



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.12.07

(21) Номер заявки
201790601

(22) Дата подачи заявки
2015.09.14

(51) Int. Cl. **C07K 16/22** (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61P 19/00 (2006.01)

**(54) СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ ПРОГРЕССИРУЮЩЕЙ ОССИФИЦИРУЮЩЕЙ
ФИБРОДИСПЛАЗИИ**

(31) **62/049,869; 62/141,775**

(32) **2014.09.12; 2015.04.01**

(33) **US**

(43) **2017.07.31**

(86) **PCT/US2015/000100**

(87) **WO 2016/039796 2016.03.17**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**РИДЖЕНЕРОН
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
**Хэтсел Сара Дж., Экономидис
Арис Н., Айдан Винсент Дж. (US)**

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

(56) WO-A1-2009114180
MOHEDAS AGUSTIN H. ET AL.:
"Development of an ALK2-Biased BMP Type
I Receptor Kinase Inhibitor", ACS CHEMICAL
BIOLOGY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY,
WASHINGTON, DC, US, vol. 8, no. 6, 1 June
2013 (2013-06-01), pages 1291-1302, XP009187174,
ISSN: 1554-8929, DOI: 10.1021/CB300655W,
abstract, page 1296, left-hand column, last paragraph -
right-hand column, paragraph 1

WO-A1-2013063536

WO-A2-2008097541

FREDERICK S. KAPLAN ET AL.:
"From mysteries to medicines: drug development
for fibrodysplasia ossificans progressive",
EXPERT OPINION ON ORPHAN DRUGS,
vol. 1, no. 8, 1 August 2013
(2013-08-01), pages 637-649, XP055228116, DOI:
10.1517/21678707.2013.825208, page 640, right-
hand column, paragraph 3 - page 641, right-hand
column, paragraph 1

US-A1-2013041017

J. BAGAROVA ET AL.: "Constitutively
Active ALK2 Receptor Mutants Require Type
II Receptor Cooperation", MOLECULAR AND
CELLULAR BIOLOGY, vol. 33, no. 12, 15 June
2013 (2013-06-15), pages 2413-2424, XP055228048,
US ISSN: 0270-7306, DOI: 10.1128/MCB.01595-12,
abstract, page 2422, left-hand column, paragraph 2 -
right-hand column, paragraph 2, page 2423, right-hand
column, paragraph 2 - paragraph 3

LOTINUN S. ET AL.: "A soluble activin
receptor Type 11A fusion protein (ACE-011) increases
bone mass via a dual anabolic-antiresorptive effect
in Cynomolgus monkeys", BONE, PERGAMON
PRESS., OXFORD, GB, vol. 46, no. 4, 1 April
2010 (2010-04-01), pages 1082-1088, XP027219195,
ISSN: 8756-3282 [retrieved on 2010-01-18], abstract;
figure 1

J. HAUPT ET AL.: "ACVR1 p.Q207E
causes classic fibrodysplasia ossificans progressive
and is functionally distinct from the engineered
constitutively active ACVR1 p.Q207D variant",
HUMAN MOLECULAR GENETICS, vol. 23,
no. 20, 22 May 2014 (2014-05-22), pages
5364-5377, XP055228377, gb ISSN: 0964-6906, DOI:
10.1093/hmg/ddu255, abstract

S. J. HATSELL ET AL.: "ACVR1R206H
receptor mutation causes fibrodysplasia ossificans
progressive by imparting responsiveness to
activin A", SCIENCE TRANSLATIONAL
MEDICINE, vol. 7, no. 303, 2 September
2015 (2015-09-02), pages 303ra137-303ra137,
XP055229101, Washington, DC ISSN: 1946-6234,
DOI: 10.1126/scitranslmed.aac4358, abstract; figures
5,6 page 5, right-hand column, last paragraph - page 7,
right-hand column, paragraph 1

US-A1-2013122007

US-B2-8309082

US-A1-2015037339

WO-A1-2015152183

(57) Приводится способ лечения прогрессирующей оссифицирующей фибродисплазии (FOP), включающий применение в отношении субъекта с FOP эффективной схемы введения антитела к активину А, в котором антитело содержит вариабельные участки тяжелой и легкой цепей антитела SEQ ID NOS: 1 и 5, SEQ ID NOS: 9 и 13 или SEQ ID NOS: 18 и 17 соответственно. Антитело представляет собой химерное, венированное, гуманизированное или человеческое антитело.

Предпосылки создания изобретения

Прогрессирующая оссифицирующая фибродисплазия (FOP) представляет собой аутосомное доминантное нарушение, характеризующееся ранним началом, эпизодическим и прогрессирующим окостенением скелетных мышц и связанной с ними соединительной ткани. Причиной FOP являются мутации во внутриклеточном домене ACVR1 (ALK2), где в подавляющем большинстве случаев аргинин в положении 206 заменяется на гистидин (R206H) (Pignolo R.J. et al., 2011, Orphanet J. Rare Dis.6:80). ACVR1 - это рецептор 1-го типа костных морфогенетических белков (КМБ). Считают, что мутация R206H, среди прочего, повышает чувствительность данного рецептора к активации и его устойчивость к сайленсингу. Эффективное медикаментозное лечение FOP отсутствует.

Изложение сущности заявленного изобретения

В данном изобретении предлагаются способы лечения прогрессирующей оссифицирующей фибродисплазии (FOP), включающие применение в отношении субъекта с FOP эффективной схемы введения антитела к активину А. В одном из вариантов изобретения антитело содержит переменные участки тяжелой и легкой цепей антитела SEQ ID NOS: 1 и 5, SEQ ID NOS: 9 и 13, или SEQ ID NOS: 18 и 17 соответственно. В другом варианте изобретения антитело представляет собой химерное, венированное, гуманизированное или человеческое антитело. В еще одном варианте изобретения антитело представляет собой интактное антитело. Согласно одному из вариантов изобретения антитело представляет собой человеческое антитело IgG₁ каппа. Также согласно одному из вариантов изобретения, когда антитело содержит переменные участки тяжелой и легкой цепей антитела SEQ ID NOS:1 и 5, SEQ ID NOS:9 и 13, или SEQ ID NOS: 18 и 17 соответственно, антитело представляет собой человеческое антитело IgG₁ каппа.

Краткое описание фигур

На фиг. 1 представлены данные микро-КТ мышей, у которых зарегистрировали эктопический остеогенез через 6 недель после начала введения тамоксифена, получавших и не получавших лечение препаратами ACVR2A-Fc/ACVR2B-Fc. У девяти из десяти контрольных мышей, получавших лечение препаратом mFc (под номерами 1-9), зарегистрировали эктопический остеогенез через 6 недель после введения тамоксифена. Наиболее частой локализацией остеогенеза были задняя конечность, область шеи и грудина. У двух из одиннадцати мышей, получавших лечение препаратами ACVR2A-Fc/ACVR2B-Fc (под номерами 12 и 14), зарегистрировали эктопический остеогенез через 6 недель после введения тамоксифена. Эктопические повреждения костной ткани у данных двух мышей были небольшого размера по сравнению с повреждениями, которые наблюдали в группе лечения препаратом mFc, и оба были локализованы в груди.

На фиг. 2 представлены данные микро-КТ мышей, у которых зарегистрировали эктопический остеогенез через 4 недели после начала введения тамоксифена, получавших или не получавших лечение препаратом LDN212854. Номерами 1-8 обозначены мыши, получавшие комбинацию тамоксифен + несущая среда. Формирование крупных эктопических очагов окостенения зарегистрировали у мышей под номерами 1, 2, 3, 4, 5 и 7, и формирование малых эктопических очагов окостенения - у мышей под номерами 6 и 8. Номерами от 9 до 16 обозначены мыши, получавшие комбинацию тамоксифен + LDN212854. Формирование малых эктопических очагов окостенения зарегистрировали у мышей под номерами 9, 12 и 13. Эктопические очаги окостенения у мышей под номерами 10, 11, 14, 15 или 16 отсутствовали.

На фиг. 3 представлены данные микро-КТ мышей, предрасположенных к эктопическому остеогенезу, получавших лечение антителом к активину А, нерелевантным контрольным антителом соответствующего изотипа и ACVR2A-Fc. Антитело к активину А наиболее эффективно ингибировало образование эктопических очагов окостенения.

На фиг. 4 представлены данные микро-КТ мышей, предрасположенных к эктопическому остеогенезу, получавших лечение антителом к активину А, нерелевантным контрольным антителом соответствующего изотипа и антителом к Acvr2a/Acvr2b. Антитела к активину А и Acvr2a/Acvr2b ингибировали образование эктопических очагов окостенения.

На фиг. 5 представлены данные микро-КТ мышей, склонных к эктопическому остеогенезу, получавших лечение различными дозами антитела к активину А, по сравнению с нерелевантным контрольным антителом соответствующего изотипа. Показана эффективность доз в интервале 1-25 мг/кг, а самая эффективная протестированная доза составила 10 мг/кг.

Определения

Антагонисты обычно поставляют в изолированном виде. Это означает, что чистота препарата антагониста обычно составляет не менее 50 вес.% в отношении примесных белков и других контаминантов, образующихся в ходе производства или очистки, при этом не исключена возможность комбинирования антагониста с избытком фармацевтически приемлемого носителя(ей) или других несущих сред, предназначенных для облегчения использования препарата. Иногда препараты антагонистов характеризуются чистотой по меньшей мере 60, 70, 80, 90, 95 или 99 вес.% в отношении примесных белков и других контаминантов, образующихся в ходе производства или очистки.

Для классификации аминокислотных замен на консервативные или неконсервативные аминокислоты группировали следующим образом: группа I (гидрофобные боковые цепи): met, ala, val, leu, ile; группа

II (нейтральные гидрофильные боковые цепи): cys, ser, thr; группа III (кислые боковые цепи): asp, glu; группа IV (основные боковые цепи): asn, gln, his, lys, arg; группа V (остатки, влияющие на ориентацию цепи): glu, pro; и группа VI (ароматические боковые цепи): trp, tyr, phe. Консервативные замены включают замены аминокислот в рамках того же класса. Неконсервативные замены предполагают замену представителя одного из таких классов на представителя другого класса.

Процент идентичности последовательностей определяется последовательностями антитела, которые максимально выравниваются в соответствии с нумерацией по Кабату для переменного участка или по нумерации ЕС для константного участка. Для других белков идентичность последовательности может определяться при выравнивании последовательностей с использованием таких алгоритмов, как BESTFIT, FASTA и TFASTA в программном обеспечении Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0 (Genetics Computer Group, 575 Science Dr., г. Мэдисон, штат Висконсин), с параметрами пропуска по умолчанию или после изучения и наилучшего выравнивания. После выравнивания, если рассматриваемый участок антитела (например, весь зрелый переменный участок тяжелой или легкой цепи) сопоставляется с тем же участком контрольного антитела, процент идентичности последовательности между участками рассматриваемого и контрольного антитела представляет собой число позиций, занятых одинаковыми аминокислотами в участках рассматриваемого и контрольного антитела, поделенное на общее число выровненных позиций двух участков без учета пропусков, умноженное на 100 для перевода в проценты.

Композиции или способы, "содержащие" один или несколько упомянутых элементов, могут включать в себя другие элементы, специально не упомянутые. Например, композиция, которая содержит антитело, может содержать антитело отдельно или в комбинации с другими ингредиентами.

