

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 039579

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.02.14

(21) Номер заявки
201791389

(22) Дата подачи заявки
2015.12.18

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

(54) СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ АНТИТЕЛ, НАПРАВЛЕННЫХ ПРОТИВ BMP6

(31) 62/094,716; 62/181,803

(32) 2014.12.19; 2015.06.19

(33) US

(43) 2017.11.30

(86) PCT/IB2015/059797

(87) WO 2016/098079 2016.06.23

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
НОВАРТИС АГ (CH)

(72) Изобретатель:
Цун Фэн, Дитрих Уилльям (US),
Георге Натали (CH), Лю Дун, Скечтер
Эшер, Сони Адити, Чжоу Цзин (US)

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

(56) HERRERA BLANCA ET AL.: "A rapid and sensitive bioassay for the simultaneous measurement of multiple bone morphogenetic proteins. Identification and quantification of BMP4, BMP6 and BMP9 in bovine and human serum", BMC CELL BIOLOGY, BIOMED CENTRAL, LONDON, GB, vol. 10, no. 1, 19 March 2009 (2009-03-19), page 20, XP021047576, ISSN: 1471-2121, DOI: 10.1186/1471-2121-10-20, abstract WO-A2-2010056981

(57) Изобретение относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам к человеческому BMP6, а также композициям и способам их применения.

039579 B1

039579 B1

039579

B1

Родственные заявки

По заявке на настоящий патент испрашивается приоритет заявки US 62/094716, поданной 19 декабря 2014 г., и заявки US 62/181803, поданной 19 июня 2015 г., содержание которых полностью включено в настоящую заявку посредством отсылки.

Список последовательностей

Изобретение содержит список последовательностей, который был представлен в электронном виде в формате ASCII и настоящим полностью включен посредством отсылки. Указанная ASCII копия, созданная 16 декабря 2015 г., обозначена PAT056599-WO-PCT_SL.txt и имеет размер 68301 байт.

Введение

Настоящее изобретение относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам к BMP6 человека, а также содержащим их композициям и способам их применения.

Уровень техники

Анемия распространена у больных с хронической болезнью почек (ХБП) и связана с более низким качеством жизни и более высоким риском неблагоприятных исходов болезни, включая сердечно-сосудистое заболевание и смерть. Несколько способов лечения анемии у больных ХБП включают применение эритропоэз-стимулирующих препаратов (ЭСП), дополнительные пероральные и внутривенные препараты железа и переливания крови. Однако многие больные не отвечают на такое лечение надлежащим образом или требуют более высоких доз ЭСП и/или железа. Большие дозы железа также могут вызывать токсичность, связанную с образованием радикалов кислорода и аллергическими реакциями. Такие методы лечения могут быть недостаточно эффективными, поскольку они не полностью направлены на первопричину анемии, т.е. нарушение абсорбции железа и мобилизацию железа из депо.

Попытки контролировать резистентность к эритропоэтину в настоящее время предпринимают путем совместного введения высокой дозы парентерального препарата железа. Однако большая часть железа из внутривенных препаратов сначала обрабатывается макрофагами, и его утилизация для эритропоэза зависит от ферропортин-опосредованного экспорта железа.

У многих больных анемией ферропортин-опосредованный экспорт железа супрессирован высоким уровнем гепсидина. Дополнительные данные свидетельствуют, что повышенные уровни гепсидина коррелируют с плохим ответом на ЭСП при гемодиализе. Средства, понижающие уровень гепсидина, могут быть, таким образом, эффективной стратегией уменьшения тяжести ЭСП-рефрактерной анемии в данной группе больных и при других формах анемии при хроническом заболевании (АХЗ), характеризующейся ограничением железа.

Таким образом, способы, которые уменьшают уровни гепсидина в крови, должны увеличивать абсорбцию железа, способствовать высвобождению секвестрированного железа и стимулировать эритропоэз у больного с ЭСП-рефрактерной анемией, наблюдаемой у больных хронической болезнью почек.

Несмотря на существующие варианты лечения анемии, ассоциированной с заболеваниями и нарушениями, сохраняется потребность в улучшенных композициях для лечения анемии, которые являются эффективными и хорошо переносимыми.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к выделенным BMP6-связывающим молекулам (например, BMP6-связывающим антителам или их антигенсвязывающим фрагментам), фармацевтическим композициям, включающим такие молекулы, способам получения таких молекул и композиций, а также способам их применения в понижении уровней гепсидина и в лечении анемии.

В одном аспекте изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту к BMP6, включающим любые 1, 2, 3, 4, 5 или 6 CDR-областей любого из антител в табл. 1.

В одном аспекте изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту к BMP6, включающим 6 CDR-областей антитела 3, как описано в табл. 1.

В одном аспекте изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту к BMP6, включающим 6 CDR-областей антитела 5, как описано в табл. 1.

В одном аспекте изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту к BMP6, включающим 6 CDR-областей антитела 6, как описано в табл. 1.

В одном аспекте изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту к BMP6, включающим 6 CDR-областей антитела 7, как описано в табл. 1.

В одном аспекте настоящего изобретения выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывают человеческий BMP6 и включают:

последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в SEQ ID NO: 9, 10 и 11 соответственно и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в SEQ ID NO: 19, 20 и 21 соответственно.

В одном аспекте настоящего изобретения выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывают человеческий BMP6 и включают:

последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в SEQ ID NO: 12, 13 и 14 соответственно и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в SEQ ID NO: 22, 23 и 24 соответственно.

В одном аспекте настоящего изобретения выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывают человеческий BMP6 и включают:

последовательностей HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в SEQ ID NO: 9, 10 и 11 соответственно и последовательностей LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в SEQ ID NO: 19, 20 и 21 соответственно;

последовательностей HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в SEQ ID NO: 12, 13 и 14 соответственно и последовательностей LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в SEQ ID NO: 22, 23 и 24 соответственно;

последовательностей HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в SEQ ID NO: 29, 30 и 31 соответственно и последовательностей LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в SEQ ID NO: 39, 40 и 41 соответственно;

последовательностей HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в SEQ ID NO: 32, 33 и 34 соответственно и последовательностей LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в SEQ ID NO: 42, 43 и 44 соответственно;

последовательностей HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в SEQ ID NO: 49, 50 и 51 соответственно и последовательностей LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в SEQ ID NO: 59, 60 и 61 соответственно;

последовательностей HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в SEQ ID NO: 52, 53 и 54 соответственно и последовательностей LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в SEQ ID NO: 62, 63 и 64 соответственно;

последовательностей HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в SEQ ID NO: 69, 70 и 71 соответственно и последовательностей LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в SEQ ID NO: 79, 80 и 81 соответственно или

последовательностей HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в SEQ ID NO: 72, 73 и 74 соответственно и последовательностей LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в SEQ ID NO: 82, 83 и 84 соответственно.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфично связываются с BMP6 и включают по меньшей мере одну определяющую комплементарность (CDR) последовательность, идентичную какой-либо одной или более из:

последовательностей HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в SEQ ID NO: 9, 10 и 11 соответственно и последовательностей LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в SEQ ID NO: 19, 20 и 21 соответственно;

последовательностей HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в SEQ ID NO: 12, 13 и 14 соответственно и последовательностей LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в SEQ ID NO: 22, 23 и 24 соответственно;

последовательностей HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в SEQ ID NO: 29, 30 и 31 соответственно и последовательностей LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в SEQ ID NO: 39, 40 и 41 соответственно;

последовательностей HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в SEQ ID NO: 32, 33 и 34 соответственно и последовательностей LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в SEQ ID NO: 42, 43 и 44 соответственно;

последовательностей HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в SEQ ID NO: 49, 50 и 51 соответственно и последовательностей LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в SEQ ID NO: 59, 60 и 61 соответственно;

последовательностей HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в SEQ ID NO: 52, 53 и 54 соответственно и последовательностей LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в SEQ ID NO: 62, 63 и 64 соответственно;

последовательностей HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в SEQ ID NO: 69, 70 и 71 соответственно и последовательностей LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в SEQ ID NO: 79, 80 и 81 соответственно или

