спад силы, а затем расслабляли до прежнего положения. Напряжение затем постепенно увеличивали в серии стимуляции 1 Гц для достижения максимальной выходной силы. После того, как определяли оптимальную длину и напряжение, ТА мышцы стимулировали в течение 400 мс при увеличивающихся частотах (40-100Hz), чтобы определить максимальную силу тетанического напряжения. ТА мышцам давали 2-минутные периоды отдыха между каждой тетанической стимуляцией. ТА мышцы мышей, обработанных изотипическим контрольным антителом в дозе 10 и 30 мг/кг в течение 21 дней производили среднюю максимальную силу тетанического сокращения 892,6±37 и 906,1±37,8 соответственно. ТА мышцы получавших H4N1657N2 мышей производили среднюю максимальную силу тетанического сокращения 1041,3±31,7 и 1003,3±35,7 мН соответственно. Эти значения силы представляют собой увеличение на 16,7% * (10 мг/кг) и 10,7% n.s. (30 мг/кг) средней максимальной силы тетанического сокращения по сравнению с изотипическим контролем (фиг. 2А). Общий эффект воздействия лекарственного средства H4N1657N2 на максимальную силу тетанического сокращения статистически отличался от изотипического контроля при обеих дозах 10 и 30 мг/кг (доза 10 мг/кг показана на фиг. 2В). (Фиг. 2А: статистический анализ с помощью однофакторного дисперсионного анализа с ретроспективным анализом Тьюки (*p<0,05; n.s.=статистически не отличается). Фиг. 2В: Статистический анализ с помощью двухфакторного дисперсионного анализа и ретроспективного анализа Сидака [p>0,0001]).

Пример 11. H4N1657N2 улучшает восстановление после индуцированной подвешиванием задних конечностей (HLS) атрофии.

Влияние H4N1657N2 на массу скелетных мышц во время фазы восстановления после 7 дней индуцированной подвешиванием задних конечностей (HLS) атрофии оценивали у годовалых мышей-самцов C57BL/6.

В день 0 восемнадцать мышей подвешивали за хвост так, чтобы обе задние ноги не могли коснуться земли на протяжении 7 дней. Мышей содержали в специальных клетках со свободным доступом к пище и воде. Одновременно еще одну группу из шести мышей оставляли в нормальных клетках и они служили в качестве контроля (контроль без HLS). На 7 день подвешенных мышей снимали и распределяли по процентам массы тела, потерянной при HLS, на три группы ($n=6$ в каждой). На 7-й день определяли мышечную массу контрольной группы без HLS и одной группы HLS (группа HLS), чтобы оценить процент атрофии в ответ на HLS. Двум оставшимся группам HLS ($n=6$ каждый) позволяли восстановиться в течение 8 дней (т.е. с дня 7 по день 15 эксперимента) в нормальной клетке и вводили им подкожно дозы 10 мг/кг либо H4N1657N2, либо изотипического контроля в дни 7 и 10 (т.е. через ноль дней и 3 дня восстановления) (HLS+7восст+H4N1657N2 и HLS+7восст+изотип контроль соответственно). На 15-й день (т.е. через 8 дней восстановления) определяли массу мышц, чтобы оценить процент восстановления после индуцированной HLS атрофии.

Как показано на фиг. 3В, семь дней HLS приводило к значительной потере массы как передней большеберцовой (ТА), так и икроножной (ГА) мышц (группа HLS) по сравнению с контрольной группой без HLS (-13,7%* и -14,8%* соответственно). Через 8 дней восстановления группа HLS+7восст+изотип контроль сохраняла потерю мышечной массы ТА и ГА (-6,3% и -7,5%), по сравнению с контрольной группой без HLS, в то время как в группе HLS+7восст+H4N1657N2 был показан прирост массы (4,7% и 5%) по сравнению с группой без HLS.

При сравнении этих двух групп восстановления (т.е. HLS+7восст+H4N1657N2 и HLS+7восст.+изотип. контроль) влияние H4N1657N2 на массы ТА и ГА статистически не отличалось от влияния, наблюдаемого с изотипическим контрольным антителом. Тем не менее, в то время как мышечная масса группы HLS+7восст.+изотип. контроль статистически не отличалась от группы HLS или контрольной группы без HLS, группа HLS+7восст+H4N1657N2 характеризовалась статистически большей массой ТА и ГА, по сравнению с группой HLS. (Вся статистика анализировалась с помощью однофакторного дисперсионного анализа с ретроспективным анализом Тьюки (* $p<0,05$ по сравнению с группой без HLS; ## $p<0,01$ по сравнению с HLS)

Пример 12. Ингибирование активации рецептора BMP типа I и II антителами к активину А и ActRIIB-Fc.