Гуманизированным антителом называется полученное способами генной инженерии антитело, в котором CDR из не относящегося к человеку антитела "донора" введены в последовательности антитела человеческого "акцептора" (См., например, Queen, патенты США №№ 5530101 и 5585089; Winter, патент США № 5225539; Carter, патент США № 6407213; Adair, патенты США № 5859205 и 6881557; Foote, патент США № 6881557). Акцепторными последовательностями антитела могут быть, например, последовательности зрелого человеческого антитела, композиция таких последовательностей, консенсусная последовательность последовательностей человеческого антитела или последовательность участка зародышевой линии. Таким образом, гуманизированное антитело представляет собой антитело с некоторыми или всеми CDR, которые полностью или по существу взяты от антитела донора, и каркасные последовательности переменного участка и последовательности константных участков, если они присутствуют, полностью или по существу представленные последовательностями человеческого антитела. Аналогичным образом, гуманизированная тяжелая цепь включает по меньшей мере одну, две и, как правило, три CDR, которые полностью или по существу взяты от тяжелой цепи антитела донора, и каркасную последовательность переменного участка тяжелой цепи и константный участок тяжелой цепи, если они присутствуют, по существу представленные каркасными последовательностями человеческого переменного участка тяжелой цепи и последовательностями константного участка. Аналогичным образом, гуманизированная легкая цепь включает по меньшей мере одну, две и, как правило, три CDR, которые полностью или по существу взяты от легкой цепи антитела донора, и каркасную последовательность переменного участка легкой цепи и константный участок легкой цепи, если они присутствуют, по существу представленные каркасными последовательностями человеческого переменного участка легкой цепи и последовательностями константного участка. Кроме нанотел и dAb, гуманизированное антитело содержит гуманизованную тяжелую цепь и гуманизованную легкую цепь. CDR в гуманизованном антителе взята по существу от соответствующей CDR в антителе, не относящемся к человеку, где по меньшей мере 85, 90, 95 или 100% соответствующих остатков (определяемых по Кабату) идентичны для соответствующих CDR. Каркасные последовательности переменного участка цепи антитела или константного участка цепи антитела по существу взяты из каркасной последовательности человеческого переменного участка или человеческого константного участка соответственно, где по меньшей мере 85, 90, 95 или 100% соответствующих остатков, определяемых по Кабату, идентичны.

Несмотря на то что гуманизированные антитела часто включают все шесть CDR (предпочтительно определяемых по Кабату) от мышиного антитела, они могут также получаться с менее чем всеми CDR (например, по меньшей мере 3, 4 или 5 CDR от мышиного антитела) (например, Pascalis et al., *J. Immunol.* 169: 3076, 2002; Vajdos et al., *Journal of Molecular Biology*, 320: 415-428, 2002; Iwahashi et al., *Mol. Immunol.* 36: 1079-1091, 1999; Tamura et al., *Journal of Immunology*, 164: 1432-1441, 2000).

Химерным антителом называется антитело, в котором зрелые переменные участки легкой и тяжелой цепей не относящегося к человеку антитела (например, мышиного) объединены с константными участками человеческой легкой и тяжелой цепей. Такие антитела по существу или полностью сохраняют специфичность связывания мышиного антитела и содержат около двух третей человеческой последовательности.

Венирированным антителом называют такой тип гуманизованного антитела, в котором сохраняются некоторые и обычно все CDR и некоторые из каркасных остатков не относящегося к человеку переменного участка не относящегося к человеку антитела, но с заменой других каркасных остатков переменного участка, которые могут входить в эпитопы В- или Т-клеток, например открытых остатков (Pad-

lan, *Mol. Immunol.* 28: 489, 1991), с остатками в соответствующих положениях последовательности человеческого антитела. В результате получается антитело, в котором CDR полностью или по существу взяты от не относящегося к человеку антитела, а каркасы вариабельных участков не относящегося к человеку антитела в большей степени гуманизируются за счет замен.

Человеческое антитело может быть получено от человека или же получено иным образом в результате экспрессии генов человеческого иммуноглобулина (например, в организме трансгенной мыши, *in vitro* или с помощью фагового дисплея). К способам получения человеческих антител относится методика триом из работ Oestberg et al., *Cys muoma* 2: 361-367 (1983); Oestberg, патент США № 4634664; и Engleman et al., патент США № 4634666. Моноклональные антитела могут также вырабатываться трансгенными мышами, несущими гены иммунной системы человека, например мышью VelocImmune®, поставляемой Regeneron Pharmaceuticals, Inc. (Murphy, *PNAS* 111 no. 14, 5153-5158 (2014), Xenomouse, Jakobovits, *Nature Biotechnology* 25, 1134-1143 (2007), или мышью HuMAb, поставляемой Medarex, Inc. (Lonberg, *Handbook Exp. Pharmacol.* 181, 69-97 (2008); Lonberg et al., WO 93/12227 (1993); патенты США №№ 5877397, 5874299, 5814318, 5789650, 5770429, 5661016, 5633425, 5625126, 5569825, 5545806, *Nature* 148, 1547-1553 (1994), *Nature Biotechnology* 14, 826 (1996), Kucherlapati, WO 91/10741 (1991). Человеческие антитела можно также получать с помощью методик фагового дисплея (см., например, Dower et al., WO 91/17271 и McCafferty et al., WO 92/01047, патенты США №№ 5877218, 5871907, 5858657, 5837242, 5733743 и 5565332).

Если указывается, что антагонист сохраняет свойства родительского антитела, из которого он был получен, такое сохранение свойств может быть полным или частичным. Полное сохранение активности означает, что активность антагониста идентична в пределах экспериментальной ошибки или больше активности молекулы, из которой он был получен. Частичное сохранение активности означает, что активность значительно превышает фоновый уровень отрицательного контроля (т.е. выше экспериментальной ошибки) и предпочтительно составляет по меньшей мере 50% соответствующей активности молекулы, из которой он был получен.

Два антитела имеют один и тот же эпитоп, если все аминокислотные мутации в антигене, которые снижают или блокируют связывание одного антитела, также снижают или блокируют связывание другого. Два антитела имеют перекрывающиеся эпитопы, если некоторые аминокислотные мутации, которые снижают или блокируют связывание одного антитела, также снижают или блокируют связывание другого.

Конкуренция между антителами определяется с помощью анализа, в ходе которого анализируемое антитело ингибирует специфическое связывание контрольного антитела с общим антигеном (см., например, Junghans et al., *Cancer Res.* 50:1495, 1990). Анализируемое антитело конкурирует с контрольным антителом, если избыток анализируемого антитела (например, по меньшей мере 2×, 5×, 10×, 20× или 100×) ингибирует связывание контрольного антитела на по меньшей мере 50%, но предпочтительно 75, 90 или 99% по результатам измерения анализа конкурентного связывания. Антитела, идентифицированные с помощью конкурентного анализа (конкурирующие антитела), включают антитела, связывающиеся с тем же эпитопом, что и контрольное антитело, и антитела, связывающиеся с соседним эпитопом, достаточно близким к эпитопу, связанному с контрольным антителом, чтобы создавать стерические препятствия.

Подробное описание

I. Общее описание

Приводятся способы лечения прогрессирующей оссифицирующей фибродисплазии (FOP). К таким способам относится применение для субъекта, страдающего FOP, эффективной схемы введения антагониста рецептора активина типа 2A (ACVR2A), и/или рецептора активина типа 2B (ACVR2B), и/или антагониста рецептора активина типа 1 (ACVR1), и/или антагониста активина А. К таким антагонистам относятся слитые белки, содержащие один или более внеклеточных доменов (ECD) ACVR2A, ACVR2B и/или ACVR1 и домен Fc тяжелой цепи иммуноглобулина. Также приводятся антитела-антагонисты для ACVR2A, ACVR2B, ACVR1 или активина А.

II. ACVR1, ACVR2A, ACVR2B и активин А

К суперсемейству лигандов трансформирующего фактора роста β (TGFP) относятся, например, костные морфогенетические белки (BMP) и факторы роста и дифференциации (GDF). Рецепторами для этих лигандов являются гетеромерные рецепторные комплексы, сформированные из трансмембранных рецепторов серин/треонинкиназы типа I и типа II. К примерам рецепторов типа I относятся рецепторы активина типа IA (ACTRIA, ACVR1 или ALK2), рецептор BMP типа IA и рецептор BMP типа III. К примерам рецепторов типа II относятся рецепторы активина типа IIA и IIB (ACTRIIA, или ACVR2A и ACTRIIB, или ACVR2B) и рецептор BMP типа II. Лиганды суперсемейства TGFP в каждом случае отличаются различной аффинностью к различным рецепторам типа I и типа II.

В обоих случаях рецепторы типа I и типа II содержат внеклеточный домен связывания лигандов (ECD) и внутриклеточный домен серин/треонинкиназы. Кроме того, рецепторы типа I содержат область, насыщенную глицином/серином (GS-блок), которая предшествует домену киназы, и петлю L45 в преде-

лах домена киназы. Оба рецептора действуют совместно для лигандов, активирующих последующие сигнальные пути, например, сигнальные пути Smad и не связанные со Smad сигнальные пути. Активация включает связывание лиганда, лиганд-рецепторную олигомеризацию и трансфосфорилирование блока GS рецептора типа I киназой рецептора типа II. Киназа рецептора типа II конститутивно активна и участвует в связывании лиганда и активации рецептора типа I.

ACVR1, также известный как рецептор активина типа I, ACVR1A, ACVRLK2 или ALK2, является рецептором типа I для суперсемейства лигандов TGF β . ACVR1 обладает активностью серин/треонинкиназы и фосфорилирует белки Smad и активирует последующие сигнальные пути. ACVR1 обнаруживается во многих тканях организма, в том числе в скелетной мускулатуре и хрящевой ткани, и помогает контролировать рост и развитие костей и мышц. Как описано в других разделах настоящего документа, определенные мутации в гене ACVR1 вызывают FOP. К примерам активности ACVR1 относится способность связываться с лигандами, способность образовывать комплексы с рецептором типа II или способность активировать последующие сигнальные пути, например путь Smad.

ACVR2 также известен как рецептор активина типа II для суперсемейства лигандов TGF β . Существует по меньшей мере два рецептора ACVR2, например рецептор активина типа IIA (ACVR2A или AC-TRIIA) и рецептор активина типа IIB (ACVR2B или AC-TRIIB). Ссылка на ACVR2 включает любой или оба из ACVR2A и ACVR2B. Экспрессия ACVR2A и ACVR2B может происходить во множестве тканей, в том числе в скелетной мускулатуре, желудке, сердце, эндометрии, яичках, простате, яичниках и нервных тканях.

При связывании лиганда рецептор ACVR2 образует комплекс с рецептором типа I, например ACVR1, и фосфорилирует блок GS рецептора типа I, тем самым усиливая киназную активность рецептора типа I. К примерам активности ACVR2A и ACVR2B относится способность связываться с лигандами, способность образовывать комплексы с рецептором типа I или способность фосфорилировать рецептор типа I.

Пример формы человеческого ACVR2A имеет учетный номер P27037 в Swiss Prot. Остатки 1-19 представляют собой сигнальный пептид, остатки 20-135 являются внеклеточным доменом, остатки 59-116 представляют собой домен рецепторов активина типов I и II, остатки 136-161 представляют собой трансмембранный домен и остатки 162-513 являются цитоплазматическим доменом. Примеру формы человеческого ACVR2B присвоен номер Q13705 в Swiss Prot. Остатки 1-18 представляют собой сигнальную последовательность, остатки 19-137 являются внеклеточным доменом, остатки 27-117 представляют собой домен рецепторов активина типов I и II, остатки 138-158 представляют собой трансмембранный домен, и остатки 159-512 являются цитоплазматическим доменом. Пример формы человеческого ACVR1 имеет учетный номер Q04771 в Swiss Prot. Остатки 1-20 представляют собой сигнальную последовательность, остатки 21-123 являются внеклеточным доменом, остатки 33-104 представляют собой домен рецепторов активина типов I и II, остатки 124-146 представляют собой трансмембранный домен, и остатки 147-509 являются цитоплазматическим доменом. Ссылка на любой из ACVR1, ACVR2A и ACVR2B включает такие примеры форм, их известные изоформы и полиморфизмы, например, приведенные в базе данных Swiss Prot, родственные формы других видов и другие варианты по меньшей мере с 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью последовательности с примером формы.

Остатки форм ACVR2A, ACVR2B и ACVR1, кроме приведенных выше примеров последовательностей, нумеруются с максимальным выравниванием с соответствующими примерами последовательностей, так что выровненным остаткам присваивается один и тот же номер. Замены из примеров последовательностей могут быть консервативными или неконсервативными. Ссылка на ACVR1, ACVR2A или ACVR2B также включает интактные внеклеточные домены (например, остатки 20-135, 19-137 или 21-123 ACVR2A, ACVR2B и ACVR1 соответственно) или их часть, не содержащую или по существу не содержащую трансмембранную и цитоплазматическую часть. Части внеклеточного домена сохраняют достаточно остатков интактного внеклеточного домена, чтобы связывать по меньшей мере один лиганд или контррецептор, который связывает интактный внеклеточный домен, и тем самым выступать в качестве антагониста соответствующего рецептора (например, остатки 59-116, 27-117 или 33-104 ACVR2A, ACVR2B и ACVR1 соответственно).