последовательностей HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в SEQ ID NO: 72, 73 и 74 соответственно и последовательностей LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в SEQ ID NO: 82, 83 и 84 соответственно.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения выделенные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты специфично связываются с BMP6, где указанные антитела включают по меньшей мере одну последовательность CDR тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из:

последовательностей HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в SEQ ID NO: 12, 13 и 14;

последовательностей HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в SEQ ID NO: 29, 30 и 31;

последовательностей HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в SEQ ID NO: 32, 33 и 34;

последовательностей HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в SEQ ID NO: 49, 50 и 51;

последовательностей HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в SEQ ID NO: 52, 53 и 54;

последовательностей HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в SEQ ID NO: 69, 70 и 71;

последовательностей HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в SEQ ID NO: 72, 73 и 74 и

последовательностей HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в SEQ ID NO: 9, 10 и 11.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения выделенные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты специфично связываются с BMP6, где указанные антитела включают по меньшей мере одну последовательность CDR легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из:

последовательностей LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в SEQ ID NO: 19, 20 и 21 соответственно;

последовательностей LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в SEQ ID NO: 22, 23 и 24 соответственно;

последовательностей LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в SEQ ID NO: 39, 40 и 41 соответственно;

последовательностей LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в SEQ ID NO: 42, 43 и 44 соответственно;

последовательностей LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в SEQ ID NO: 59, 60 и 61 соответственно;

последовательностей LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в SEQ ID NO: 62, 63 и 64 соответственно;

последовательностей LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в SEQ ID NO: 79, 80 и 81 соответственно и

последовательностей LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в SEQ ID NO: 82, 83 и 84 соответственно.

В вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент являются моноклональными.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к выделенным антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфично связываются с BMP6, где указанное антитело

имеет константу аффинности (K_A) по меньшей мере приблизительно $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, 10^8 M^{-1} , 10^9 M^{-1} , 10^{10} M^{-1} или 10^{11} M^{-1} . В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к выделенным антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфично связываются с BМР6, где указанное антитело имеет константу аффинности (K_A) по меньшей мере $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, 10^8 M^{-1} , 10^9 M^{-1} , 10^{10} M^{-1} или 10^{11} M^{-1} .

В одном варианте осуществления настоящего изобретения выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфично связываются с BМР6, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с BМР6 с K_d не больше чем приблизительно 1 нМ или не больше чем приблизительно 0,1 нМ. В одном варианте осуществления настоящего изобретения выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфично связываются с BМР6, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с BМР6 с K_d не больше чем 1 нМ или не больше чем 0,1 нМ. В одном варианте осуществления настоящего изобретения выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфично связываются с BМР6, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с BМР6 с $K_d \leq 1 \text{ нМ}$ или $\leq 0,1 \text{ нМ}$. В одном варианте осуществления K_d соответствует измерению с помощью ВiaСоре.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфично связываются с BМР6 и ингибируют активность BМР6.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфично связываются с BМР6 и перекрестно конкурируют с (перекрестно блокируют) антителом, описанным в табл. 1 ниже. В одном варианте осуществления настоящего изобретения выделенные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связываются с тем же эпитопом BМР6, перекрестно конкурируют с антителом, описанным в табл. 1 ниже.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения выделенные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты обладают по меньшей мере приблизительно в 100, 500 или 1000 раз большей аффинностью к человеческому BМР6, чем к любому из: человеческого BМР2, человеческого BМР5 или человеческого BМР7. В одном варианте осуществления настоящего изобретения выделенные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты обладают по меньшей мере в 100, 500 или 1000 раз большей аффинностью к человеческому BМР6, чем к любому из: человеческого BМР2, человеческого BМР5 или человеческого BМР7. В вариантах осуществления специфичность к BМР6 соответствует измерению с помощью ELISA.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения выделенные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты обладают по меньшей мере приблизительно в 100, 500 или 1000 раз большей аффинностью к человеческому BМР6, чем к человеческому BМР2. В одном варианте осуществления настоящего изобретения выделенные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты обладают по меньшей мере в 100, 500 или 1000 раз большей аффинностью к человеческому BМР6, чем к человеческому BМР2. В вариантах осуществления специфичность к BМР6 соответствует измерению с помощью ELISA.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения выделенные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты обладают по меньшей мере приблизительно в 100, 500 или 1000 раз большей аффинностью к человеческому BМР6, чем к человеческому BМР5. В одном варианте осуществления настоящего изобретения выделенные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты обладают по меньшей мере в 100, 500 или 1000 раз большей аффинностью к человеческому BМР6, чем к человеческому BМР5. В вариантах осуществления специфичность к BМР6 соответствует измерению с помощью ELISA.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения выделенные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты обладают по меньшей мере приблизительно в 100, 500 или 1000 раз большей аффинностью к человеческому BМР6, чем к человеческому BМР7. В одном варианте осуществления настоящего изобретения выделенные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты обладают по меньшей мере в 100, 500 или 1000 раз большей аффинностью к человеческому BМР6, чем к человеческому BМР7. В вариантах осуществления специфичность к BМР6 соответствует измерению с помощью ELISA.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент не имеют никакого поддающегося обнаружению связывания с человеческим BМР2 или BМР5 (например, в ELISA).

В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент не обладают никакой поддающейся обнаружению активностью против человеческого BМР2 (например, в ELISA).

В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент не обладают никакой поддающейся обнаружению активностью против человеческого BМР5 (например, в ELISA).

В одном варианте осуществления антитела и их антигенсвязывающие фрагменты согласно изобретению, которые специфично связываются с BМР6, являются выделенными моноклональными антителами.

ми. В одном варианте осуществления антитела и их антигенсвязывающие фрагменты согласно изобретению, которые специфично связываются с BMP6, являются выделенными человеческими моноклональными антителами. В одном варианте осуществления антитела и их антигенсвязывающие фрагменты согласно изобретению, которые специфично связываются с BMP6, являются гуманизированными моноклональными антителами. В одном варианте осуществления антитела и их антигенсвязывающие фрагменты согласно изобретению, которые специфично связываются с BMP6, являются выделенными химерными антителами. В одном варианте осуществления антитела и их антигенсвязывающие фрагменты согласно изобретению включают человеческую константную область тяжелой цепи и человеческую константную область легкой цепи.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфично связываются с BMP6, являются одноцепочечным антителом.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфично связываются с BMP6, являются Fab-фрагментом.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфично связываются с BMP6, являются scFv.

В одном варианте осуществления антитела изобретения являются IgM или IgG. В одном варианте осуществления настоящего изобретения IgG является IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В одном варианте осуществления IgG является IgG1.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения выделенные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты включают каркас, в котором аминокислоты были заменены каркасом антитела из соответствующих человеческих последовательностей VH или VL зародышевой линии.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент являются компонентом иммуноконъюгата. В одном варианте осуществления иммуноконъюгат может включать выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и любое из следующего в качестве неограничивающих примеров: фермент, токсин, гормон, фактор роста или лекарственное средство.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеют измененную эффекторную функцию в результате мутации Fc-области.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент перекрестно блокируют антитело или его выделенный антигенсвязывающий фрагмент, перечисленные в табл. 1.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ингибируют BMP6-индуцированную экспрессию гепсидина в клетках печени (например, линиях клеток печени и/или первичных человеческих клетках печени *in vitro*). В одном варианте осуществления настоящего изобретения выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ингибируют BMP6-индуцированную экспрессию гепсидина в клетках печени (например, линиях клеток печени и/или первичных человеческих клетках печени *in vitro*) по меньшей мере на приблизительно 50%. Например, выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ингибируют BMP6-индуцированную экспрессию гепсидина в клетках печени по меньшей мере на приблизительно 50, 60, 70, 80, 90 или 100%. Экспрессия гепсидина может быть измерена, в качестве неограничивающих примеров, путем измерения количества мРНК гепсидина или уровней белка. В одном варианте осуществления настоящего изобретения выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ингибируют BMP6-индуцированную экспрессию гепсидина в клетках печени (например, линиях клеток печени и/или первичных человеческих клетках печени *in vitro*) по меньшей мере на 50%. Например, выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ингибируют BMP6-индуцированную экспрессию гепсидина в клетках печени по меньшей мере на 50, 60, 70, 80, 90 или 100%. Экспрессия гепсидина может быть измерена, в качестве неограничивающих примеров, путем измерения количества мРНК гепсидина или уровней белка.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент уменьшают активность человеческого BMP6 *in vitro*. В одном варианте осуществления настоящего изобретения выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент уменьшают активность человеческого BMP6 *in vitro* согласно измерению в анализе с репортерным геном HEP3B-BRE-Luc.