Костные морфогенетические белки (BMP) принадлежат к надсемейству TGF- β и участвуют в регуляции многих физиологических процессов путем активации рецепторных комплексов на поверхности клетки, которые состоят из рецепторов BMP типов I и II. Активация рецепторов приводит к фосфорилированию белков SMAD и транскрипционной активации реагирующих на лиганды генов.

Был разработан биоанализ, чтобы обнаружить регулирование передачи сигналов BMP в клетках W-20-17 линии стромальных клеток костного мозга мыши, которые, как было показано ранее, реагируют на BMP2. Сконструировали клетки для стабильной экспрессии люциферазного репортера (т.е. отвечающего на BMP элемента (BRE(2X)-люцифераза-IRES-GFP)) и сортировали по высокой экспрессии GFP. Полученную стабильную клеточную линию назвали W-20-17/BRE-Luc и поддерживали в 10% FBS, DMEM, Pen/Strep и 200 мкг/мл G418. Эти клетки использовали для измерения активации BMP и ингибирования этой активации антителами к активину А и ActRIIB-hFc (контроль 4, SEQ ID NO: 227).

Способность четырех антител к активину А и ActRIIB-hFc ингибировать передачу сигналов BMP оценивали с помощью клеточной линии W-20-17/BRE-luc. Для биологического анализа клетки W-20-17/BRE-Luc высевали в 96-луночные планшеты для анализа в количестве 10000 клеток/луночку и инкубировали при 37°C и 5% CO₂ в течение ночи. На следующий день BMP2, BMP4, BMP6, BMP9 или BMP 10 серийно разводили в соотношении 1:3 и добавляли к клеткам с 100 нМ до 0,002 нМ (включая в себя контроль без BMP для дозозависимых ответов). Для ингибирования BMP антителами к активину А или ActRIIB-hFc антитела или ActRIIB-hFc серийно разводили в соотношении 1:3 от 1000 нМ до 0,02 нМ (включая в себя без антител, контрольное антитело или отрицательный контроль для ActRIIB-hFc (т.е. несоответствующий белок, помеченный hFc, "контрольный белок")) и добавляли к клеткам вместе с 100 пМ BMP2, 100 пМ BMP4, 10 нМ BMP6, 800 пМ BMP9 или 4 нМ BMP 10, как указано. Активность люциферазы обнаруживали через 5,5 часов инкубации в 37°C и 5% CO₂ с Victor X (Perkin Elmer) и результаты анализировали с использованием нелинейной регрессии (4-параметровая логистика) с программным обеспечением Prism 5 (GraphPad).

Как показано в табл. 27 ниже, H4N10446P2 и H4N10430P не ингибировали любой из исследуемых BMP, в то время как другие исследуемые антитела к активину А (H4N10429 и H4N10436P2) и ActRIIB-hFc все показали некоторое ингибирование части BMP. H4N10429P показало ингибирование BMP9 и BMP10 со значениями IC₅₀ 8,1 нМ и 3,5 нМ соответственно, но не ингибировало BMP2, BMP4 и BMP6. H4N10436P2 показало слабое ингибирование BMP2 и BMP4 при высоких концентрациях антитела и ингибирование BMP 10 со значением IC₅₀ >100 нМ, но не показало ингибирование BMP6 и BMP9. ActRIIB-hFc показало ингибирование BMP9 и BMP 10 со значениями IC₅₀ 2 нМ и 1 нМ, но не ингибировало BMP2, BMP4 и BMP6. Ни одна из контрольных молекул (т.е. изотипическое контрольное антитело (контрольное моноклональное антитело) и несоответствующий белок с тегами hFc (контрольный белок)), не ингибировала любой из BMP, в то время как только BMP2, BMP4, BMP6, BMP9 или BMP 10

(т.е. без антител или меченых hFc белков) активировали клетки W-20-17/BRE-luc со значениями EC₅₀ 34 пМ, 63 пМ, 4,5 нМ, 260 пМ и 2,5 нМ соответственно.