Активин А в организме человека может существовать в форме гомо- или гетеродимерного белка. Гомодимерный белок содержит гомодимерную пару субъединицы бета А. Гетеродимерный белок содержит бета-субъединицу и субъединицу бета В, бета С или бета Е (т.е. бета А бета В, бета А бета С или бета А бета Е). Каждая из субъединиц экспрессируется как полипептиды-предшественники, в том числе сигнальный пептид, пропептид и зрелый полипептид. Примером формы предшественника человеческой субъединицы бета А является полипептид длиной 426 аминокислот с номером P08476 в Swiss Prot, в котором остатки 1-20 являются сигнальным пептидом, остатки 21-310 являются пропептидом, а остатки 311-426 представляют собой зрелый полипептид. Пример формы предшественника человеческой субъединицы бета В имеет номер P09529 в Swiss Prot, в котором остатки 1-28 являются сигнальным пептидом, остатки 29-292 являются пропептидом, а остатки 293-407 представляют собой зрелый полипептид. Пример формы предшественника человеческой субъединицы бета С имеет номер P55103 в Swiss Prot, в котором остатки 1-18 являются сигнальным пептидом, остатки 19-236 являются пропептидом, а остатки

237-352 представляют собой зрелый полипептид. Пример формы предшественника человеческой субъединицы бета Е имеет номер P58166 в Swiss Prot, в котором остатки 1-19 являются сигнальным пептидом, остатки 20-236 являются пропептидом, а остатки 237-350 представляют собой зрелый полипептид. Известны несколько вариантов таких последовательностей, которые описаны в базе данных Swiss Prot. Ссылка на активин А включает любой из гомодимера бета А, гетеродимерных форм бета А бета В, бета А бета С и бета А бета Е, а также их субъединиц, а также их предшественников, в которых субъединицы связаны с пропептидом и/или сигнальным пептидом, которые определяются приведенными в Swiss Prot примерами последовательностей или другими существующими в природе человеческими формами этих последовательностей. Активин А передает сигнал посредством связывания с ACVR2A или ACVR2B, но нет данных о том, что он является лигандом для ACVR1.

III. Антагонисты ACVR1, ACVR2A, ACVR2B

Для лечения FOP предлагаются антагонисты рецепторных белков типа I ACVR1 и рецепторных белков типа II ACVR2 (например, ACVR2A и/или ACVR2B). Такие антагонисты среди прочих механизмов могут воздействовать на рецепторы напрямую посредством связывания с рецептором (как в случае антитела к ACVR1, ACVR2A или ACVR2B) или непрямым образом посредством связывания с лигандом или контррецептором и ингибирования связывания лиганда или контррецептора с ACVR1, ACVR2A или ACVR2B (как в случае слитого белка ACVR1, ACVR2A или ACVR2B). Антагонисты ACVR2A и ACVR2B могут также связываться с активинном А.

Антагонист ACVR1, ACVR2A или ACVR2B, приведенный в настоящем документе, может ингибировать или снижать активность ACVR1, ACVR2A и/или ACVR2B на по меньшей мере 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 99% или больше по отношению к контрольной клетке или модели животных, которые не получали антагонист.

В способах лечения FOP может использоваться любой антагонист ACVR1, ACVR2A или ACVR2B. Антагонист может представлять собой, например, полипептид ACVR1, ACVR2A или ACVR2B, например внеклеточный домен, антитело-антагонист или малую молекулу-ингибитор.

А. Внеклеточные домены полипептидов ACVR1, ACVR2A и ACVR2B

К антагонистам относятся белки ACVR1, ACVR2A и ACVR2B и их фрагменты, эффективные для ингибирования по меньшей одной из форм активности ACVR1, ACVR2A и ACVR2B соответственно. Такие антагонисты, как правило, содержат внеклеточный домен ACVR1, ACVR2A или ACVR2B или его часть. Предпочтительно, такие внеклеточные домены полностью или по существу не содержат трансмембранных и цитоплазматических областей (т.е. все сохраняющиеся остатки из этих областей не оказывают значительного влияния на функции внеклеточного домена). Иными словами, компоненты ACVR2A, ACVR2B или ACVR1 таких антагонистов содержат или по существу содержат весь внеклеточный домен ACVR2A, ACVR2B или ACVR1 или его часть, как указано выше. Такие антагонисты обязательно включают другой(ие) компонент(ы), отличающийся(иеся) от ACVR2A, ACVR2B или ACVR1, как более подробно описано ниже. Такие внеклеточные домены, которые не содержат или по существу не содержат трансмембранных и цитоплазматических доменов, являются растворимыми. Такие внеклеточные домены могут функционировать в качестве антагонистов посредством связывания с растворимым лигандом или контррецептором, эффективно конкурируя со связыванием лиганда или контррецептора с рецептором клеточной поверхности ACVR1, ACVR2A или ACVR2B, тем самым модулируя (снижая) доступность лиганда или контррецептора *in vivo*.

Растворимые внеклеточные домены могут первоначально экспрессироваться с сигнальной последовательностью, которая отщепляется в процессе экспрессии. Сигнальная последовательность может представлять собой нативную сигнальную последовательность ACVR1, ACVR2A или ACVR2B, например, подобную описанную в патенте США № 7,709,605, который полностью включен в настоящий документ путем ссылки, или может представлять собой сигнальную последовательность другого белка, например пчелиного мелитина (НВМ) или тканевого активатора пламиногена (ТРА). В альтернативном варианте осуществления растворимые внеклеточные полипептиды ACVR1, ACVR2A или ACVR2B могут синтезироваться или экспрессироваться без сигнальной последовательности.

ECD или лиганд-связывающие домены ACVR1, ACVR2A и ACVR2B отличаются высоким уровнем консервативности среди многих видов, включая мышей и человека. ECD содержат богатую цистеином область и область С-конца. ECD ACVR1, ACVR2A и ACVR2B связывается с разнообразной группой лигандов семейства TGFP, в том числе, например, с активинном А, миостатином (GDF-8), GDF-11 и BMP. См., например, Souza et al. (2008) *Molecular Endocrinology* 22(12): 2689-2702.

Примеры полипептидов ACVR2A и ACVR2B и растворимых полипептидов ACVR2A и ACVR2B включают раскрытые в патенте США № 7842633, патенте США № 7960343 и патенте США № 7709605, каждый из которых полностью включен в настоящий документ путем ссылки.

ECD полипептидов ACVR1, ACVR2A или ACVR2B может мутировать, так что вариант полипептида обладает измененными свойствами связывания лиганда (например, специфичностью или аффинностью связывания). Некоторые варианты полипептидов ACVR1, ACVR2A или ACVR2B отличаются измененной аффинностью связывания (например, повышенной или пониженной) со специфическим лигандом.

Варианты характеризуются по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99%-ной идентичностью последовательности с существующими в природе последовательностями ACVR1, ACVR2A или ACVR2B и сохраняют биологическую активность, а значит, обладают активностью ACVR1, ACVR2A и ACVR2B, как описано в других разделах настоящего документа. Активные варианты и фрагменты ACVR2A и ACVR2B описаны, например, в патенте США № 7842633, патенте США № 7960343 и патенте США № 7709605, каждый из которых полностью включен в настоящий документ путем ссылки.

Методики анализа для оценки активности ACVR1, ACVR2A или ACVR2B раскрыты, например, в патенте США № 7842633, патенте США № 7960343 и патенте США № 7709605. Например, может проводиться скрининг полипептидных вариантов ACVR1, ACVR2A или ACVR2B с точки зрения их способности связывать лиганд или способности препятствовать связыванию лиганда с рецепторным белком ACVR1, ACVR2A или ACVR2B.

В. Слитые белки

Описанные выше полипептиды ACVR1, ACVR2A и ACVR2B могут экспрессироваться как слитые белки, включающие по меньшей мере часть полипептида ACVR1, ACVR2A и/или ACVR2B и один или более доменов слияния.

Домены слияния включают константный участок тяжелой цепи иммуноглобулина (Fc), человеческий сывороточный альбумин (ЧСА), глутатион-S-трансферазу (GST), белок А, белок G или любой домен слияния, который может использоваться для стабилизации, сольюбилизации, выделения или мультимеризации слитого белка.

Домен Fc тяжелой цепи иммуноглобулина является предпочтительным доменом для слитых белков. Слияния с частью Fc иммуноглобулина придают желаемые фармакокинетические свойства широкому кругу белков (например, повышают стабильность и/или период полувыведения белка из сыворотки). Таким образом, в изобретении предлагаются слитые белки, содержащие по меньшей мере один ECD ACVR1, ACVR2A и/или ACVR2B, слитый с доменом Fc иммуноглобулина.

Домен Fc для использования в способах настоящего изобретения может быть взят от любого иммуноглобулина. Может использоваться любой из классов иммуноглобулина, в том числе IgG, IgA, IgM, IgD и IgE. В классе IgG существуют различные подклассы или изоформы, в том числе, например, IgG₁, IgG₂, IgG₃ и IgG₄. В одном из вариантов осуществления слитый белок Fc содержит домен Fc молекулы IgG. В дополнительном варианте осуществления домен Fc взят из молекулы IgG₁. Молекула иммуноглобулина может быть получена от любого животного, в том числе, например, млекопитающего, грызуна, человека, мыши, крысы, хомяка или кролика. В одном варианте осуществления домен Fc иммуноглобулина получен от млекопитающего. В другом варианте осуществления домен Fc получен от человека. В еще одном варианте осуществления домен Fc получен от грызуна, например мыши или крысы. В конкретном варианте осуществления домен Fc слитого белка взят из человеческого IgG₁.

Слитые белки Fc, приведенные в настоящем документе, могут быть приготовлены любым способом, известным специалистам в области. Слитые белки Fc могут содержать, по меньшей мере, области CH2 и CH3 и, как правило, по меньшей мере часть шарнирной области. Несмотря на возможное присутствие области CH1, в слитых белках она, как правило, опускается.

Слияние может производиться в любом сайте в пределах части Fc константного домена иммуноглобулина. Слияния могут проводиться с С-концом части Fc константного домена или непосредственно связыванием N-конца с областью CH1 тяжелой цепи. Конкретные сайты могут выбираться для оптимизации биологической активности, секреции или параметров связывания слитого белка Fc.

В некоторых случаях нуклеиновая кислота, кодирующая ECD ACVR1, ACVR2A и/или ACVR2B, сливается посредством С-конца с нуклеиновой кислотой, кодирующей N-конец последовательности константного домена иммуноглобулина. В других случаях возможны также слияния на N-конце. Существует также возможность слияния ECD ACVR1, ACVR2A и/или ACVR2B с N-концом и С-концом последовательности константного домена иммуноглобулина.

Для проведения слияний иммуноглобулина см. также патент США № 5428130, патент США № 5843725, патент США № 6018026 и WO 2005/070966, каждый из которых включен в настоящий документ путем ссылки.

Слитый белок может получаться, например, посредством рекомбинантной экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей слитый белок. Например, слитый белок может быть получен слиянием нуклеиновой кислоты, кодирующей ECD ACVR1, ACVR2A и/или ACVR2B, с нуклеиновой кислотой, кодирующей домен Fc. Нуклеиновая кислота ECD ACVR1, ACVR2A и/или ACVR2B может быть слита с N-концом нуклеиновой кислоты, кодирующей домен F, или может быть слита с С-концом гена, кодирующего домен Fc. В альтернативном варианте осуществления ECD может сливаться с любым положением в домене Fc.

Слитые белки ECD могут также включать линкер. В случае слитых белков Fc линкер может располагаться между ECD ACVR1, ACVR2A или ACVR2B и доменом Fc, необязательно замещая частично или полностью шарнирную область. Линкер может представлять собой 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 50 или больше аминокислот, которые в целом не имеют вторичной структуры. Линкер может быть насыщен глициновыми и пролиновыми остатками и может, например, содержать повторяющиеся после-

довательности треонина/серина и глицинов (например, повторы TG₄ или SG₄).