В одном аспекте изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые специфично связывают BMP6, и которые связывают эпитоп человеческого BMP6, включающий последовательность QTLVHLMNPEYVPKP (SEQ ID NO: 92 или аминокислоты 88-102 в SEQ ID NO: 89). В одном аспекте изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые специфично связывают BMP6, и которые связывают эпитоп человеческого BMP6, состоящий из последовательности QTLVHLMNPEYVPKP (SEQ ID NO: 92 или аминокислот 88-102 в SEQ ID NO: 89). В одном варианте осуществления настоящего изобретения выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент обладают по меньшей мере приблизительно в 100 раз большей

аффинностью к эпитопу человеческого BMP6, состоящему из последовательности QTLVHLMNPEYVPKP (SEQ ID NO: 92 или аминокислот 88-102 в SEQ ID NO: 89), чем к: (а) эпитопу человеческого BMP7, состоящему из последовательности QTLVHFINPETVPKP (SEQ ID NO: 93 или аминокислот 88-102 в SEQ ID NO: 90) или (b) эпитопу человеческого BMP5, состоящему из последовательности QTLVHLMFPDHVPKP (SEQ ID NO: 94 или аминокислот 87-101 в SEQ ID NO: 91). В одном варианте осуществления настоящего изобретения выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент обладают по меньшей мере в 100 раз большей аффинностью к эпитопу человеческого BMP6, состоящему из последовательности QTLVHLMNPEYVPKP (SEQ ID NO: 92 или аминокислот 88-102 в SEQ ID NO: 89), чем к: (а) эпитопу человеческого BMP7, состоящему из последовательности QTLVHFINPETVPKP (SEQ ID NO: 93 или аминокислот 88-102 в SEQ ID NO: 90) или (b) эпитопу человеческого BMP5, состоящему из последовательности QTLVHLMFPDHVPKP (SEQ ID NO: 94 или аминокислот 87-101 в SEQ ID NO: 91). Такое выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут включать в качестве неограничивающего примера: (а) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в SEQ ID NO: 69, 70 и 71 соответственно и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в SEQ ID NO: 79, 80 и 81, соответственно, или (b) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в SEQ ID NO: 72, 73 и 74 соответственно и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в SEQ ID NO: 82, 83 и 84 соответственно. В одном варианте осуществления настоящего изобретения выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включают последовательность VH в SEQ ID NO: 75; и последовательность VL в SEQ ID NO: 85. В варианте осуществления аффинность соответствует измерению с помощью BiaCore.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент обладают по меньшей мере приблизительно в 500 раз большей аффинностью к эпитопу человеческого BMP6, состоящему из последовательности QTLVHLMNPEYVPKP (SEQ ID NO: 92 или аминокислот 88-102 в SEQ ID NO: 89), чем к: (а) эпитопу человеческого BMP7, состоящему из последовательности QTLVHFINPETVPKP (SEQ ID NO: 93 или аминокислот 88-102 в SEQ ID NO: 90) или (b) эпитопу человеческого BMP5, состоящему из последовательности QTLVHLMFPDHVPKP (SEQ ID NO: 94 или аминокислот 87-101 в SEQ ID NO: 91). Такое выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут включать в качестве неограничивающих примеров: (а) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в SEQ ID NO: 69, 70 и 71 соответственно и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в SEQ ID NO: 79, 80 и 81, соответственно, или (b) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в SEQ ID NO: 72, 73 и 74 соответственно и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в SEQ ID NO: 82, 83 и 84 соответственно. В одном варианте осуществления настоящего изобретения выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включают последовательность VH в SEQ ID NO: 75; и последовательность VL в SEQ ID NO: 85. В варианте осуществления аффинность соответствует измерению с помощью BiaCore.

В другом аспекте изобретение относится к композиции, например, фармацевтической композиции, включающей выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из предыдущих аспектов или вариантов осуществления.

В одном варианте осуществления композиция дополнительно включает фармацевтически приемлемый носитель.

В одном варианте осуществления композиция дополнительно включает дополнительное терапевтическое средство.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения дополнительное терапевтическое средство уменьшает активность BMP6.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения дополнительным терапевтическим средством является миРНК, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или малая молекула.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения дополнительное терапевтическое средство выбрано из группы, состоящей из: эритропозз-стимулирующего препарата (ЭСП) и препарата железа (например, железосодержащей пищевой добавки или в/в препарата железа).

В одном варианте осуществления настоящего изобретения дополнительным терапевтическим средством является эритропозз-стимулирующий препарат (ЭСП), например ЕРО.

В одном варианте осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в табл. 1, могут быть введены пациенту в сочетании с терапевтическим способом или процедурой, такими как описанными в настоящем изобретении или известными в уровне техники. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в табл. 1, могут быть введены до, после или одновременно со способом или процедурой.

В одном варианте осуществления терапевтическим способом или процедурой является переливание крови. В одном варианте осуществления терапевтическим способом или процедурой является диализ. В одном варианте осуществления терапевтическим способом или процедурой является введение ЭСП, например ЕРО. В одном варианте осуществления терапевтическим способом или процедурой является введение препарата железа, например в/в препарата железа. В одном варианте осуществления терапевтическим способом или процедурой является введение ЭСП, например ЕРО, и введение препарата железа, например в/в препарата железа. В одном варианте осуществления терапевтическим способом или проце-

дурой является комбинация любого из предыдущего.

В другом аспекте настоящее изобретение включает нуклеиновую кислоту (полинуклеотид), кодирующий любое из антител или их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем изобретении. В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложена нуклеиновая кислота, которая кодирует выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в табл. 1, включающие любую одну или более из:

последовательностей HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в SEQ ID NO: 9, 10 и 11 соответственно и последовательностей LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в SEQ ID NO: 19, 20 и 21 соответственно;

последовательностей HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в SEQ ID NO: 12, 13 и 14 соответственно и последовательностей LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в SEQ ID NO: 22, 23 и 24 соответственно;

последовательностей HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в SEQ ID NO: 29, 30 и 31 соответственно и последовательностей LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в SEQ ID NO: 39, 40 и 41 соответственно;

последовательностей HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в SEQ ID NO: 32, 33 и 34 соответственно и последовательностей LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в SEQ ID NO: 42, 43 и 44 соответственно;

последовательностей HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в SEQ ID NO: 49, 50 и 51 соответственно и последовательностей LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в SEQ ID NO: 59, 60 и 61 соответственно;

последовательностей HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в SEQ ID NO: 52, 53 и 54 соответственно и последовательностей LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в SEQ ID NO: 62, 63 и 64 соответственно;

последовательностей HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в SEQ ID NO: 69, 70 и 71 соответственно и последовательностей LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в SEQ ID NO: 79, 80 и 81 соответственно или

последовательностей HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в SEQ ID NO: 72, 73 и 74 соответственно и последовательностей LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в SEQ ID NO: 82, 83 и 84 соответственно.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к нуклеиновой кислоте (полинуклеотиду), которая кодирует выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в табл. 1, включающие аминокислотную последовательность, включающую последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

последовательности тяжелой цепи в SEQ ID NO: 17;

последовательности VH в SEQ ID NO: 15;

последовательности легкой цепи в SEQ ID NO: 27;

последовательности VL в SEQ ID NO: 25;

последовательности тяжелой цепи в SEQ ID NO: 37;

последовательности VH в SEQ ID NO: 35;

последовательности легкой цепи в SEQ ID NO: 47;

последовательности VL в SEQ ID NO: 45;

последовательности тяжелой цепи в SEQ ID NO: 57;

последовательности VH в SEQ ID NO: 55;

последовательности легкой цепи в SEQ ID NO: 67;

последовательности VL в SEQ ID NO: 65;

последовательности тяжелой цепи в SEQ ID NO: 77;

последовательности VH в SEQ ID NO: 75;