Таблица 27. Ингибирование антителами к активину А и ActRIIb-hFc BMP в клетках W-20-17/BRE-luc

Лиганды	BMP2	BMP4	BMP6	BMP9	BMP10
EC ₅₀ [M]	3,4E-11	6,3E-11	4,5E-09	2,6E-10	2,5E-09
Констант. BMP	100 пМ	100 пМ	10 нМ	800 пМ	4 нМ
Антитела	IC ₅₀ [M]	IC ₅₀ [M]	IC ₅₀ [M]	IC ₅₀ [M]	IC ₅₀ [M]
H4H10446P2	Нет ингибир-я	Нет ингибир-я	Нет ингибир-я	Нет ингибир-я	Нет ингибир-я
H4H10430P	Нет ингибир-я	Нет ингибир-я	Нет ингибир-я	Нет ингибир-я	Нет ингибир-я
H4H10429P	Нет ингибир-я	Нет ингибир-я	Нет ингибир-я	8,1E-09	3,5E-09
H4H10436P2	Слабое (ингибир-е 31% при 1 мкМ)	Слабое (ингибир-е 51% при 1 мкМ)	Нет ингибир-я	Нет ингибир-я	> 1,0E-07
ActRIIb-hFc	Нет ингибир-я	Нет ингибир-я	Нет ингибир-я	2,0E-09	1,0E-09
Контрольное моноклон. антитело	Нет ингибир-я	Нет ингибир-я	Нет ингибир-я	Нет ингибир-я	Нет ингибир-я
Контрольный белок	Нет ингибир-я	Нет ингибир-я	Нет ингибир-я	Нет ингибир-я	Нет ингибир-я

Пример 13. Воздействие антитела к активину А H4H10446P2 снижает почечный фиброз in vivo.

Влияние специфического антитела к активину А согласно настоящему изобретению, H4H10446P2, на почечный фиброз определяли на мышинной модели односторонней обструкции мочеточника (UUO) фиброза почек. Модель UUO разрабатывали путем полного лигирования левого мочеточника при сохранении функции правой почки без изменений. Вкратце UUO проводили на мышах при анестезии кетамин-ом/ксилазином, в результате чего к левому мочеточнику был доступ через боковой разрез, и помещали две лигатуры на проксимальной одной трети мочеточника с использованием шелковой нити 5-0 в 5 мм друг от друга. Ложные операции проводили таким же образом без установки каких-либо лигатур на мочеточник. В этой модели выраженный фиброз развивается в почке в течение 14 дней после UUO, который оценивали путем измерения коллагена почек с помощью прямого измерения количества гидроксипролина в образце, который упоминается как гидроксипролиновый способ. Гидроксипролин представляет собой специфический компонент коллагена и составляет приблизительно 14,4% от аминокислотного состава коллагена в большинстве тканей млекопитающих (Cochrane и др, J Am Soc Nephrol. 16: 3623-30 (2005)). Для измерения содержания коллагена с помощью гидроксипролинового способа первые образцы замороженной почки сушат в течение ночи в вакуумной камере. Высушенные пробы ткани почек затем гомогенизируют в охлажденном льдом растворе NaCl/NaHCO₃, а затем гидролизуют с помощью 6 M HCl. Образцы затем сушат с использованием вакуумной центрифуги, после чего подвергают регидратации с использованием 0,1 M HCl. Гидроксипролин в регидратированных образцах окисляется с 300 mM хлорамина Т (Sigma, # 857319), и реагент Эрлиха (3,5 п-диметиламинобензальдегид (FW: 149,19, Sigma, # 39070) в 60%-ной хлорной кислоте (Sigma, # 311413)) затем добавляют для развития цвета. Наконец, с использованием спектрофотометра измеряли поглощение образцов при 558 нм и сравнивали с гидроксипролиновыми стандартами (Sigma, # H5534) с известной концентрацией, чтобы определить содержание гидроксипролина почек. Измеренное значение гидроксипролина затем умножали на коэффициент 6,94, чтобы определить значение коллагена. Через четырнадцать дней после UUO сухой вес почки уменьшается в результате повреждения паренхимы. Ложные операции (n= 10) или UUO (n= 20) проводили на 16-недельных самцах мышей C57BL/6 (Taconic farms, Inc.). Мышей, которые подвергались операции UUO, разделяли на две группы. Каждая группа UUO получала подкожную инъекцию либо H4H10446P2 (40 мг/кг, n=10), либо изотипического контрольного антитела (40 мг/кг, n=10), которое не связывается с каким-либо известным мышинным белком, начиная за день до операции и в 1, 3, 6, 8, 10 и 13 день после операции. Мыши, у которых провели ложные операции, получали носитель (стерильный PBS) в течение этого времени, используя тот же график, что и группы UUO. Всех мышей умерщвляли через 14 дней после операции. Измеряли массу почек и почки быстро замораживали с использованием жидкого азота и выдерживали при температуре -80°C до тех пор, пока не измеряли содержание коллагена. Содержание коллагена почек измеряли с использованием гидроксипролинового способа, а затем выражали либо как общий коллаген почек (мкг), либо как коллаген почек, нормированный на вес почки (мкг/мг сухой массы). Статистический анализ проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа с тестом множественного сравнения Тьюки. Результаты, включающие в себя общий коллаген почек, нормированный коллаген почек и сухую массу почек для каждой группы воздействия, выражали как среднее ±SEM в табл. 28 ниже.