Два или более слитых белков ECD-Fc могут соединяться вместе линкером. В таких случаях линкер может располагаться между ECD или линкер может располагаться между доменами Fc, чтобы вместе соединять слитые белки. Например, могут быть соединены вместе 1, 2, 3, 4 или более слитых белков Fc и ACVR1, ACVR2A и/или ACVR2B.

Примеры слитых белков ECD ACVR2A и/или ACVR2B были описаны ранее, например, раскрыты в патенте США № 7842633, патенте США № 7960343 и патенте США № 7709605, каждый из которых полностью включен в настоящий документ путем ссылки.

Один из примеров антагониста ACVR2A известен как сотатерцепт (также называемый ACE-011). Сотатерцепт содержит ECD ACVR2A, слитый с доменом Fc человеческого IgG₁, и подробно описан в работе Carrancio et al. (2014) *British J Haematology*. 165(6): 870-872, полностью включенной в настоящий документ путем ссылки.

Один из примеров антагониста ACVR2B известен как ACE-031. ACE-031 содержит ECD ACVR2B, слитый с доменом Fc человеческого IgG₁, и подробно описан в работе Sako et al., (2010) *J. Biol. Chem.* 285(27): 21037-21048, полностью включенной в настоящий документ путем ссылки.

Известны примеры слитых белков с ECD ACVR1, например, раскрытые в работе Berasi, et al. (2011) *Growth Factors*, 29(4): 128-139; полностью включенной в настоящий документ путем ссылки.

С. Слитые белки с гибридным ECD

Также предлагаются антагонисты на основе слитых белков с гибридным или мультиспецифическим ECD. Слитые белки с гибридным ECD могут содержать комбинацию из двух или более ECD ACVR1, ACVR2A и/или ACVR2B. Например, слитые белки могут содержать 1, 2, 3, 4 или более молекул ECD ACVR1, ACVR2A и/или ACVR2B. В одном из вариантов осуществления антагонист содержит ECD ACVR2A, соединенный с ECD ACVR2B. В дополнительном варианте осуществления антагонист дополнительно содержит домен Fc.

В одном из вариантов осуществления слитый белок может содержать одну или более молекул ECD ACVR2A и одну или более молекул ECD ACVR2B. В другом варианте осуществления слитый белок может содержать одну или более молекул ECD ACVR1 и одну или более молекул ECD ACVR2A. В другом варианте осуществления слитый белок может содержать одну или более молекул ECD ACVR1 и одну или более молекул ECD ACVR2B.

В одном из вариантов осуществления слитый белок содержит один или более слитых белков ECD ACVR2A и Fc и один или более слитых белков ECD ACVR2B и Fc, которые связаны вместе в комплексе. В другом варианте осуществления слитый белок содержит один или более слитых белков ECD ACVR1 и Fc и один или более слитых белков ECD ACVR2A и Fc, которые связаны вместе в комплексе. В другом варианте осуществления слитый белок содержит один или более слитых белков ECD ACVR1 и Fc и один или более слитых белков ECD ACVR2B и Fc, которые связаны вместе в комплексе. В таких случаях слитые белки могут связываться вместе через свои домены Fc, например, посредством по меньшей мере одной дисульфидной связи или последовательностью линкера. В альтернативном варианте осуществления участки ECD слитых белков могут соединяться вместе последовательностью линкера.

В одном варианте осуществления антагонист содержит ECD ACVR2A, слитый с первым доменом Fc, и ECD ACVR2B, слитый со вторым доменом Fc. В таких случаях домены Fc могут быть связаны в комплексе друг с другом. В других вариантах осуществления антагонист содержит линкер между ECD ACVR2A и ECD ACVR2B, каждый из которых слит с Fc-доменом.

Слитые белки могут быть сконструированы таким способом, чтобы образовывать антагонисты ACVR1, ACVR2A и/или ACVR2B в тандемном формате. В одном из вариантов осуществления слитый белок содержит два или более ECD ACVR1, ACVR2A и/или ACVR2B в тандеме, после чего следует домен Fc. В некоторых случаях организованные в тандеме ECD разделены последовательностью линкера. Такой тандемный слитый белок может содержать 1, 2, 3, 4 или более ECD ACVR1, ACVR2A и/или ACVR2B.

Д. Антитела-антагонисты

К антагонистам ACVR1, ACVR2A или ACVR2B относятся антитела к (иными словами специфически связывающиеся с) любым из таких рецепторов, предпочтительно антитела, содержащие эпитоп в пределах внеклеточного домена. Специфическое связывание того или иного антитела или слитого белка с его мишенью-антигеном означает аффинность по меньшей мере 10⁶, 10⁷, 10⁸, 10⁹ или 10¹⁰ M⁻¹. Специфическое связывание обнаруживаемым образом выше по величине и отличается от неспецифического связывания с по меньшей мере одной посторонней мишенью. Способы получения антител известны специалистам в области. См., например, работы Kohler & Milstein (1975) *Nature* 256: 495-497 и Harlow & Lane (1988) *Antibodies: a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, NY.

Может использоваться любое антитело, которое ингибирует или снижает активность ACVR1, ACVR2A и/или ACVR2B (например, антитело-антагонист). К таким антителам для ACVR2A и ACVR2B относятся, например, антитела, раскрытые в патенте США № 8486403, патенте США № 8128933, WO 2009/137075 и Lach-Trifilieff, et al. (2014) *Mol. Cell Biol.* 34(4): 606-618, каждый из этих документов полностью включен в настоящий документ путем ссылки. Включаются гуманизированные, химерные и ве-

нированные формы любых из перечисленных антител, а также антитела, конкурирующие за связывание с ними.

В одном варианте осуществления антитело представляет собой антитело к ACVR2A. В другом варианте осуществления антитело представляет собой антитело к ACVR2B. В других вариантах осуществления антителом может быть биспецифическое антитело к ACVR2A и ACVR2B. В другом варианте осуществления антитело представляет собой антитело к ACVR1. В других вариантах осуществления антителом может быть биспецифическое антитело к ACVR1 и ACVR2A или к ACVR1 и ACVR2B.

Термин "антитело" включает интактные антитела с двумя парами тяжелой и легкой цепей, фрагменты антитела, которые могут связывать антиген (например, Fab, F(ab')₂, Fv, одноцепочечные антитела, диатела, химеры антител, гибридные антитела, биспецифические антитела, гуманизированные антитела и пр.), а также рекомбинантные пептиды, содержащие перечисленное выше.

Термин "фрагменты антитела" относится к части интактного антитела, предпочтительно к антиген-связывающему или вариабельному участку интактного антитела. К примерам фрагментов антитела относятся фрагменты Fab, F(ab')₂ и Fv; диатела; линейные антитела (Zapata et al. (1995) *Protein Eng.* 10: 1057-1062); молекулы одноцепочечных антител и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

Антитело может быть моноклональным или поликлональным. Термин "моноклональное антитело" относится к антителу, полученному из популяции по существу гомогенных антител, т. е. отдельные антитела, образующие популяцию, идентичны, если не учитывать возможные природные мутации, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела часто высокоспецифичны, направлены против единственного антигенного сайта. Кроме того, в отличие от обычных (поликлональных) препаратов антител, которые, как правило, содержат различные антитела, направленные против различных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело, как правило, направлено против единственной детерминанты в антигене. Определение "моноклональное" указывает на характеристику антитела, которое было получено из по существу гомогенной популяции антител, например, подобно продуцируемому клональной популяцией В-клеток, и не требует продукции антитела любым конкретным способом.

Моноклональные антитела, которые будут использоваться в соответствии со способами, приведенными в настоящем документе, могут быть получены с помощью гибридного способа, впервые описанного в работе Kohler et al. (1975) *Nature* 256:495, или с использованием его модификаций. Как правило, животное, например мышь, иммунизируют раствором, содержащим антиген (например, полипептид ACVR1, ACVR2A и/или ACVR2B или активин А, в частности внеклеточный домен (в рецепторах) или его часть).

Иммунизацию можно выполнять посредством смешивания или эмульгирования содержащего антиген раствора в физиологическом растворе, предпочтительно в полном адъюванте Фрейнда, и последующей парентеральной инъекции смеси или эмульсии. После иммунизации животного его селезенку (и дополнительно несколько крупных лимфатических узлов) удаляют и разделяют на отдельные клетки. Скрининг клеток селезенки можно проводить посредством нанесения суспензии клеток на планшет или в лунки, покрытые представляющим интерес антигеном. В-клетки, экспрессирующие мембраносвязанный иммуноглобулин, специфичный для антигена, связываются на планшете и не смываются. Полученные В-клетки или все диссоциированные клетки селезенки затем индуцируют для слияния с клетками миеломы с образованием гибридом и культивируют в селективной среде. Полученные клетки высевают при последовательном разбавлении и анализируют на предмет продукции антител, которые специфически связываются с представляющим интерес антигеном (и которые не связываются с посторонними антигенами). Отобранные гибридомы, секретирующие моноклональное антитело (mAb), затем культивируют *in vitro* (например, во флаконах для культивирования тканей или в ферментерах с системой полых волокон) или *in vivo* (как в случае асцита у мышей).

В альтернативном варианте осуществления моноклональные антитела могут быть получены с помощью способов рекомбинантной ДНК (см., например, патент США № 4816567). Моноклональные антитела могут быть также выделены из фаговых библиотек антител с использованием технологий, описанных, например, в работах Clackson et al. (1991) *Nature* 352:624-628; Marks et al. (1991) *J. Mol. Biol.* 222:581-597 и патенте США № 5514548.

Термин "антитела" включает химерные, венированные, гуманизированные и человеческие моноклональные антитела к любому из ACVR1, ACVR2A, ACVR2B и активину А в соответствии с приведенным выше определением.

В зависимости от аминокислотной последовательности константного домена своих тяжелых цепей иммуноглобулины могут подразделяться на различные классы. Существует пять основных классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, а некоторые из них могут дополнительно подразделяться на подклассы (изоотипы), например IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂. Константные домены тяжелой цепи, которые соответствуют различным классам иммуноглобулинов, обозначаются как альфа, дельта, эпсилон, гамма и мю соответственно. Структуры субъединиц и трехмерные конфигурации различных классов иммуноглобулинов хорошо известны.

Рассматриваемые в настоящем документе моноклональные антитела или слитые белки Fc могут относиться к любым разнообразным классам антител. В одном варианте осуществления моноклональное антитело относится к антителу класса IgG. В других вариантах осуществления моноклональное антитело может относиться к классам IgM, IgE, IgD или IgA. В конкретных вариантах осуществления антитело имеет изотип IgG, например IgG₁, IgG₂, IgG₃ или IgG₄, в частности человеческий IgG₁, IgG₂, IgG₃ или IgG₄.

Одна или несколько аминокислот на amino-конце или карбоксильном конце легкой и/или тяжелой цепи, например лизин на C-конце тяжелой цепи, может отсутствовать или присутствовать в замещенной форме в части молекул или во всех молекулах. Замены могут производиться в константных участках для ослабления или усиления эффекторной функции, например опосредованной комплементом цитотоксичности или ADCC (см., например, Winter et al., патент США № 5624821; Tso et al., патент США № 5834597 и Lazar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103: 4005, 2006), или для увеличения периода полужизни у человека (см., например, Hinton et al., J. Biol. Chem. 279:6213, 2004). Примеры замен включают Gln в положении 250 и/или Leu в положении 428 (нумерация ЕС) для увеличения периода полужизни антитела. Замена в любом из положений 234, 235, 236 и/или 237 снижает аффинность для рецепторов Fcγ, в частности рецептора FcγRI (см., например, патент США № 6624821). Возможны замены в положениях 234, 236 и/или 237 в человеческом IgG₂ на аланин и в положении 235 на глутамин. (См., например, US 5,624,821). Эффекторные функции могут также ослабляться при замене EFLG в положениях 232-236 на PVA (см. WO 14/121087). Возможна замена S в положении 428 на P, в частности, в человеческом IgG₄, чтобы уменьшить обмен между эндогенными и экзогенными иммуноглобулинами. Другие варианты могут предусматривать добавление или удаление сайтов посттрансляционной модификации, например N-связанного гликозилирования на мотивах N-X-S/T. Варианты могут также предусматривать введение выступов (т.е. замену одной или более аминокислот аминокислотами большего размера) или впадин (т.е. замену одной или более аминокислот аминокислотами меньшего размера), чтобы способствовать образованию гетеродимеров между различными тяжелыми цепями для получения биспецифических антител. К примерам замен с образованием пары выступов и впадин относятся T336Y и Y407T соответственно (Ridgeway et al., Protein Engineering vol. 9 no. 7 pp. 617-621, 1996). Варианты могут также включать мутации, которые ослабляют взаимодействие с белком A (например, H435R и Y436F) в нумерации ЕС. Биспецифические антитела, в которых одна тяжелая цепь содержит такие варианты, а другая - не содержит, можно отделять от их родительских антител с помощью аффинной хроматографии с белком A.