последовательности легкой цепи в SEQ ID NO: 87 и

последовательности VL в SEQ ID NO: 85.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к нуклеиновой кислоте (полинуклеотиду), которая кодирует выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в табл. 1, включающие аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью последовательности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из:

последовательности тяжелой цепи в SEQ ID NO: 17;

последовательности VH в SEQ ID NO: 15;

последовательности легкой цепи в SEQ ID NO: 27;

последовательности VL в SEQ ID NO: 25;

последовательности тяжелой цепи в SEQ ID NO: 37;

последовательности VH в SEQ ID NO: 35;

последовательности легкой цепи в SEQ ID NO: 47;

последовательности VL в SEQ ID NO: 45;

последовательности тяжелой цепи в SEQ ID NO: 57;

последовательности VH в SEQ ID NO: 55;

последовательности легкой цепи в SEQ ID NO: 67;

последовательности VL в SEQ ID NO: 65;

последовательности тяжелой цепи в SEQ ID NO: 77;

последовательности VH в SEQ ID NO: 75;

последовательности легкой цепи в SEQ ID NO: 87 и

последовательности VL в SEQ ID NO: 85.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к нуклеиновой кислоте (поли-нуклеотиду), которая кодирует выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в табл. 1, где нуклеиновая кислота включает последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

последовательности тяжелой цепи в SEQ ID NO: 18;
 последовательности тяжелой цепи в SEQ ID NO: 38;
 последовательности тяжелой цепи в SEQ ID NO: 58;
 последовательности тяжелой цепи в SEQ ID NO: 78;
 последовательности легкой цепи в SEQ ID NO: 28;
 последовательности легкой цепи в SEQ ID NO: 48;
 последовательности легкой цепи в SEQ ID NO: 68;
 последовательности легкой цепи в SEQ ID NO: 88;
 последовательности VH в SEQ ID NO: 16;
 последовательности VH в SEQ ID NO: 36;
 последовательности VH в SEQ ID NO: 56;
 последовательности VH в SEQ ID NO: 76;
 последовательности VL в SEQ ID NO: 26;
 последовательности VL в SEQ ID NO: 46;
 последовательности VL в SEQ ID NO: 66 и
 последовательности VL в SEQ ID NO: 86.

В другом аспекте настоящее изобретение также относится к вектору, включающему такие нуклеиновые кислоты или полинуклеотиды.

В другом аспекте настоящее изобретение также относится к клетке-хозяину, включающей такие нуклеиновые кислоты или полинуклеотиды. В одном варианте осуществления клетка-хозяин является клеткой яичника китайского хомячка (CHO). В одном варианте осуществления настоящего изобретения выделенные клетки-хозяева включают вектор, включающий такие нуклеиновые кислоты или полинуклеотиды.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к выделенной клетке-хозяину, включающей: (1) рекомбинантный сегмент нуклеиновой кислоты, кодирующий тяжелую цепь антител согласно изобретению, и (2) второй рекомбинантный сегмент нуклеиновой кислоты, кодирующий легкую цепь антител согласно изобретению; где указанные сегменты ДНК соответствующим образом функционально связаны с первым и вторым промотором, и способны экспрессироваться в указанной клетке-хозяине. В другом варианте осуществления настоящего изобретения выделенные клетки-хозяева включают рекомбинантный сегмент ДНК, кодирующий тяжелую цепь и легкую цепь антител согласно изобретению, соответственно, где указанный сегмент ДНК функционально связан с промотором и способен экспрессироваться в указанных клетках-хозяевах. В одном варианте осуществления клетки-хозяева являются линией нечеловеческих клеток млекопитающих. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент являются человеческим моноклональным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

Настоящее изобретение относится к применению антитела или его антигенсвязывающего фрагмента к BMP6, полинуклеотида, вектора или клетки-хозяина, как описано в настоящем изобретении, в получении лекарственного средства. Настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, как описано в настоящем изобретении, для применения в качестве лекарственного средства. Настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, как описано в настоящем изобретении, для применения в терапии. Настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, как описано в настоящем изобретении, для применения в лечении анемии, например анемии при хроническом заболевании. В варианте осуществления хроническим заболеванием является хроническая болезнь почек. В варианте осуществления хроническим заболеванием является рак. В варианте осуществления хроническим заболеванием является воспаление. В вариантах осуществления пациент анемией проходил или проходит лечение эритропоэз-стимулирующим препаратом (ЭСП), например эритропоэтином (ЕРО).

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способам применения антител и их антигенсвязывающих фрагментов, и композиций, включающих такие антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, как описано в настоящем изобретении. В одном аспекте изобретение относится к способу уменьшения активности или уровня гепсидина у пациента, включающему стадию введения пациенту антитела или его антигенсвязывающего фрагмента к BMP6, как описано в настоящем изобретении. В одном варианте осуществления этого способа активность или уровень гепсидина уменьшается по меньшей мере на 50%. В варианте осуществления пациент страдает анемией. В вариантах осуществления анемия является анемией при хроническом заболевании (АХЗ), например анемией при хронической болезни почек (ХБП), анемией при раке или анемией при воспалении. В варианте осуществления анемия является анемией, резистентной к эритропоэз-стимулирующему препарату (ЭСП), или железодефицитной анемией.

Настоящее изобретение относится к способу лечения анемии у пациента, включающему стадию

введения пациенту антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в настоящем изобретении. В вариантах осуществления анемия является анемией при хроническом заболевании (АХЗ), например анемией при хронической болезни почек (ХБП), анемией при раке или анемией при воспалении. В варианте осуществления анемия является анемией, резистентной к эритропоэз-стимулирующему препарату (ЭСП), или железодефицитной анемией. В вариантах осуществления пациент проходил или проходит лечение эритропоэз-стимулирующим препаратом (ЭСП), например эритропоэтином (ЕРО). В вариантах осуществления анемия является ЕРО-гипореактивной анемией. В вариантах осуществления анемия является железодефицитной анемией. В вариантах осуществления пациент является пациентом на хроническом гемодиализе.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу ингибирования ВМР6 у пациента, где способ включает стадию введения пациенту эффективного количества композиции, включающей антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению. В вариантах осуществления пациент страдает анемией. В вариантах осуществления анемия является анемией при хроническом заболевании (АХЗ), например анемией при хронической болезни почек (ХБП), анемией при раке или анемией при воспалении. В варианте осуществления анемия является анемией, резистентной к эритропоэз-стимулирующему препарату (ЭСП), или железодефицитной анемией. В вариантах осуществления пациент проходил или проходит лечение эритропоэз-стимулирующим препаратом (ЭСП), например эритропоэтином (ЕРО). В вариантах осуществления анемия является ЕРО-гипореактивной анемией. В вариантах осуществления анемия является железодефицитной анемией. В вариантах осуществления пациент является пациентом на хроническом гемодиализе.

Настоящее изобретение также относится к способу уменьшения активности ВМР6 в клетке, включающему стадию контакта клетки с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом согласно изобретению.

Настоящее изобретение дополнительно относится к способу повышения уровней железа в сыворотке, насыщения трансферрина (TSAT), содержания гемоглобина в ретикулоцитах (CHr), количества ретикулоцитов, количества эритроцитов, гемоглобина и/или гематокрита у пациента, включающему стадию введения пациенту эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента согласно изобретению.

Настоящее изобретение дополнительно относится к способу повышения или поддержания уровня гемоглобина у пациента, включающему введение пациенту антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в настоящем изобретении. В вариантах осуществления пациент страдает анемией. В вариантах осуществления анемия является анемией при хроническом заболевании (АХЗ), например анемией при хронической болезни почек (ХБП), анемией при раке или анемией при воспалении. В варианте осуществления анемия является анемией, резистентной к эритропоэз-стимулирующему препарату (ЭСП), или железодефицитной анемией. В вариантах осуществления пациент проходил или проходит лечение эритропоэз-стимулирующим препаратом (ЭСП), например эритропоэтином (ЕРО). В вариантах осуществления анемия является ЕРО-гипореактивной анемией. В вариантах осуществления анемия является железодефицитной анемией. В вариантах осуществления пациент является пациентом на хроническом гемодиализе. В вариантах осуществления способ дополнительно включает уменьшение требуемой дозы препарата железа у пациента, уменьшение требуемой дозы ЕРО у пациента или уменьшение у пациента требуемой дозы препарата железа и требуемой дозы ЕРО, по сравнению с указанной требуемой дозой ЕРО и/или требуемой дозой препарата железа в отсутствие лечения антителом или антигенсвязывающим фрагментом, описанными в настоящем изобретении. В вариантах осуществления уровень гемоглобина увеличивается или сохраняется на уровне по меньшей мере приблизительно 10,0, по меньшей мере приблизительно 11,0 или по меньшей мере приблизительно 12,0 г/дл. В вариантах осуществления уровень гемоглобина увеличивается или сохраняется на уровне по меньшей мере 10,0, по меньшей мере 11,0 или по меньшей мере 12,0 г/дл.