Таблица 28. Общий коллаген почек, нормированный коллаген почек и сухая масса почек в каждой группе (среднее значение $\pm$ SEM)

Группа воздействия	Общий коллаген почек (мкг)	Нормированный коллаген почек (мкг/мг сухой массы ткани)	Сухая масса почек (г)
Ложная операция + носитель	429,6 $\pm$ 25,93	8,16 $\pm$ 0,29	0,0524 $\pm$ 0,002
UUO + изотипич. контроль	980,7 $\pm$ 50,48	25,07 $\pm$ 0,86	0,0396 $\pm$ 0,0027
UUO + H4N10446P2	730,7 $\pm$ 48,02	17,48 $\pm$ 0,79	0,0422 $\pm$ 0,0029

Как показано в табл. 28, как общий коллаген почек, так и нормированный на массу почек коллаген почек был значительно увеличен у мышей с UUO по сравнению с ложнооперированными мышами. Мыши с UUO, обработанные H4N10446P2, проявляли значительное снижение как общего коллагена почек, так и нормированного на массу почек коллагена почек (приблизительное уменьшение фиброзного коллагена на 45%) по сравнению с обработанными изотипическим контрольным антителом мышами с UUO, указывая на то, что антитело к активину А приводит к снижению фиброза в почке. У мышей с UUO, получавших H4N10446P2, наблюдалось увеличение сухой массы почек, по сравнению с обработанными изотипическим контрольным антителом мышами с UUO, указывая на сохранение паренхимы у обработанных антителом к активину А мышей.

Пример 14. Влияние H4N10446P2 на массу тела и мышечную массу у мышей с гиперэкспрессией активина А.

Для оценки эффективности H4N10446P2 в нейтрализации повышенного содержания активина А у мышей, активин А сверхэкспрессировали у мышей C57BL/6 (10-недельного возраста) с помощью гидродинамической доставки (HDD) конструкта ДНК, кодирующего полноразмерный активин А. Мышей распределяли на три группы (n=5-6/группа); одним вводили смесь физиологического раствора/2,5 мкг контроля конструкта ДНК в присутствии изотипического контрольного антитела, а двум группам вводили смесь физиологического раствора/2,5 мкг конструкта ДНК, содержащего активин А, в присутствии изотипического контрольного антитела или H4N10446P2. Конструкты ДНК вводили в день 0, а антитела вводили в дни 0 и 4 в дозе 2,5 мг/кг (2 инъекции) в течение 7 дней. Мышечные массы представляли как нормированные массы (т.е. мышечные массы нормировали на массу тела, измеренную в начале эксперимента). Результаты для массы тела показаны в виде среднего изменения от начальной массы тела. Результаты для передней большеберцовой (ТА) и икроножной (GA) мышц показаны на фиг. 4 в виде среднего процентного изменения для каждой группы ($\pm$ стандартная ошибка среднего значения) в сравнении с группой доставки HDD контрольного конструкта + изотипическое контрольное антитело. Данные анализировали с одно- или двухфакторным дисперсионным анализом с последующим тестом HSD Тьюки.

Как видно на фиг. 4, через семь дней после HDD доставка активина А у мышей, получавших изотипическое контрольное антитело, приводила к значительному уменьшению массы тела (-10,81 $\pm$ 2,46%) и массы большеберцовой и икроножной мышц (-13,96 $\pm$ 1,85% и -10,34 $\pm$ 1,51 соответственно) (достоверность $p < 0,01$ по отношению к изотипическому контролю). Доставка активина А у мышей, получавших H4N10446P2, приводила к значительному снижению массы тела (-1,49 $\pm$ 1,98%) и массы большеберцовой и икроножной мышц в конце семи дней воздействия (-2,57 $\pm$ 1,26% и -1,77 $\pm$ 2,42% соответственно).