Антитела могут также включать антитела, специфически связывающиеся с активином A. Такие антитела могут специфически связываться с любой отдельно взятой или со всеми формами бета A бета A, бета A бета B, бета A бета C и бета A бета E активина A. Некоторые антитела специфически связываются только с одной из перечисленных форм (т.е. бета A бета A, бета A бета B, бета A бета C или бета A бета E). Специфичность для форм бета A бета A, бета A бета B, бета A бета C и бета A бета E может определяться эпитопом в субъединице бета B, бета C или бета E соответственно или для эпитопа, в образовании которого участвуют оба компонента гетеродимера. Специфичность для эпитопа бета A бета может определяться эпитопом, в образовании которого участвуют обе молекулы в гомодимере (например, на интерфайсе субъединиц). Некоторые антитела специфическим образом связываются со всеми такими формами активина A, и в этом случае эпитоп, как правило, находится на субъединице бета A. Антитела, как правило, содержат эпитопы в зрелом полипептидном компоненте белков-предшественников. Некоторые антитела специфическим образом связываются с любыми отдельно взятыми или всеми формами активина A без связывания с человеческим ингибином, который существует в форме гетеродимеров альфа (Swiss Prot P05111) бета A или альфа бета B. Некоторые антитела специфическим образом связываются с любыми отдельно взятыми или со всеми формами активина A и связываются с любой или обеими формами человеческого ингибина. Несмотря на то что принято считать, что такие антитела ингибируют передачу сигнала активина A через один или более его контррецепторов, ACVR2A, и/или ACVR2B, и/или BMPR2, точное представление о механизме не является обязательным для использования таких антител в способах лечения FOP.

Сообщалось о большом числе антител к активину A. Например, в US 2015/00373339 раскрываются человеческие антитела, обозначенные как H4N10423P, H4N10424P, H4N10426P, H4N10429P, H4N10430P, H4N10432P2, H4N10433P2, H4N10436P2, H4N10437P2, H4N10438P2, H4N10440P2, H4N10442P2, H4N10445P2, H4N10446P2, H4N10447P2, H4N10447P2, H4N10448P2, H4N10452P2. В патенте США № 8309082 раскрываются человеческие антитела A1-A14. Мышиные антитела к активину A доступны от нескольких коммерческих поставщиков, например MAB3381 от R&D Systems или 9N16 от Novus Biologicals или MM0074-7L18 (ab89307) AbCam.

Предпочтительные антитела обладают аффинностью к активину A (измеряемой при 25°C, как в примере 3 из US2015/00373339) по меньшей мере 10^8 M^{-1} , 10^9 M^{-1} , 10^{10} M^{-1} , 10^{11} M^{-1} , 10^{12} M^{-1} или 10^{13} M^{-1} . Некоторые антитела обладают аффинностью в интервале 10^9 - 10^{12} M^{-1} . Предпочтительные антитела ингибируют передачу сигнала активина A с IC₅₀ менее 4 нМ и предпочтительно менее 400 или 40 пМ. Некоторые антитела ингибируют передачу сигнала с IC₅₀ в интервале от 4 нМ до 10 пМ или от 3,5 нМ до 35 пМ.

Ингибирование передачи сигнала можно измерять так же, как в примере 6 из US20150037339, который в кратком изложении выглядит следующим образом. Клеточную линию рабдомиосаркомы человека A204 трансфектировали репортерной плазмидой Smad 2/3-люциферазы с получением линии клеток A204/CAGA×12-Luc. Клетки A204/CAGA×12-Luc содержались в среде Мак-Коя 5А с добавлением 10%-ной фетальной бычьей сыворотки, пенициллина/стрептомицина/глутамин и 250 мкг/мл G418. Для биоанализа клетки A204/CAGA×12-Luc высевали на 96-луночный аналитический планшет в концентрации 10 000 клеток на лунку в среде с низким содержанием сыворотки, 0,5% FBS и OPTIMEM, и инкубировали при 37 °С и 5% CO₂ в течение ночи. Активин А последовательно разбавляли в соотношении 1:3 от 100 до 0,002 нМ и добавляли к клеткам, начиная с контроля, не содержащего активина. Антитела последовательно разбавляли в соотношении 1:3, начиная от 100 до 0,002 нМ, от 1000 до 0,02 нМ или от 300 до 0,005 нМ, включая контрольные образцы, либо содержащие соответствующее изотипическое контрольное антитело, либо без антитела, и добавляли к клеткам с постоянной концентрацией 100 пМ активина А.

Некоторые антитела ингибировали связывание активина А к ACVR2A, и/или ACVR2B, и/или BMPR2 по меньшей мере на 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 99%, что оценивалось по результатам экспрессии рецептора клеткой или по слиянию внеклеточного домена с доменом Fc в качестве слитого белка и иммобилизации слитого белка на подложке (например, сенсорном чипе Biacore). В таких измерениях антитело и активин А должны присутствовать в эквимольных количествах, а рецептор или внеклеточный домен - в избытке.

Некоторые антитела связываются с эпитопом в пределах остатков 321-343 или 391-421 активина А полной длины, что соответствует C11-S33 и C81-E111 зрелого белка.

Примером антитела, которое используется в представленных примерах, является антитело, обозначенное как H4H10446P в US2015037339. Его переменный участок тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи имеют аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 162, 164, 166 и 168 соответственно в US2015/0037339 (SEQ ID NO: 1-4 соответственно в настоящем документе). Его переменный участок легкой цепи и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 легкой цепи имеют аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 146, 148, 150 и 152 соответственно в US2015/0037339 (SEQ ID NO: 5-8 соответственно в настоящем документе). H4H10446P ингибирует опосредованную активин А передачу сигнала через ACVR2A и/или ACVR2B, но не ингибирует заметно или вообще не ингибирует связывание активина А с ACR1A или ACVR2B. Сюда же включают другие антитела, конкурирующие с H4H10446P за связывание с человеческим активин А или связывание с тем же эпитопом на человеческом активине А, что и H4H10446P, а также включают его участие в ингибировании сигнала.

Другим примером антитела, которое используется в представленных способах, является антитело, обозначенное как H4H10430P в US 2015037339. Его переменный участок тяжелой цепи и CDRH1, CDRH2 и CDRH3 тяжелой цепи имеют аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 66, 68, 70 и 72 соответственно в US 2015/0037339 (SEQ ID NO: 9-12 соответственно в настоящем документе). Его переменный участок легкой цепи и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 легкой цепи имеют аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 74, 76, 78 и 80 соответственно в US 2015/0037339 (SEQ ID NO: 13-16 соответственно в настоящем документе). Такое антитело ингибирует связывание активина А с ACVR2A и/или ACVR2B и ингибирует передачу сигнала через один или оба таких рецептора. Сюда же включают другие антитела, конкурирующие с H4H10430P за связывание с человеческим активин А или связывание с тем же эпитопом на человеческом активине А, что и H4H10430P, а также включают его свойство ингибировать связывание активина А с ACVR2A и ACVR2B и передачу сигнала через них.

Другим примером антитела для использования в способах настоящего изобретения являются антитела, обозначенные как А1 в патенте США № 8309082, которые отличаются переменными участками тяжелой и легкой цепей с последовательностями SEQ ID NO: 9 и 10 в патенте США № 8309082 (SEQ ID NO: 17 и 18 соответственно в настоящем документе). Его CDR легкой цепи CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют последовательности SEQ ID NO: 11, 12 и 13 соответственно в патенте США № 8309082 (SEQ ID NO: 19-21 соответственно в настоящем документе), а его CDR тяжелой цепи CDRH1, CDRH2 и CDRH3 имеют последовательности SEQ ID NO: 62, 63 и 64 соответственно в патенте США № 8309082 (SEQ ID NO: 22-24 соответственно в настоящем документе). Сюда же включают другие антитела, конкурирующие с H4H10430P за связывание с человеческим активин А или связывание с тем же эпитопом на человеческом активине А, что и H4H10430P, а также включают его свойство ингибировать связывание активина А с ACVR2A и/или ACVR2B и передачу сигнала через них.

Другие антитела могут быть получены мутагенезом кДНК, кодирующей тяжелые и легкие цепи любого из упомянутых выше антител. В сферу охвата настоящего изобретения также включаются моноклональные антитела, которые по меньшей мере на 90, 95 или 99% идентичны любому из упомянутых выше антител по аминокислотной последовательности зрелых переменных участков тяжелой и/или легкой цепи и сохраняют его функциональные свойства и/или которые отличаются от соответствующего антитела небольшим числом функционально непоследовательных аминокислотных замен (например, консервативных замен), делеций или вставок. Также включаются моноклональные антитела, у которых по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5 и предпочтительно все шесть CDR на 90, 95, 99% или 100% идентичны со-

ответствующим CDR любого из приведенных в качестве примера антител. CDRs предпочтительно соответствуют определению по Кабату, но могут определяться с помощью любого альтернативного определения, например по Чотиа, по композитной Кабат-Чотиа, контактному определению или определению AbM (см. ссылку в Интернете bioinf.org.uk/abs).

Е. Малые молекулы-антагонисты

В качестве антагонистов ACVR1, ACVR2A и ACVR2B могут также выступать малые молекулы-антагонисты. Такие малые молекулы-антагонисты могут ингибировать активность ACVR1, ACVR2A, ACVR2B или активина А. К малым молекулам-антагонистам ACVR1, например, относится LDN-212854, описанный в работе Mohedas et al. (2013) ACS Chem. Biol. 8:1291-1302, полностью включенной в настоящий документ путем ссылки.

IV. Скрининговые исследования

Скрининг активности различных антагонистов ACVR1, ACVR2A и/или ACVR2B и их вариантов или фрагментов, приведенных в настоящем документе, может проводиться с использованием разнообразных аналитических подходов. Например, может проводиться скрининг антагонистов ACVR1, ACVR2A и/или ACVR2B и их вариантов на предмет их способности связываться с лигандами или связываться с рецепторами ACVR1, ACVR2A или ACVR2B, их способности ингибировать связывание лиганда с полипептидом ACVR1 и/или ACVR2 и/или их способности ингибировать активность рецепторов ACVR1 или ACVR2.

Активность антагонистов ACVR1 или ACVR2 или их вариантов или фрагментов может проверяться *in vitro* или с помощью анализов с использованием клеток. Хорошо известны проводимые *in vitro* анализы связывания и анализы для оценки ингибирования активности рецепторов. Различные способы измерения активности антагонистов ACVR1, ACVR2A или ACVR2B подробно описаны, например, в патенте США № 7842663, который полностью включен в настоящий документ путем ссылки.

Способность антагониста модулировать образование комплекса между полипептидом ACVR1 или ACVR2 и его связывающим белком может регистрироваться с помощью самых различных методик. Например, модулирование образования комплексов можно количественно оценивать с использованием, например, белков с регистрируемой меткой, например радиоактивно меченных (например, ^{32}P , ^{35}S , ^{14}C или ^3H), флуоресцентно меченных (например, FITC) или ферментативно меченных полипептидов ACVR1 или ACVR2 или их связывающего белка, посредством иммуноанализа или хроматографической регистрации.

Можно отслеживать способность антагонистов ACVR1 или ACVR2 ингибировать передачу сигнала, опосредованную рецептором ACVR1 или ACVR2. Например, эффекты последующей передачи сигнала, например активацию Smad, можно отслеживать с использованием репортерного гена, реагирующего на Smad.