В любом из вышеуказанных способов стадия введения пациенту антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в настоящем изобретении, включает стадию введения пациенту композиции, которая включает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем изобретении.

В любом из вышеуказанных способов антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть введены в дозе 0,001-0,1 мг/кг, например в дозе 0,001, 0,0016, 0,0025, 0,0040, 0,0063, 0,01, 0,016, 0,025, 0,040, 0,063 или 0,1 мг/кг. В любом из вышеуказанных способов антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть введены в дозе от приблизительно 0,001 до приблизительно 0,1 мг/кг, например в дозе приблизительно 0,001 мг/кг, приблизительно 0,0016 мг/кг, приблизительно 0,0025 мг/кг, приблизительно 0,0040 мг/кг, приблизительно 0,0063 мг/кг, приблизительно 0,01 мг/кг, приблизительно 0,016 мг/кг, приблизительно 0,025 мг/кг, приблизительно 0,040 мг/кг, приблизительно 0,063 мг/кг или приблизительно 0,1 мг/кг.

В вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят внутривенно. В вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят подкожно. В вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят инфузией в течение от

приблизительно 30 до приблизительно 60 мин.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту к BMP6, включающим CDR, перечисленные в табл. 1. Настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту к BMP6, перечисленным в табл. 1. Настоящее изобретение относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему антитело или его антигенсвязывающий фрагмент к BMP6, включающим CDR, перечисленные в табл. 1. В одном варианте осуществления настоящего изобретения полинуклеотид или нуклеиновая кислота являются выделенными. В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент являются выделенными.

Определения

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, имеют такое же значение, под которым их обычно понимают средние специалисты в области техники, к которой относится настоящее изобретение.

"BMP6" при использовании в настоящем описании означает костный морфогенетический белок 6 (BMP6) или ген или нуклеиновую кислоту, кодирующие BMP6. Hahn et al. 1992 Genomics 14:759-62; Sauremann et al. 1993 J. Neurosci. Res. 33:142-7; NCBI Gene ID: 654. BMP6 также известен как: BMP-6; VGR; VGR1; Внешние ID OMIM: 112266 MGI: 88182; HomoloGene: 1300; GeneCards: ген BMP6. Оптологи: виды: человек: Entrez: 654; Ensembl: ENSG00000153162; UniProt: P22004; RefSeq (мПНК): NM_001718; RefSeq (белок): NP_001709; локализация (UCSC): Xp 6: 7,73-7,88 Мб; виды: мышь: Entrez: 12161; Ensembl: ENSMUSG00000039004; UniProt: P20722; RefSeq (мПНК): NM_007556; RefSeq (белок): NP_031582; локализация (UCSC): Xp 13: 38,35-38,5 Мб. Как описано в настоящем изобретении, антитело и его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с BMP6, связываются с белком BMP6.

"BMP2" при использовании в настоящем описании означает костный морфогенетический белок 2 (BMP2) или ген или нуклеиновую кислоту, кодирующие BMP2. BMP2 также известен как: BDA2; и BMP2A; Внешние ID OMIM: 112261 MGI: 88177 HomoloGene: 926 GeneCards: ген BMP2. виды: человек: Entrez: 650; Ensembl: ENSG00000125845; UniProt: P12643; RefSeq (мПНК): NM_001200; RefSeq (белок): NP_001191; локализация (UCSC): Xp 20: 6,75-6,76 Мб. Виды: мышь: Entrez: 12156; Ensembl: ENSMUSG00000027358; UniProt: P21274; RefSeq (мПНК): NM_007553; RefSeq (белок): NP_031579; локализация (UCSC): Xp 2: 133,55-133,56 Мб. Как описано в настоящем изобретении, антитело и его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с BMP2, связываются с белком BMP2.

"BMP5" при использовании в настоящем описании означает костный морфогенетический белок 5 (BMP5) или ген или нуклеиновую кислоту, кодирующие BMP5. BMP5 также известен как: MGC34244; Внешние ID OMIM: 112265 MGI: 88181 HomoloGene: 22412 GeneCards: ген BMP5. Виды: человек: Entrez: 653; Ensembl: ENSG00000112175; UniProt: P22003; RefSeq (мПНК): NM_021073; RefSeq (белок): NP_066551; локализация (UCSC): Xp 6: 55,62-55,74 Мб. Виды: мышь: Entrez: 12160; Ensembl: ENSMUSG000000032179; UniProt: P49003; RefSeq (мПНК): NM_007555; RefSeq (белок): NP_031581; локализация (UCSC): Xp 9: 75,78-75,9 Мб. Как описано в настоящем изобретении, антитело и его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с BMP5, связываются с белком BMP5.

"BMP7" при использовании в настоящем описании означает костный морфогенетический белок 7 (BMP7) или ген или нуклеиновую кислоту, кодирующие BMP7. BMP7 также известен как: остеогенный белок 1; OP-1; Внешние ID OMIM: 112267 MGI: 103302 HomoloGene: 20410 GeneCards: Ген BMP7. Виды: человек: Entrez: 655; Ensembl: ENSG00000101144; UniProt: P18075; RefSeq (мПНК): NM_001719; RefSeq (белок): NP_001710; локализация (UCSC): Xp 20: 55,74-55,84 Мб. Виды: мышь: Entrez: 12162; Ensembl: ENSMUSG00000008999; UniProt: P23359; RefSeq (мПНК): NM_007557; RefSeq (белок): NP_031583; локализация (UCSC): Xp 2: 172,87-172,94 Мб. Как описано в настоящем изобретении, антитело и его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с BMP7, связываются с белком BMP7.

"Гепсидин" означает ген гепсидина или белок гепсидин, пептидный гормон. Гепсидин также известен как: HAMP (гепсидин противомикробный белок или пептид); HEPC; HFE2B; LEAP1 (LEAP-1); PLTR; OMIM: 606464; HomoloGene: 81623; GeneCards: Ген HAMP; Entrez 57817; Ensembl ENSG00000105697; UniProt P81172; RefSeq (мПНК) NM_021175; RefSeq (белок) NP_066998; локализация (UCSC) Xp 19: 35,77-35,78 Мб. Krause et al. FEBS Lett. 480: 147-150; и Pigeon et al. 2001 J. Biol. Chem. 276: 7811-9. См. также: Ganz 2003 Blood 102: 783-8; Roy et al. 2005 Curr. Opin. Hemat. 12: 107-111; Fleming et al. 2006 Semin. Liver Dis. 25: 411-9; Park et al. 2001 J. Biol. Chem. 276: 7806-10; Majore et al. 2002 Haematologica 87: 221-2; Kluver et al. 2002 J. Pept. Res. 59: 241-8; Hunter et al. 2002 J. Biol. Chem. 277: 37597-603; Weinstein et al. 2003 Blood 100: 3776-81; Nemeth et al. 2003 Blood 101: 2461-3; Roetto et al. 2003 Nat. Genet. 33: 21-2; Strausberg et al. 2003 Proc. Natl. Acad. Sci USA 99: 16899-903; Gehrke et al. 2003 Blood 102: 371-6; Merryweather-Clarke et al. 2004 Human Mol. Genet. 12:2241-7; Clark et al. 2003 Genome Res. 13: 2265-70; Roetto et al. 2004 Blood 103: 2407-9; Jacolot et al. 2004 Blood 103: 2835-40; и Ota et al. 2004 Nat. Genet. 36: 40-45.