Настоящее изобретение не должно быть ограничено в объеме конкретными описанными в настоящем документе вариантами осуществления. Действительно, различные модификации настоящего изобретения в дополнение к описанным в настоящем документе станут очевидными специалистам в настоящей области техники из вышеприведенного описания и прилагаемых графических материалов. Такие модификации предназначены для того, чтобы попасть под объем прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с активинном А с равновесной константой диссоциации связывания (K_D), равной менее чем приблизительно 5 пМ, как измерено в анализе поверхностного плазмонного резонанса при температуре 25°C, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: (а) определяющие комплементарность области (CDR) варибельной области тяжелой цепи (HCVR), имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 162; и (b) CDR варибельной области легкой цепи (LCVR), имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 146.

2. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, причем выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с активинном А с K_D менее чем приблизительно 4 пМ, как измерено в анализе поверхностного плазмонного резонанса при температуре 25°C.

3. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1 или 2, причем выделенное

антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с активином А с равновесной константой ассоциации связывания (K_a) менее чем приблизительно 500 нМ.

4. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-3, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент блокирует связывание по меньшей мере одного рецептора активина А с активином А.

5. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-3, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент блокирует активацию по меньшей мере одного рецептора активина А активином А.

6. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.5, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по существу не блокирует связывание активина А с рецептором активина типа II.

7. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.4, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент блокирует связывание активина А с рецептором активина А со значением IC_{50} менее чем приблизительно 80 пМ, как измерено в биоанализе связывания рецептора/лиганда *in vivo* при 25°C.

8. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.7, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент блокирует связывание активина А с рецептором активина А со значением IC_{50} менее чем приблизительно 60 пМ, как измерено в биоанализе связывания рецептора/лиганда *in vivo* при 25°C.

9. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-8, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ингибирует связывание активина А с рецептором активина А, выбранным из группы, состоящей из рецептора активина типа IIA (ActRIIA), рецептора активина типа IIB (ActRIIB) и рецептора активина типа I.

10. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-9, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ингибирует опосредованную активином А активацию пути передачи сигнала комплекса SMAD.

11. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-10, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурирует за связывание с активином А с эталонным антителом, содержащим пару последовательностей вариабельной области тяжелой цепи (HCVR)/вариабельной области легкой цепи (LCVR), выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 138/146 и 194/146.

12. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-10, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с тем же эпитопом на активине А, что и эталонное антитело, содержащее пару последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 138/146 и 194/146.

13. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит пары аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR SEQ ID NO: 162/146.

14. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит домены HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, соответственно выбранные из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 164-166-168-148-150-152.

15. Фармацевтическая композиция для ингибирования опосредованного активином А пути передачи сигнала, содержащая антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-14, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

16. Фармацевтическая композиция для ингибирования опосредованного активином А пути передачи сигнала, содержащая антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-14, антагонист GDF8 и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

17. Фармацевтическая композиция по п.16, в которой антагонист GDF8 выбирают из группы, состоящей из ингибирующего GDF8 слитого белка, антитела к GDF8 и антигенсвязывающего фрагмента антитела к GDF8.

18. Фармацевтическая композиция по п.17, в которой антагонист GDF8 представляет собой антитело к GDF8 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR) из HCVR, содержащей SEQ ID NO: 217, и определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR) из LCVR, содержащей SEQ ID NO: 221.

19. Фармацевтическая композиция по п.17, в которой антагонист GDF8 представляет собой антитело к GDF8 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий:

а) три HCDR, имеющие SEQ ID NO: 218, SEQ ID NO: 219 и SEQ ID NO: 220 и

б) три LCDR, имеющие SEQ ID NO: 222, SEQ ID NO: 223 и SEQ ID NO: 224.

20. Применение антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-14 для увеличения мышечной массы или силы у субъекта.

21. Применение фармацевтической композиции по любому из пп.15-19 для увеличения мышечной

массы или силы у субъекта.

22. Применение антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-14 для лечения, предупреждения или уменьшения интенсивности заболевания или нарушения, характеризующегося сниженной мышечной массой или силой.