Скрининг активности антагонистов ACVR1 и/или ACVR2 и их вариантов или фрагментов можно проводить с помощью анализа *in vivo*. Например, можно проводить скрининг антагонистов ACVR1 или ACVR2 или их вариантов для выявления их способности лечить FOP в мышинной модели FOP (например, способности снижать эктопический остеогенез). Были выведены трансгенные нокинные мыши с условным аллелем, кодирующим $\text{Acvr1}^{\text{R206H}}$. Такие мыши $\text{Acvr1}^{\text{R206H}/\text{COIN}^+}$ описаны в US 14/207,320 и PCT/US2014/026582, которые полностью включены в настоящий документ путем ссылки. Такой аллель экспрессирует вариант R206H только после активации рекомбиназой Cre. Это обеспечивает Cre-зависимую активацию экспрессии $\text{Acvr1}^{\text{R206H}}$ в специфических тканях и в определенный момент времени за счет использования различных направлений активации Cre. За счет этого полученные мыши также не подвержены перинатальной летальности, которая отмечалась для нерегулируемого нокинного аллеля $\text{Acvr1}^{\text{R206H}}$. Активация экспрессии $\text{Acvr1}^{\text{R206H}}$ у молодых или у взрослых мышей приводит к эктопическому остеогенезу. Например, у мышей $\text{Acvr1}^{\text{R206H}/\text{COIN}^+}; \text{Gt}(\text{ROSA26})\text{Sor}^{\text{CreERT2}/+}$ (где CreERT2 - регулируемая тамоксифеном рекомбиназа (см. Feil et al. (1997) Biochem Biophys Res Commun. 237(3):752-7), которая вводится в локус $\text{Gt}(\text{ROSA26})\text{Sor}$, а потому конститутивно и глобально экспрессируется) после воздействия тамоксифена развивается FOP. Коротко говоря, в отсутствие тамоксифена CreERT2 инактивирована. Тамоксифен активирует экспрессию Cre, которая затем воздействует на $\text{Acvr1}^{\text{R206H}/\text{COIN}^+}$, чтобы преобразовать его в $\text{Acvr1}^{\text{R206H}/+}$, тем самым трансформируя генотип мыши так, чтобы он был зеркальным отражением генотипа пациентов с FOP, у которых присутствует ACVR1[R206H]. Аллель $\text{Acvr1}^{\text{R206H}}$ экспрессирует $\text{Acvr1}^{\text{R206H}}$, и этого достаточно, чтобы вызвать развитие FOP у мышей $\text{Acvr1}^{\text{R206H}/+}; \text{Gt}(\text{ROSA26})\text{Sor}^{\text{CreERT2}/+}$. За счет этого удается избежать летальности эмбрионов, наблюдаемой у обычных нокинных мышей $\text{Acvr1}^{\text{R206H}}$, $\text{Acvr1}^{\text{tm1Emsh}}$ (<http://www.informatics.jax.org/allele/key/828153>). После введения тамоксифена антагонисты ACVR1, ACVR2A и/или ACVR2B или контроль могут вводить мышам $\text{Acvr1}^{\text{R206H}/\text{COIN}^+}; \text{Gt}(\text{ROSA26})\text{Sor}^{\text{CreERT2}/+}$ и осуществлять мониторинг животных на предмет эктопического остеогенеза. См. Chakkalakal SA, et al. (2012) An $\text{Acvr1}^{\text{R206H}}$ knock-in mouse has fibrodysplasia ossificans progressiva. J Bone Miner Res. 27(8): 1746-56. Такой анализ подробно описан в примерах ниже.

V. Прогрессирующая оссифицирующая фибродисплазия (FOP)

FOP представляет собой редкое наследственное заболевание, при котором гетеротопическая оссификация (ГО) приводит к образованию гистологически и биомеханически "нормальных" костей во вне-

скелетных областях, например в соединительной ткани. Несмотря на то что такое нарушение носит эпизодический характер, оно кумулятивно и приводит к необратимой инвалидности со все более возрастающей тяжестью.

Мировой показатель частоты FOP составляет около 1/2 000 000. Не отмечается этнической, расовой, тендерной или географической предрасположенности к FOP. Это не только в высшей степени инвалидизирующее заболевание, но также и состояние со значительно сокращенной продолжительностью жизни.

К проявлениям FOP относятся, например, врожденные деформации большого пальца ноги, воспаления, характеризующиеся болезненными припухлостями мягких тканей на голове, шее и/или на спине с воспалением и прогрессирующим образованием гетеротопических костей за счет внутривещной оссификации.

Подозрение на FOP может формироваться клинически на основании наличия деформаций большого пальца ноги. Диагностические тесты, например рентгеновское исследование или сканирование костей, может выявить аномалии большого пальца ноги и подтвердить наличие гетеротопической оссификации. Диагноз FOP может также подтверждаться результатами генетического тестирования, например, при выявлении мутации 617 G-на-A (R206H) в гене ACVR1.

FOP часто ошибочно диагностируют как ряд других нарушений, в том числе другие состояния гетеротопической оссификации. FOP следует отличать на основании дифференциального диагноза от таких нарушений, как, например, изолированные врожденные пороки развития, лимфатический отек, саркома мягких тканей, десмоидные опухоли, агрессивный юношеский фиброматоз, юношеские деформации, изолированная брахидактилия, прогрессирующая костная гетероплазия и гетеротопическая оссификация. Наличие врожденных деформаций большого пальца ноги и болезненных воспалений мягких тканей может использоваться для дифференциации FOP от других нарушений.

У пациентов, страдающих FOP, наблюдаются врожденные деформации большого пальца ноги, но в остальном в момент рождения они выглядят здоровыми. Воспаления, связанные с FOP, начинают проявляться в течение первого десятилетия жизни. Воспаления могут быть вызваны, например, травмой мягких тканей, падением, усталостью, вирусными инфекциями или внутримышечными инъекциями. Результатом воспалений является трансформация мягких тканей, например связок, скелетной мускулатуры или сухожилий, в гетеротопическую костную ткань.

Терапевтические средства лечения FOP в прошлом отсутствовали. Для сдерживания развития FOP применяли профилактические меры, например повышение уровня безопасности и совершенствование стратегий минимизации травм, отказ от внутримышечных инъекций и особое внимание при проведении стоматологических процедур. Прием высоких доз кортикостероидов в течение первых 24 ч после воспаления может способствовать его уменьшению и снижению отека, связанного с воспалениями. Не рекомендуются хирургические стратегии по удалению гетеротопической костной ткани, поскольку они контрпродуктивны и вызывают новую, связанную с травмой гетеротопическую оссификацию.

Причиной FOP являются мутации в ACVR1 (также известном как ALK2), которые, по-видимому, дестабилизируют взаимодействие домена GS с молекулой ингибитора FKBP12 (Groppe, J., et al., 2011, Cells Tissues Organs, 194: 291-295). FKBP12 является отрицательным модулятором ACVR1 и приводит к стабилизации рецептора в инактивированной конформации (Huse, M., et al., 1999, Cell, 96:425-436). См., например, публикацию Kaplan, F.S., et al., 2012, Disease Models & Mechanisms, 5:756-762).

Примером мутации в ACVR1, которая связана с FOP, является мутация аргинина 206 на гистидин (R206H) во внутриклеточном домене.

К субъектам с риском развития FOP относятся любые субъекты с мутацией ACVR1 R206H или другой мутацией, связанной с FOP, субъекты, родившиеся с деформациями большого пальца ноги, или субъекты с FOP в семейном анамнезе, у которых пока еще не проявились симптомы FOP, достаточные для диагностики FOP в соответствии с критериями, признанными специалистами в области.

VI. Способы лечения

В настоящем документе приводятся способы лечения FOP, включающие применение в отношении субъекта с FOP эффективной схемы введения антагониста ACVR1, ACVR2A и/или ACVR2B. В одном из вариантов осуществления применяют эффективную схему введения антагониста ACVR2A и антагониста ACVR2B. В дополнительном варианте осуществления антагонист ACVR2A представляет собой слитый белок Fc и антагонист ACVR2B представляет собой слитый белок Fc. В другом варианте осуществления изобретения лечение FOP проводят в рамках эффективной схемы введения антитела к активину А.

Под "лечением" субъекта с FOP подразумевают проведение эффективной схемы лечения с введением антагониста ACVR1, ACVR2A и/или ACVR2B или антитела к активину А субъекту с FOP с целью лечения, излечения, смягчения, облегчения, изменения, устранения, улучшения, нормализации или воздействия на состояние одного или более симптомов FOP.

Под "субъектом" понимается любое животное (т.е. млекопитающие), например люди, приматы, грызуны, например мыши и крысы, сельскохозяйственные и одомашненные животные, например собаки, кошки, рогатый скот, лошади, свиньи, овцы и пр., у которых существует потребность в лечении FOP. В любом из представленных способов субъектом может быть млекопитающее и предпочтительно человек.

Эффективная схема лечения с антагонистом активина А, ACVR1, ACVR2A и/или ACVR2B или антителом к активину А означает использование комбинации дозы, частоты и пути введения антагониста, которая обеспечивает положительный ответ по меньшей мере по одному признаку или симптому FOP. Положительный ответ может включать снижение, устранение, облегчение, остановку ухудшения или отсрочку усугубления по меньшей мере одного признака или симптома FOP. К признакам или симптомам FOP, в отношении которых может отмечаться положительный ответ, относятся, например, эктопический или гетеротопический остеогенез, воспаления FOP или боль и припухлость, связанные с воспалениями. Схему можно оценивать на примере отдельно взятого пациента при сопоставлении признаков и симптомов до и после лечения. Схема считается эффективной, если по меньшей мере один признак или симптом демонстрирует положительный ответ после лечения. В альтернативном или дополнительном варианте схему можно оценивать посредством сопоставления признаков и симптомов популяции субъектов, получавших тот или иной антагонист или антагонисты настоящего изобретения, с контрольной популяцией субъектов, не получавших лечения. Субъектами для такого сопоставления могут быть модель животных или человеческие субъекты в ходе клинического исследования (например, фаза I, фаза II, IIa, IIb или III). Схема считается эффективной при наличии статистически значимого положительного ответа между популяциями по меньшей мере по одному признаку или симптому.

В некоторых способах лечения FOP у субъекта не отмечаются другие состояния, которые можно лечить с помощью антагонистов ACVR1, ACVR2A и/или ACVR2B или антител к активину А, и он не подвержен риску их развития. Например, у субъекта могут отсутствовать все или любое из следующих заболеваний: диабет 2-го типа, мышечная дистрофия, боковой амиотрофический склероз (БАС) и остеопороз.

А. Способы введения

Антагонисты ACVR1, ACVR2A и/или ACVR2B или антитело к активину А обычно вводят непосредственно в форме белков или малых молекул, но в случае белков могут также вводить в виде нуклеиновой кислоты, кодирующей такие белки. Такие антагонисты можно вводить различными способами, например посредством клеточной трансфекции, генной терапии, прямого введения со средством доставки или фармацевтически приемлемым носителем, непрямого введения с использованием рекомбинантных клеток, содержащих нуклеиновую кислоту, кодирующую антагонист ACVR1, ACVR2A и/или ACVR2B или антитело к активину А, приведенные в настоящем документе.

Можно использовать различные системы доставки для введения антагонистов ACVR1, ACVR2A и/или ACVR2B или антитела к активину А, приведенные в настоящем документе, например инкапсуляцию в липосомы, микрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать соединения, опосредованный рецепторами эндоцитоз (см., например, Wu and Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262: 4429-4432), конструкцию нуклеиновой кислоты как часть ретровирусного или иного вектора и пр.

К способам введения относятся энтеральный или парентеральный, и сюда входят внутрикожный, внутримышечный, внутрибрюшинный, внутривенный, подкожный, пульмональный, интраназальный, интраокулярный, эпидуральный и пероральный пути введения. Соединения можно вводить любым подходящим способом, например вливанием или болюсной инъекцией, абсорбцией через эпителиальные или кожно-слизистые оболочки (например, слизистую ротовой полости, слизистую прямой кишки и кишечника и пр.) и можно применять совместно с другими биологически-активными агентами. Введение может быть системным или локальным. Кроме того, может быть желательно вводить фармацевтические композиции настоящего изобретения в центральную нервную систему любым удобным способом, в том числе посредством интравентрикулярной инъекции и инъекции в область позвоночного канала; причем выполнение интравентрикулярной инъекции можно облегчать применением интравентрикулярного катетера, например, соединенного с резервуаром, например резервуаром Omcana. Можно также применять пульмональную доставку, например, с использованием ингалятора или аэрозольного аппарата, а также состава, содержащего агент для перевода в аэрозоль.