"Анемия" при использовании в настоящем описании означает уменьшение количества эритроцитов или уменьшение количества гемоглобина или железа в крови, с пониженной способностью крови переносить кислород.

Анемия может быть диагностирована при использовании любого способа, известного в уровне техники, в том числе, в качестве неограничивающего примера, у мужчин при гемоглобине ниже приблизительно 130-140 г/л (13-14 г/дл) и у женщин ниже приблизительно 120-130 г/л (12-13 г/дл). Janz et al. 2013 Emerg. Med. Pract. 15: 1-15; и Smith 2010 Am. J. Man. Care 16 Supp. S59-66.

При использовании в настоящем описании термины "антитело к BMP6", "антитело против человеческого BMP6", "BMP6-связывающее антитело", "BMP6 антагонистическое антитело" и т.п. (и их антигенсвязывающие фрагменты) включают антитела (и их антигенсвязывающие фрагменты), которые связываются с белком BMP6.

Термины "антитело", "его антигенсвязывающий фрагмент", "антигенсвязывающая часть" и т.п. при использовании в настоящем описании включают полные антитела и их любой антигенсвязывающий фрагмент (т.е. "антигенсвязывающую часть") или одиночные цепи. Природное "антитело" представляет собой гликопротеин, содержащий по меньшей мере две тяжелых (H) цепи и два легких (L) цепи, связанные дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области тяжелой цепи (сокращенно указанной в настоящем описании как VH) и константной области тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи состоит из трех доменов - CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь состоит из вариабельной области легкой цепи (сокращенно указанной в настоящем описании как VL) и константной области легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена, CL. VH и VL области могут быть далее подразделены на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), чередующимися с областями, которые являются наиболее консервативными, называемыми каркасными областями (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от N-конца до C-конца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Вариабельные области тяжелых и легких цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с собственными тканями или факторами, в том числе различными клетками иммунной системы (например, эффекторными клетками) и первым компонентом (C1q) классической системы комплемента.

Термины "антигенсвязывающий фрагмент", "его антигенсвязывающий фрагмент", "антигенсвязывающая часть" антитела и т.п. при использовании в настоящем описании относятся к одному или более фрагментам интактного антитела, которые сохраняют способность специфично связываться с данным антигеном (например, BMP6). Антигенсвязывающие функции антитела могут обеспечивать фрагменты интактного антитела. Примеры связывающих фрагментов, охваченных термином "антигенсвязывающая часть" антитела, включают Fab-фрагмент, моновалентный фрагмент, состоящий из VL, VH, CL и CH1 доменов; F(ab)₂ фрагмент, бивалентный фрагмент, включающий два Fab-фрагмента, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; Fd-фрагмент, состоящий из VH и CH1 доменов; Fv-фрагмент, состоящий из VL и VH доменов одного плеча антитела; однодоменный фрагмент (dAb) антитела (Ward et al., 1989 Nature 341:544-546), который состоит из VH домена; и выделенную определяющую комплементарность область (CDR).

Кроме того, хотя два домена Fv-фрагмента, VL и VH, кодируют отдельные гены, они могут быть соединены при использовании рекомбинантных методов, с помощью искусственного пептидного линкера, который обеспечивает их синтез в виде одной белковой цепи, в которой VL и VH области спарены с образованием моновалентных молекул (известных как одноцепочечный Fv (scFv); см., например, Bird et al., 1988 Science 242:423-426; и Huston et al., 1988 Proc. Natl. Acad. Sci. 85:5879-5883). Такие одноцепочечные антитела включают одну или несколько "антигенсвязывающих частей" антитела. Такие фрагменты антител получают с применением стандартных способов, известных специалистам в данной области, при этом фрагменты проверяют на пригодность таким же образом, как интактные антитела.

Антигенсвязывающие части также могут быть включены в однодоменные антитела, макситела, минитела, интралела, диалела, триалела, тетралела, v-NAR и бис-scFv (см., например, Hollinger and Hudson, 2005, Nature Biotechnology, 23, 9, 1126-1136). Антигенсвязывающие части антител могут быть перевиты в скаффолды на основе полипептидов, таких как фибронектин III типа (Fn3) (см. патент США 6703199, в котором описаны монотела на основе фибронектиновых полипептидов).

Антигенсвязывающие части могут быть включены в одноцепочечные молекулы, включающие пару tandemных Fv сегментов (VH-CH1-VH-CH1), которые вместе с комплементарными полипептидами легкой цепи формируют пару антигенсвязывающих областей (Zapata et al., 1995 Protein Eng. 8 (10):1057-1062; и патент США 5641870).

При использовании в настоящем описании термин "аффинность" относится к силе взаимодействия между антителом и антигеном на одиночных антигенных участках. В каждом антигенном участке вариабельная область "плеча" антитела взаимодействует посредством слабых нековалентных сил с антигеном на множестве участков; чем больше взаимодействий, тем сильнее аффинность.

При использовании в настоящем описании термин "авидность" относится к информативному показателю общей стабильности или прочности комплекса антигена-антитела. Она зависит от трех основных факторов: аффинности антитела к эпитопу; валентности антигена и антитела; и структурного расположения взаимодействующих частей. В конечном счете, эти факторы определяют специфичность антитела, то есть вероятность, что конкретное антитело свяжется с определенным эпитопом антигена.

Термин "аминокислота" относится к природным и синтетическим аминокислотам, а также аналогам аминокислот и миметикам аминокислот, которые функционируют подобно природным аминокислотам. Природные аминокислоты являются аминокислотами, кодируемыми генетическим кодом, а также теми аминокислотами, которые подвергаются последующей модификации, например, гидроксипролин, гамма-карбоксиглутамат и О-фосфосерин. Аналоги аминокислот относятся к соединениям, которые имеют такую же основную химическую структуру, как и природная аминокислота, т.е. альфа-атом углерода, связанный с водородом, карбоксильная группа, аминогруппа и R группа, например, гомосерин, норлейцин, метионин сульфоксид, метионин метилсульфоний. Такие аналоги имеют модифицированные группы R (например, норлейцин) или модифицированные пептидные скелеты, но сохраняют такую же основную химическую структуру, как у природной аминокислоты. Миметики аминокислот относятся к химическим соединениям, которые имеют структуру, которая отличается от общей химической структуры аминокислоты, но которая функционирует аналогично природной аминокислоте.

Термин "специфичность связывания" при использовании в настоящем описании относится к способности отдельного паратопа антитела реагировать только с одной антигенной детерминантой. Паратоп антитела расположен в Fab части молекулы и сформирован из гипервариабельных областей тяжелой и легкой цепей. Аффинность связывания антитела является силой взаимодействия между одной антигенной детерминантой и одним паратопом на антителе. Это сумма притягивающих и отталкивающих сил, действующих между антигенной детерминантой и паратопом антитела.

Специфическое связывание между двумя молекулами означает связывание с константой равновесия (КА или K_A) по меньшей мере $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, 10^8 M^{-1} , 10^9 M^{-1} , 10^{10} M^{-1} или 10^{11} M^{-1} . Фраза "специфично (или селективно) связывается" с антителом (например, ВМР6-связывающим антителом) относится к реакции связывания, которая определяет присутствие когнатного антигена (например, человеческого белка ВМР6) в гетерогенной популяции белков и других биологических препаратов. В дополнение к константе равновесия (КА), отмеченной выше, ВМР6-связывающее антитело согласно изобретению, как правило, также имеет константу скорости диссоциации (K_d или K_D или K_D) приблизительно $1 \times 10^{-2} \text{ c}^{-1}$, $1 \times 10^{-3} \text{ c}^{-1}$ или ниже, и связывается с ВМР6 с аффинностью, которая по меньшей мере в два раза больше, чем его аффинность при связывании с неспецифическим антигеном (например, ВМР2, ВМР5 или ВМР7). Фразы "антитело, распознающее антиген" и "антитело, специфичное к антигену" используются в настоящем описании попеременно с термином "антитело, которое специфично связывается с антигеном".