23. Применение фармацевтической композиции по любому из пп.15-19 для лечения, предупреждения или уменьшения интенсивности заболевания или нарушения, характеризующегося сниженной мышечной массой или силой.

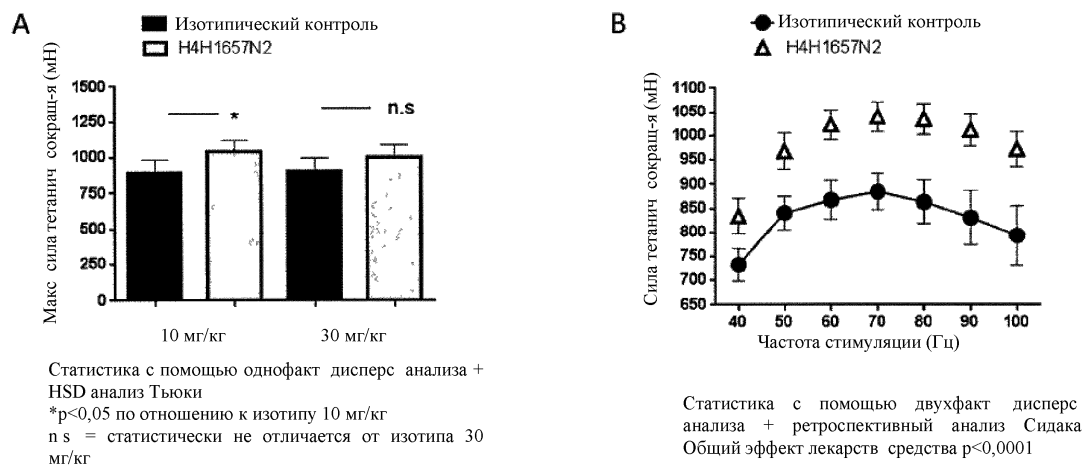
24. Применение по п.22 или 23, причем заболевание или нарушение, характеризующееся сниженной мышечной массой или силой, выбирают из группы, состоящей из саркопении, кахексии, мышечного повреждения, мышечной слабости/атрофии, злокачественной опухоли, ожирения, сахарного диабета, артрита, рассеянного склероза, мышечной дистрофии, бокового амиотрофического склероза, болезни Паркинсона, остеопороза, остеоартрита, остеопении и метаболического синдрома.

25. Применение антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-14 для лечения, предупреждения или уменьшения интенсивности хронического заболевания почек.

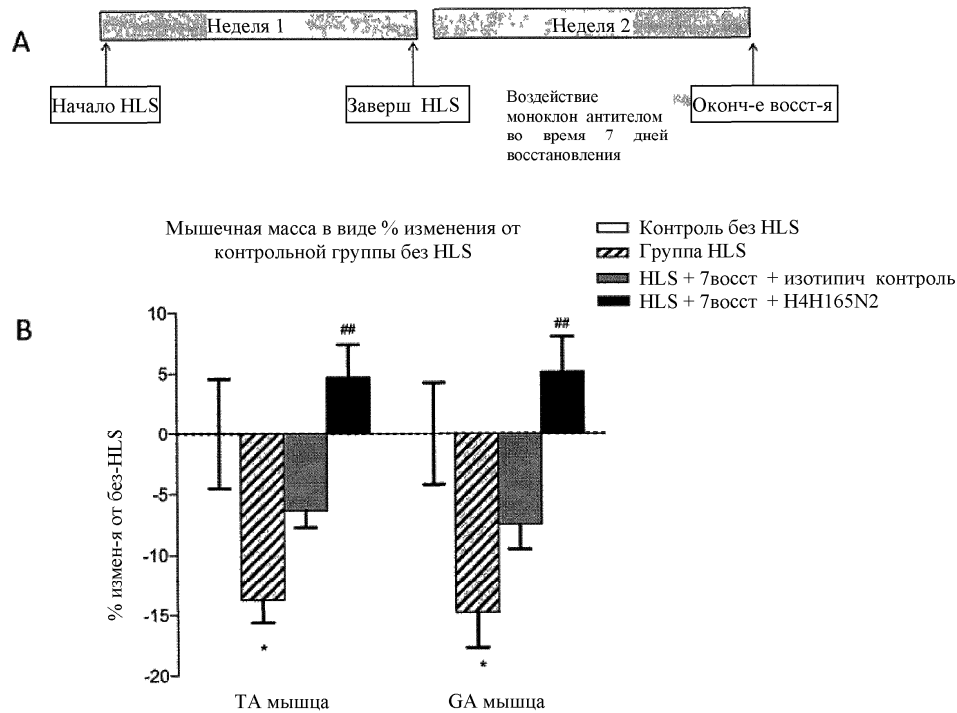
26. Применение фармацевтической композиции по любому из пп.15-19 для лечения, предупреждения или уменьшения интенсивности хронического заболевания почек.