Фармацевтические композиции настоящего изобретения могут вводиться локально в области, нуждающейся в лечении; этого можно достичь посредством, например, локального вливания во время хирургического вмешательства, топикального применения, например посредством инъекции, с помощью катетера или с использованием имплантата, причем упомянутый имплантат изготавливается из пористого, непористого или желатинообразного материала, включая мембраны, например силиконовые мембраны, волокна или коммерческие заменители кожи.

В другом варианте осуществления активное вещество может доставляться в везикуле, в частности в липосоме (см. Langer (1990) Science 249: 1527-1533). В другом варианте осуществления активное вещество может доставляться в системе контролируемого высвобождения. В одном из вариантов осуществления может использоваться насос (см. Langer (1990) выше). В другом варианте осуществления можно использовать полимерные материалы (см. Howard et al. (1989) J. Neurosurg. 71:105). В другом варианте осуществления, где активным веществом настоящего изобретения является нуклеиновая кислота, кодирующая белок, такую нуклеиновую кислоту могут вводить *in vivo*, чтобы способствовать экспрессии кодируемого ею белка за счет ее конструирования как части соответствующего вектора экспрессии нуклеиновой кислоты и ее введения таким образом, чтобы она становилась внутриклеточной, например при

использовании ретровирусного вектора (см., например, патент США № 4980286), или же посредством прямой инъекции, или с использованием бомбардировки микрочастицами, или покрытия липидами, или рецепторов поверхности клетки, или агентов трансфекции, или введения ее в связке с гомеобоксopodobным пептидом, для которого известно включение в ядро (см., например, Joliot et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864-1868) и пр. В альтернативном варианте осуществления нуклеиновую кислоту могут вводить внутриклеточно и включать в ДНК клетки-хозяина для экспрессии посредством гомологичной рекомбинации.

В. Комбинированные виды терапии

Антагонисты ACVR1, ACVR2A и ACVR2B или антитело к активину А, приведенные в настоящем документе, могут вводить в комбинации друг с другом или с другими лекарственными средствами. В одном из вариантов осуществления способ лечения FOP включает совместное введение антагониста ACVR2A и антагониста ACVR2B. В другом варианте осуществления способ лечения FOP включает совместное введение антагонистов ACVR1, ACVR2A и ACVR2B. В других вариантах осуществления антагонист ACVR1 могут вводить вместе с антагонистом ACVR2A и/или антагонистом ACVR2B. Антагонисты ACVR1, ACVR2A и ACVR2B могут вводить в форме отдельной фармацевтической композиции или могут вводить в форме общей фармацевтической композиции, содержащей комбинацию этих веществ. Антагонисты ACVR1, ACVR2A и/или ACVR2B или антитело к активину А как по отдельности, так и в комбинации могут вводить в сочетании с одним или более лекарственными препаратами. Комбинированные виды терапии могут включать одновременное или попеременное введение. Кроме того, комбинированные виды терапии могут включать однократное или постоянное введение.

С. Фармацевтические композиции

В настоящем изобретении также предлагаются фармацевтические композиции, содержащие антагонист активина А, ACVR1, ACVR2A и/или ACVR2B или антитело к активину А, которые приводятся в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель. Термин "фармацевтически приемлемый" означает одобренный контрольным органом федерального правительства или правительства штата или приведенный в Фармакопее США или других общепризнанных фармакопеех с целью применения для животных и, более конкретно, для человека. Термин "носитель" относится к разбавителям, адъювантам, наполнителям или несущей среде, вместе с которыми вводится терапевтическое средство. Фармацевтические носители могут быть стерильными жидкостями, такими как вода или масла, включая масла, получаемые из нефти, масла растительного, животного или синтетического происхождения, например арахисовое, соевое, минеральное, кунжутное масло и т.п. К подходящим фармацевтическим наполнителям относятся крахмал, глюкоза, лактоза, сахароза, желатин, солод, рис, мука, мел, силикагель, стеарат натрия, глицеринмоностеарат, тальк, хлорид натрия, сухое снятое молоко, глицерин, пропиленгликоль, вода, этанол и подобные им вещества. Если желательно, состав может также содержать небольшие количества смачивающих веществ, или эмульгаторов, или буферных веществ для поддержания рН.

Такие препараты могут иметь форму растворов, суспензий, эмульсий, таблеток, пилюль, капсул, порошков, лекарственных форм с пролонгированным действием и им подобных. Состав может иметь форму суппозитория со стандартными связующими и носителями, например триглицеридами. Состав для перорального применения может включать стандартные носители, такие как относящиеся к фармацевтической категории маннитол, лактоза, крахмал, стеарат магния, сахарин натрия, целлюлоза, карбонат магния и пр. Примеры подходящих фармацевтических носителей описаны в "Remington's Pharmaceutical Sciences", E.W. Martin.

В одном из примеров осуществления состав композиции определяют в соответствии со стандартными процедурами для фармацевтических композиций, приготовляемых для внутривенного введения в организм человека. В необходимых случаях композиция может также включать солюбилизирующий агент и местный анестетик, например лидокаин, для уменьшения боли в месте введения. Если состав должен вводиться посредством вливания, он может поставляться с флаконом для вливания, содержащим стерильную воду или физиологический раствор фармацевтической категории чистоты. Если композиция вводится посредством инъекции, может поставляться ампула со стерильной водой для инъекций или физиологическим раствором, чтобы ингредиенты можно было смешивать перед введением.

Антагонисты активина А, ACVR1, ACVR2A и/или ACVR2B или антитело к активину А, приведенные в настоящем документе, могут готовить в нейтральной форме или в форме солей. К фармацевтически приемлемым солям относятся соли, образованные со свободными аминогруппами, например полученные из соляной, фосфорной, уксусной, щавелевой, винной кислот и т.п., и образованные свободными карбоксильными группами, например полученные в присутствии ионов натрия, калия, аммония, кальция, гидроксидов железа, изопропиламина, триэтиламина, 2-этиламиноэтанола, гистидина, прокаина и т.п.

Количество и частоту применения антагониста активина А, антагониста ACVR1, ACVR2A и/или ACVR2B или антитела к активину А, вводимого определенным способом, эффективным для лечения FOP (например, эффективной схемы), могут определять стандартными клиническими методиками на основании приведенного описания. Кроме того, для определения диапазона оптимальной дозы могут быть использованы анализы *in vitro*. Точная доза, предназначенная для применения в составе композиции, также зависит от пути введения и тяжести состояния и должна определяться на основании решения

лечащего врача и состояния каждого субъекта. При этом подходящие диапазоны дозы для парентерального введения, предпочтительно внутривенного или подкожного, обычно составляют около 20-50 000 микрограммов активного вещества на килограмм массы тела. Для антител к активину А подходящие диапазоны дозы включают 1-25 мг/кг, 2-20 мг/кг, 5-15 мг/кг, 8-12 мг/кг и 10 мг/кг.

Подходящие диапазоны дозы для интраназального введения обычно лежат в пределах от около 0,01 мг/кг массы тела до 1 мг/кг массы тела. Эффективные дозы можно экстраполировать на основании кривой динамики "доза - ответ", полученной в тестовых системах моделей животных *in vitro*.

Частота введения также меняется, среди прочих факторов, в зависимости от тяжести состояния и времени полужизни вещества, но обычно меняется в пределах от ежедневного до ежеквартального, в том числе, например, два раза в неделю, еженедельно, раз в две недели, ежемесячно, раз в два месяца. Вещества могут также вводиться с нерегулярными интервалами, среди прочих факторов, с учетом состояния пациента или снижения уровня вещества в сыворотке ниже предельного уровня.

Все патентные заявки, веб-сайты, другие публикации, учетные номера и т.п., упомянутые выше или ниже, полностью включены в настоящий документ путем ссылки для любых целей в равной мере, как если бы было указано, что та или иная индивидуальная позиция отдельно и в индивидуальном порядке включена таким образом путем ссылки на нее. Если в различные моменты времени с тем или иным учетным номером связаны различные версии той или иной последовательности, подразумевается версия, связанная с учетным номером на действительную дату подачи настоящей заявки. Под действительной датой подачи подразумевается наступающая ранее из фактической даты подачи или даты подачи приоритетной заявки, где приводится ссылка на учетный номер (если применимо). Аналогичным образом, если в различные моменты времени издаются различные редакции публикации, веб-сайта и т.п., то, если не указано иное, подразумевается наиболее поздняя изданная версия на действительную дату подачи заявки. Если специально не указано иное, любое свойство, стадия, элемент, вариант осуществления или аспект настоящего изобретения может использоваться в сочетании с любым другим из перечисленного.

Примеры

Пример 1. Применение ACVR2A-Fc/ACVR2B-Fc для подавления эктопического остеогенеза в мышинной модели FOP.

Мыши Acvrl^{[R206H]COIN/+}; Gt(ROSA26)Sor^{CreERT2/+} были защищены от эктопического остеогенеза после введения тамоксифена благодаря введению ACVR2A-Fc/ACVR2B-Fc.

Мышам в модели FOP, называемой Acvrl^{[R206H]COIN/+}; Gt(ROSA26)Sor^{CreERT2/+}, вводили тамоксифен в дозе 1 мг/мышь в/б в течение восьми дней. Одиннадцать мышей получали 10 мг/кг ACVR2A-Fc и 10 мг/кг ACVR2B-Fc дважды в неделю и десять мышей получали 10 мг/кг контроля mFc дважды в неделю в течение 6 недель. Мышей обследовали с помощью микро-КТ *in vivo* в начале исследования и через 2, 4 и 6 недель после начала введения тамоксифена. Через 6 недель у 9 из 10 мышей в группе mFc наблюдался эктопический остеогенез в по меньшей мере одном месте; напротив, только у 2 из 11 мышей в группе ACVR2A-Fc и ACVR2B-Fc отмечалось развитие эктопической костной ткани, и для такой кости были характерны малые размеры. Данные результаты показаны на фиг. 1.

Пример 2. Применение малых молекул-ингибиторов ACVR1киназы для подавления эктопического остеогенеза в мышинной модели FOP.

Мыши Acvrl^{[R206H]COIN/+}; Gt(ROSA26)Sor^{CreERT2/+} были защищены от эктопического остеогенеза после введения тамоксифена благодаря введению ингибитора ACVR1-киназы LDN-212854.

16 мышам Acvrl^{[R206H]COIN/+}; Gt(ROSA26)Sor^{CreERT2/+} вводили тамоксифен в дозе 1 мг/мышь в/б в течение восьми дней. Восемь мышей получали 3 мг/кг ингибитора ACVR1-киназы LDN-212854 (Mohedas et al. (2013) ACS Chem. Biol. 8:1291-1302) два раза в день в течение 4 недель. Восемь мышей получали носитель в качестве контроля два раза в день в течение 4 недель. Мышей обследовали с помощью микро-КТ *in vivo* в начале исследования и через 2 и 4 недели после начала введения тамоксифена. Через 4 недели у 8 из 8 мышей в получавшей носитель контрольной группе наблюдался эктопический остеогенез, у 6 из этих мышей эктопические костные поражения отличались большими размерами. Напротив, в получавшей LDN-212854 группе у 3 из 8 мышей отмечался эктопический остеогенез, при этом размеры эктопических костных поражений у 3 этих мышей были меньше по сравнению с получавшей носитель контрольной группой. Данные результаты показаны на фиг. 2.

Пример 3. Применение антитела к активину А для подавления эктопического остеогенеза в мышинной модели FOP.

23 мышам Acvrl^{[R206H]COIN/+}; Gt(ROSA26)Sor^{CreERT2/+} вводили тамоксифен в дозе 1 мг/мышь в/б в течение восьми дней. Семь мышей получали 25 мг/кг изотипического контрольного антитела дважды в неделю, восемь мышей получали 25 мг/кг антитела к активину А (H4H10446P) дважды в неделю и восемь мышей получали 10 мг/кг ACVR2a-Fc дважды в неделю в течение 3 недель. Лечение указанными веществами начинали одновременно с введением тамоксифена. Мышей обследовали с помощью компьютерной микротомографии (микро-КТ) *in vivo* в начале исследования и через 2 и 3 недели после начала введения тамоксифена. На фиг. 3 показано, что через 3 недели у всех мышей в группе изотипического контрольного антитела развилась эктопическая костная ткань в по меньшей мере одном месте; напротив, ни у одной из мышей из группы антитела к активину А на тот момент не наблюдалось образования экто-

пической костной ткани. У двух мышей в группе ACVR2a-Fc через 3 недели сформировалась эктопическая костная ткань.