Специфическое связывание между двумя молекулами означает связывание с константой равновесия (КА) (k_{on}/k_{off}) по меньшей мере 10^2 M^{-1} , по меньшей мере $5 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$, по меньшей мере 10^3 M^{-1} , по меньшей мере $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, по меньшей мере 10^4 M^{-1} , по меньшей мере $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, по меньшей мере 10^5 M^{-1} , по меньшей мере $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, по меньшей мере 10^6 M^{-1} , по меньшей мере $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, по меньшей мере 10^7 M^{-1} , по меньшей мере $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, по меньшей мере 10^8 M^{-1} , по меньшей мере $5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, по меньшей мере 10^9 M^{-1} , по меньшей мере $5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, по меньшей мере 10^{10} M^{-1} , по меньшей мере $5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$, по меньшей мере 10^{11} M^{-1} , по меньшей мере $5 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$, по меньшей мере 10^{12} M^{-1} , по меньшей мере $5 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}$, по меньшей мере 10^{13} M^{-1} , по меньшей мере $5 \times 10^{13} \text{ M}^{-1}$, по меньшей мере 10^{14} M^{-1} , по меньшей мере $5 \times 10^{14} \text{ M}^{-1}$, по меньшей мере 10^{15} M^{-1} или по меньшей мере $5 \times 10^{15} \text{ M}^{-1}$.

Термин "химерное антитело" (или его антигенсвязывающий фрагмент) является молекулой антитела (или его антигенсвязывающим фрагментом), в котором: (а) константная область или ее часть изменена, заменена или замещена так, чтобы антигенсвязывающий участок (вариабельная область) был связан с константной областью другого или измененного класса, эффекторной функции и/или биологического вида или совершенно другой молекулой, которая придает новые свойства химерному антителу, например, ферментом, токсином, гормоном, фактором роста, лекарственным средством и т.д.; или (б) вариабельная область или ее часть изменена, заменена или замещена вариабельной областью, имеющей другую или измененную антигенную специфичность. Например, антитело мыши может быть модифицировано путем замены его константной области константной областью из человеческого иммуноглобулина. В результате замены человеческой константной областью, химерное антитело может сохранять свою специфичность при распознавании антигена одновременно с уменьшением антигенности у человека по сравнению с исходным мышинным антителом.

Термин "консервативно модифицированный вариант", относится как к аминокислотным последовательностям, так и к последовательностям нуклеиновых кислот. В отношении конкретных последовательностей нуклеиновых кислот консервативно модифицированные варианты относятся к таким нуклеиновым кислотам, которые кодируют идентичные или по существу идентичные аминокислотные последовательности, или, в том случае, когда нуклеиновая кислота не кодирует аминокислотную последовательность, к по существу идентичным последовательностям. Из-за вырожденности генетического кода большое количество функционально идентичных нуклеиновых кислот кодирует тот или иной белок. Например, все кодоны GCA, GCC, GCG и GCU кодируют аминокислоту аланин. Таким образом, в каждом положении, в котором аланин определен кодоном, кодон может быть изменен на любой из соответствующих описанных кодонов без изменения кодируемого полипептида. Такие вариации нуклеиновых кислот являются "молчащими вариациями", которые являются одной из разновидностей консервативно моди-

фицированных вариаций. Каждая последовательность нуклеиновой кислоты в настоящем описании, которая кодирует полипептид, также описывает каждую возможную молчащую вариацию нуклеиновой кислоты. Специалисту в данной области будет очевидно, что каждый кодон в нуклеиновой кислоте (кроме AUG, который обычно является единственным кодоном для метионина, и TGG, который обычно является единственным кодоном для триптофана) может быть изменен с получением функционально идентичной молекулы. Таким образом, каждая молчащая вариация нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид, неявно подразумевается в каждой описанной последовательности.

В случае полипептидных последовательностей "консервативно модифицированные варианты" включают отдельные замены, делеции или дополнения в полипептидную последовательность, которые приводят к замене аминокислоты химически подобной аминокислотой. Таблицы консервативных замен, в которых представлены функционально подобные аминокислоты, известны в уровне техники. Такие консервативно модифицированные варианты представлены дополнительно и не исключают полиморфные варианты, межвидовые гомологи и аллели согласно изобретению. Следующие восемь групп содержат аминокислоты, которые являются консервативными заменами друг для друга: 1) аланин (A), глицин (G); 2) аспарагиновая кислота (D), глутаминовая кислота (E); 3) аспарагин (N), глутамин (Q); 4) аргинин (R), лизин (K); 5) изолейцин (I), лейцин (L), метионин (M), валин (V); 6) фенилаланин (F), тирозин (Y), триптофан (W); 7) серин (S), треонин (T); и 8) цистеин (C), метионин (M) (см., например, Creighton, *Proteins* (1984)). В одном варианте осуществления термин "консервативные модификации последовательности" используется для обозначения аминокислотных модификаций, которые не оказывают значительного влияния или не вызывают значительного изменения характеристик связывания антитела, содержащего аминокислотную последовательность.

Термин "блокирует" при использовании в настоящем описании относится к остановке или предотвращению взаимодействия или процесса, например остановке лиганд-зависимой или лиганд-независимой сигнализации.

Термин "распознает" при использовании в настоящем описании относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые находят и взаимодействуют (например, связываются) с их конформационным эпитопом.

Термины "перекрестно блокирует", "перекрестно блокированный", "перекрестно блокирующий", "конкурирует", "перекрестно конкурирует" и родственные термины используются в настоящем описании попеременно для обозначения способности антитела или другого связывающего средства нарушать связывание других антител или связывающих средств с BМР6 в стандартном анализе конкурентного связывания.

Способность или степень, в которой антитело или другое связывающее средство способно нарушать связывание другого антитела или связывающей молекулы с BМР6, и поэтому можно говорить, что оно перекрестно блокирует согласно изобретению, могут быть определены при использовании стандартных анализов конкурентного связывания. Один подходящий анализ включает применение технологии BiaCore (например, при использовании прибора BIAcore 3000 (BiaCore, Uppsala, Sweden)), которая позволяет измерять степень взаимодействий при использовании технологии поверхностного плазмонного резонанса. В другом анализе для измерения перекрестного блокирования используется метод на основе ELISA.

Термин "нейтрализует" означает, что антитело при связывании со своей мишенью уменьшает активность, уровень или стабильность мишени; например, антитело к BМР6 при связывании с BМР6 нейтрализует BМР6 с уменьшением, по меньшей мере частичным, активности, уровня или стабильности BМР6, например, сигнализации или его роли в уровнях гепсидина и анемии.

Термин "эпитоп" означает белковую детерминанту, способную к специфичному связыванию с антителом. Эпитопы обычно состоят из химически активных поверхностных групп молекул, таких как аминокислоты или боковые цепи сахаров, и обычно имеют специфические трехмерные структурные характеристики, а также специфические зарядовые характеристики. Конформационные и неконформационные эпитопы отличаются тем, что связывание с первыми, но не последними, теряется в присутствии денатурирующих растворителей.

Термин "эпитоп" включает любую белковую детерминанту, способную к специфичному связыванию с иммуноглобулином или иному взаимодействию с молекулой. Эпитопные детерминанты обычно состоят из химически активных поверхностных групп молекул, таких как аминокислоты BМР6 или углеводные или сахарные боковые цепи, и могут иметь специфические трехмерные структурные характеристики, а также специфические зарядовые характеристики. Эпитоп может быть "линейным" или "конформационным".

Термин "линейный эпитоп" относится к эпитопу, в котором все точки взаимодействия между белком и взаимодействующей молекулой (такой как антитело) расположены линейно по первичной аминокислотной последовательности (непрерывного) белка.

При использовании в настоящем описании термин "высокая аффинность" применительно к антителу IgG относится к антителу, имеющему $KD 10^{-8}$ М или меньше, 10^{-9} М или меньше или 10^{-10} М или 10^{-11} М или меньше в отношении антигена-мишени, например BМР6. Впрочем "высокая аффинность" связы-

вания может изменяться для других изотипов антитела. Например, "высокая аффинность", связывания для изотипа IgM относится к антителу, имеющему KD 10^{-7} М или меньше или 10^{-8} М или меньше.