		1 мкМ моноклонального антитела + 50 нМ активина А													
α-активин А	Уровень захвач. моноклон. антител (нМ)		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12(-)	13(-)
H4N10446P2	1,66±0,26	1	0,32	0,36	0,39	0,33	1,39	1,61	1,68	1,61	1,67	0,83	1,21	0,47	0,26
H4N10468P2	1,65±0,27	2	0,33	0,39	0,40	0,41	1,41	1,68	1,73	1,66	1,70	1,08	0,79	0,41	0,28
H4N10442P2	1,73±0,30	3	0,35	0,36	0,39	0,27	1,33	1,55	1,59	1,44	1,50	0,99	0,99	0,46	0,26
H4N10423P	1,62±0,25	4	0,51	0,58	0,59	0,22	0,28	1,48	1,32	1,49	1,31	0,60	0,79	0,39	0,26
H4N10430P	1,67±0,23	5	1,55	1,84	1,76	0,33	0,27	0,62	0,26	0,31	0,31	0,20	-0,03	0,49	0,27
H4N10429P	1,71±0,29	6	1,24	1,37	1,40	1,39	0,65	0,32	0,26	0,34	0,29	0,16	-0,01	0,39	0,24
H4N10432P2	1,54±0,45	7	1,36	1,58	1,63	1,32	0,28	0,32	0,24	0,29	0,27	0,15	-0,05	0,30	0,11
H4N10436P2	1,66±0,45	8	1,22	1,32	1,39	1,41	0,28	0,36	0,23	0,30	0,27	0,16	-0,04	0,28	0,14
H4N10440P2	1,44±0,35	9	1,17	1,37	1,40	1,22	0,29	0,41	0,27	0,32	0,28	0,13	-0,05	0,28	0,11
Контроль 1	1,33±0,14	10	1,37	1,37	1,30	1,14	0,24	0,24	0,13	0,20	0,25	0,15	-0,05	0,27	0,12
Контроль 2	0,78±0,10	11	0,69	0,35	0,15	0,58	0,06	0,01	0,01	0,00	0,08	-0,02	0,24	0,15	0,33
Изотипический контроль	1,48±0,27	12(-)	0,22	0,25	0,23	0,18	0,23	0,22	0,14	0,20	0,23	0,26	-0,02	0,15	-0,02
Изотипический контроль	1,18±0,09	13(-)	-0,12	0,02	0,01	-0,02	0,06	0,00	0,00	0,01	0,06	-0,03	0,20	-0,02	0,24

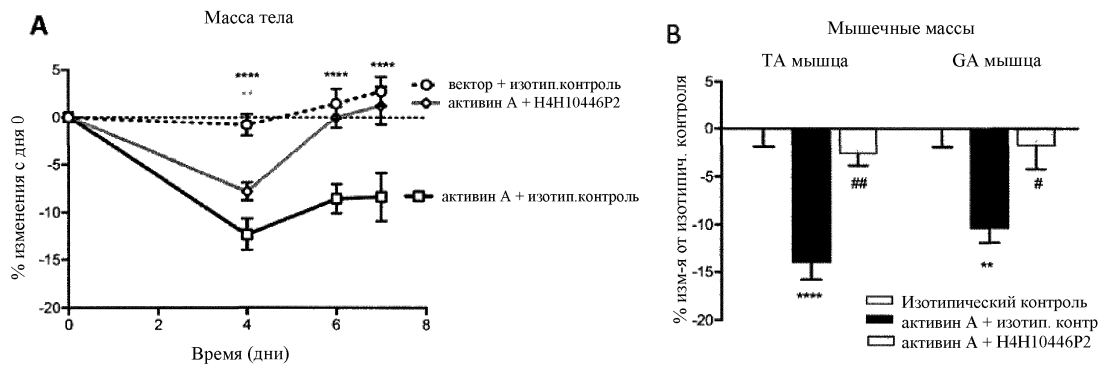
Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2