Пример 4.

Мыши $Acv1^{[R206H]COIN/+}; Gt(ROSA26)Sor^{CreERt2/+}$ были защищены от эктопического остеогенеза после введения тамоксифена благодаря введению блокирующего антитела к активину А и $Acv12a$ и b .

26 мышам $Acv1^{[R206H]COIN/+}; Gt(ROSA26)Sor^{CreERt2/+}$ вводили тамоксифен в дозе 40 мг/кг в/б в течение восьми дней. Восемь мышей получали 10 мг/кг изотипического контрольного антитела (REGN1945), девять мышей получали 10 мг/кг антитела к активину А (H4H10446P) (REGN2477) и девять мышей получали 10 мг/кг антитела к $Acv12a/Acv12b$ дважды в неделю в течение 6 недель. Мышей обследовали с помощью микро-КТ *in vivo* в начале исследования и через 2, 3 и 4 недели после начала введения тамоксифена. На фиг. 4 показано, что через 4 недели у 7 из 8 мышей в группе изотипического контрольного антитела развилась эктопическая костная ткань в по меньшей мере одном месте; напротив, только у одной мыши из группы, получавшей антитела к активину А, и у трех мышей в группе, получавшей антитело к $Acv12a/Acv12b$, через 4 недели сформировалась эктопическая костная ткань. Размеры эктопической костной ткани, которая сформировалась у группы, получавшей антитело, были меньше, чем в группе, получавшей изотипический контроль.

Пример 5.

Мыши $Acv1^{[R206H]COIN/+}; Gt(ROSA26)Sor^{CreERt2/+}$ были защищены от эктопического остеогенеза после введения тамоксифена благодаря введению блокирующего активин А антитела.

35 мышам $Acv1^{[R206H]COIN/+}; Gt(ROSA26)Sor^{CreERt2/+}$ вводили тамоксифен в дозе 40 мг/кг в/б в течение восьми дней. Восемь мышей получали 25 мг/кг изотипического контрольного антитела (REGN1945), девять мышей получали 25 мг/кг антитела к активину А (H4H10446P) (REGN2477), девять мышей получали 10 мг/кг антитела к активину А (REGN2477) и девять мышей получали 1 мг/кг антитела к активину А (REGN2477) еженедельно в течение 6 недель. Мышей обследовали с помощью микро-КТ *in vivo* в начале исследования и через 2, 3, 4 и 6,5 недель после начала введения тамоксифена. Объем эктопической костной ткани у каждой мыши рассчитывали по изображениям микро-КТ. На фиг. 5 показано, что через 4 недели у всех мышей в группе изотипического контрольного антитела развилась эктопическая костная ткань по меньшей мере в одном месте, тогда как только по 2 мыши из каждой из групп, получавших антитело к активину А. Через 6,5 недель средний общий объем эктопической костной ткани в группе, получавшей изотип, составлял 65,4 мм³ по сравнению с 1,87 мм³ в группе, получавшей 25 мг/кг, 0,3 мм³ в группе, получавшей 10 мг/кг и 7,3 мм³ в группе, получавшей 1 мг/кг антитела к активину.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения прогрессирующей оссифицирующей фибродисплазии (FOP), включающий применение в отношении субъекта с FOP эффективной схемы введения антитела к активину А.

2. Способ по п.1, в котором антитело содержит переменные участки тяжелой и легкой цепей антитела SEQ ID NOS: 1 и 5, SEQ ID NOS: 9 и 13 или SEQ ID NOS: 18 и 17 соответственно.

3. Способ по п.1, в котором антитело представляет собой химерное, венеризованное, гуманизированное или человеческое антитело.

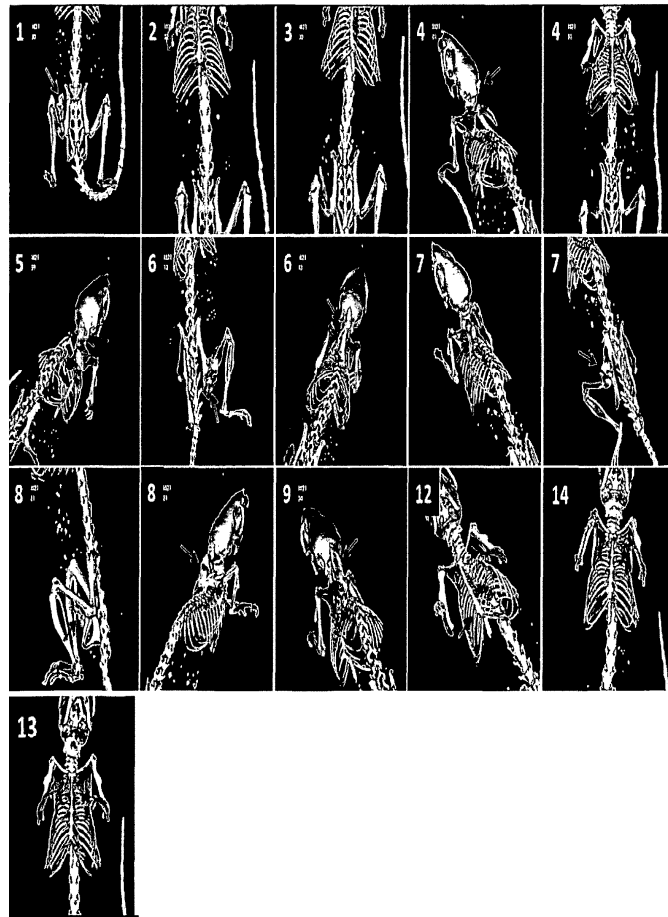
4. Способ по п.1, в котором антитело представляет собой интактное антитело.

5. Способ по п.1, в котором антитело представляет собой человеческое антитело IgG1 каппа.

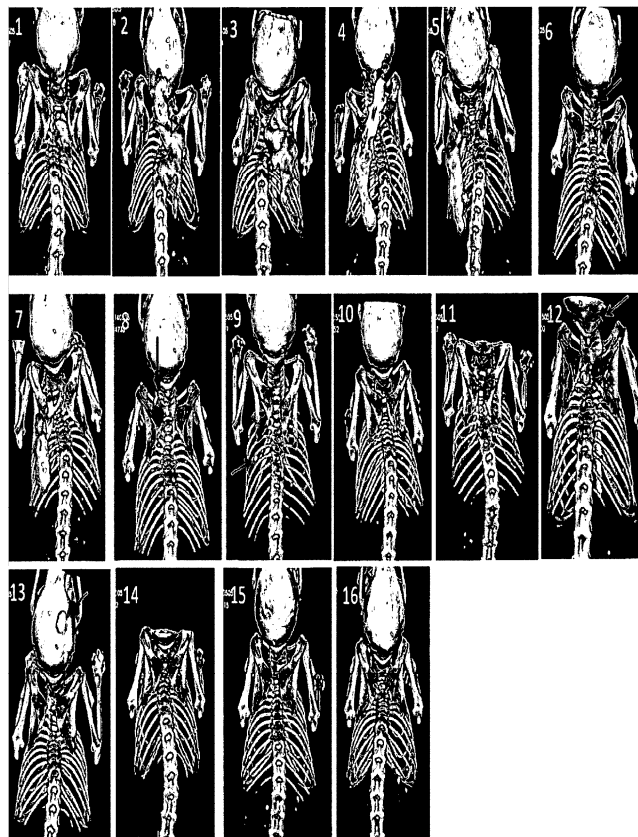
6. Способ по п.2, в котором антитело представляет собой человеческое антитело IgG1 каппа.

7. Способ по п.2, в котором антитело содержит переменные участки тяжелой и легкой цепей антитела SEQ ID NOS: 1 и 5.

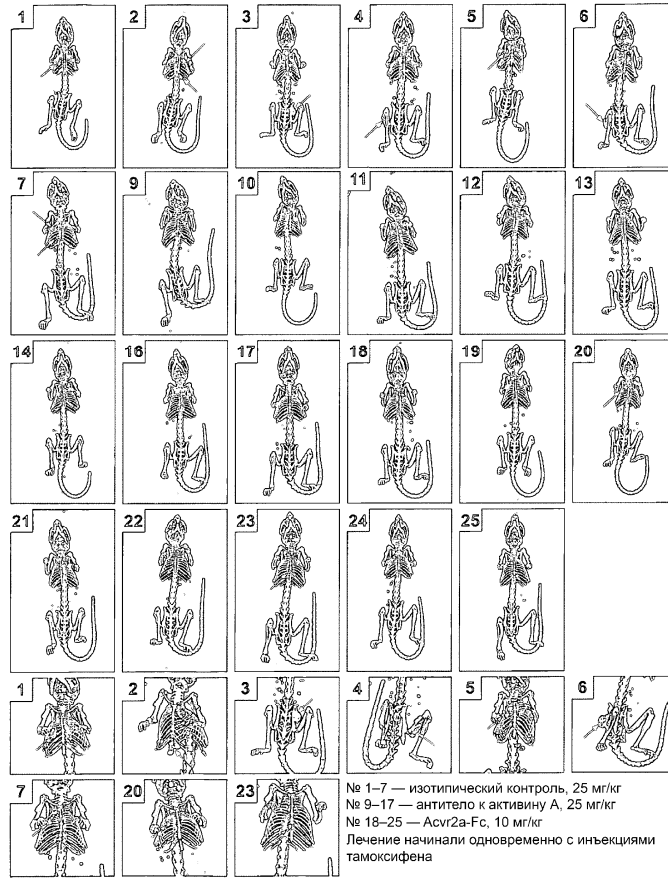
8. Способ по п.7, в котором антитело представляет собой человеческое антитело IgG1 каппа.



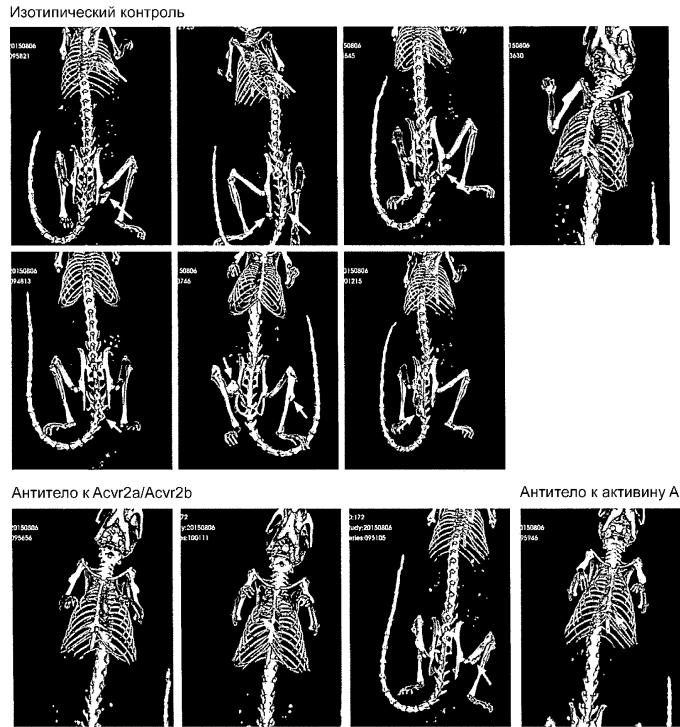
Фиг. 1



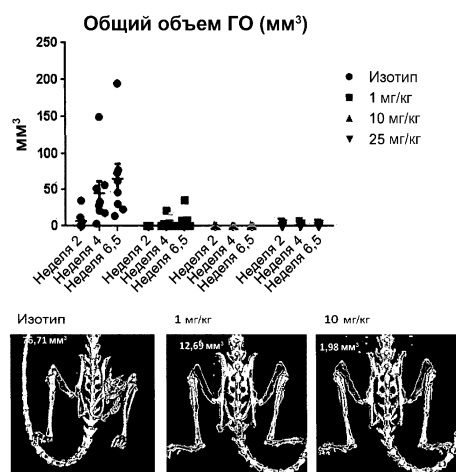
Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5