Предполагается, что термин "человеческое антитело" (или его антигенсвязывающий фрагмент) при использовании в настоящем описании включает антитела (и их антигенсвязывающие фрагменты), имеющие переменные области, в которых каркасные и CDR области получены из последовательностей человеческого происхождения. Кроме того, если антитело содержит константную область, константная область также получена из таких человеческих последовательностей, например, человеческих последовательностей зародышевой линии или мутантных вариантов человеческих последовательностей зародышевой линии. Человеческие антитела и их антигенсвязывающие фрагменты согласно изобретению могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые человеческими последовательностями (например, мутации, введенные в результате случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или соматической мутации *in vivo*).

Фразы "моноклональное антитело" или "композиция моноклонального антитела" (или его антигенсвязывающего фрагмента) при использовании в настоящем описании относятся к полипептидам, включающим антитела, фрагменты антител, биспецифические антитела и т.д., которые имеют по существу идентичные аминокислотные последовательности или получены из одного генетического источника. Данный термин также включает препараты молекул антитела одного молекулярного состава. Композиция моноклонального антитела демонстрирует одну специфичность связывания и аффинность к конкретному эпитопу.

Термин "человеческое моноклональное антитело" (или его антигенсвязывающий фрагмент) относится к антителам (и их антигенсвязывающим фрагментам), демонстрирующим одну специфичность связывания, которые имеют переменные области, в которых каркасные и CDR области получены из человеческих последовательностей. В одном варианте осуществления человеческие моноклональные антитела синтезированы гибридомой, которая включает В-клетку, полученную из трансгенного, не относящегося к человеку животного, например трансгенной мыши, имеющей геном, включающий человеческий трансген тяжелой цепи и трансген легкой цепи, слитую с иммортализованной клеткой.

Фраза "рекомбинантное человеческое антитело" (или его антигенсвязывающий фрагмент) при использовании в настоящем описании включает все человеческие антитела (и их антигенсвязывающие фрагменты), которые получены, экспрессированы, созданы или выделены с помощью генно-инженерных методов, такие как антитела, выделенные из животного (например, мыши), которое является трансгенным или трансхромосомным по человеческим генам иммуноглобулина, или гибридомы, полученной из него, антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансформированной для экспрессии человеческого антитела, например, из трансфектомы, антитела, выделенные из рекомбинантной, комбинаторной библиотеки человеческих антител, и антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любыми другими способами, которые включают сплайсинг всего или части человеческого гена иммуноглобулина, последовательностей с другими последовательностями ДНК. Такие рекомбинантные человеческие антитела имеют переменные области, в которых каркасные и CDR области получены из человеческих иммуноглобулиновых последовательностей зародышевой линии. В одном варианте осуществления такие рекомбинантные человеческие антитела могут быть подвергнуты *in vitro* мутагенезу (или, в случае использования животного, трансгенного по человеческим Ig последовательностям, *in vivo* соматическому мутагенезу), и, таким образом, аминокислотные последовательности VH и VL областей рекомбинантных антител являются последовательностями, которые, одновременно с тем, что они получены из и относятся к человеческим последовательностям VH и VL зародышевой линии, могут не существовать в природе в рамках репертуара человеческих антител зародышевой линии *in vivo*.

"Гуманизированное" антитело (или его антигенсвязывающий фрагмент) при использовании в настоящем описании является антителом (или его антигенсвязывающим фрагментом), которое сохраняет реактивность нечеловеческого антитела при меньшей иммуногенности у людей. Это может быть достигнуто, например, при сохранении нечеловеческих CDR-областей и замене оставшихся частей антитела их человеческими аналогами (т.е. константной области, а также каркасных частей переменной области). См., например, Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855, 1984; Morrison and Oi, Adv. Immunol., 44:65-92, 1988; Verhoeven et al., Science, 239:1534-1536, 1988; Padlan, Molec. Immun., 28:489-498, 1991; и Padlan, Molec. Immun., 31:169-217, 1994. Другие примеры технологии человеческой инженерии включают, без ограничения, технологию Хота, раскрытую в патенте США 5766886.

Термины "идентичный" или процент "идентичности", в отношении двух или более последовательностей нуклеиновых кислот или полипептидных последовательностей, относятся к двум или более последовательностям или субпоследовательностям, которые являются одинаковыми. Две последовательности "по существу идентичны", если две последовательности содержат указанный процент аминокислотных остатков или нуклеотидов, которые являются одинаковыми (т.е. 60% идентичность, необязательно 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 99% идентичность на протяжении указанной области, или, если не указано, на протяжении всей последовательности), в случае сравнения и выравнивания с максимальным соответствием в окне сравнения или указанной области, при измерении с использованием одного из следующих алгоритмов сравнения последовательностей или выравнивания вручную и визуального просмотра. Не-

обязательно идентичность присутствует в области, которая имеет длину по меньшей мере приблизительно 50 нуклеотидов (или 10 аминокислот), или более предпочтительно в области, которая имеет длину 100-500 или 1000 или более нуклеотидов (или 20, 50, 200 или более аминокислот). Необязательно идентичность присутствует в области, которая имеет длину по меньшей мере 50 нуклеотидов (или 10 аминокислот), или более предпочтительно в области, которая имеет длину 100-500 или 1000 или более нуклеотидов (или 20, 50, 200 или более аминокислот).

Для сравнения последовательностей, как правило, одна последовательность выступает в качестве референсной последовательности, с которой сравнивают анализируемые последовательности. При использовании алгоритма сравнения последовательностей анализируемые и референсные последовательности вводят в компьютер, при необходимости определяют координаты субпоследовательностей и устанавливают программные параметры алгоритма анализа последовательностей. Могут использоваться программные параметры по умолчанию, или могут быть установлены альтернативные параметры. Алгоритм сравнения последовательностей затем вычисляет проценты идентичности последовательностей для анализируемых последовательностей по отношению к референсной последовательности, на основе программных параметров.

"Окно сравнения" при использовании в настоящем описании включает ссылку на сегмент из любого количества смежных положений, выбранного из группы, состоящей из от 20 до 600, обычно от приблизительно 50 до приблизительно 200, чаще от приблизительно 100 до приблизительно 150, в котором последовательность может сравниваться с референсной последовательностью с тем же количеством смежных положений, после того как две последовательности были оптимально выровнены. Методы выравнивания последовательностей для сравнения известны в уровне техники. Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения может быть проведено, например, с помощью алгоритма локальной гомологии Смита и Ватермана (Smith and Waterman (1970) *Adv. Appl. Math.* 2:482с), алгоритма выравнивания гомологии Нидлмана и Вунша (Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443, 1970), метода поиска подобия Пирсона и Липмана (Pearson and Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444, 1988), компьютерных реализаций указанных алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в пакете программ Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), или с помощью выравнивания вручную и визуального просмотра (см., например, Brent et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. (ringbou ed., 2003)).

Двумя примерами алгоритмов, которые подходят для определения процента идентичности последовательностей и подобия последовательностей, являются алгоритмы BLAST и BLAST 2.0, которые описаны в Altschul et al., *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402, 1977; и Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-410, 1990 соответственно. Программа для выполнения анализов BLAST общедоступна через Национальный центр биотехнологической информации. Этот алгоритм включает сначала идентификацию пар последовательностей с высокими оценками (HSP) при определении коротких слов длиной W в запрашиваемой последовательности, которая соответствует или удовлетворяет некоторой пороговой оценке T с положительным значением при выравнивании со словом такой же длины в последовательности из базы данных. T называется порогом оценки ближайших слов (Altschul et al., выше). Такие начальные совпадения ближайших слов действуют, как сходные точки для инициирования поисков с целью найти более протяженные HSP последовательности, содержащие их. Совпавшие слова продлевают в обоих направлениях вдоль каждой последовательности до тех пор, пока может увеличиваться совокупная оценка выравнивания. Совокупную оценку вычисляют при использовании, в случае нуклеотидных последовательностей, параметров M (поощрительная оценка для пары совпадающих остатков; всегда >0) и N (штрафная оценка для несовпадающих остатков; всегда <0). В случае аминокислотных последовательностей для вычисления совокупной оценки используется матрица замен. Продолжение совпадающих слов в каждом направлении останавливают, если: совокупная оценка выравнивания уменьшается на величину X от ее максимального достигнутого значения; совокупная оценка падает до нуля или ниже из-за накопления одного или более отрицательно оцениваемых выравниваний остатков; или достигнут конец любой последовательности. Параметры алгоритма BLAST W, T и X определяют чувствительность и скорость выравнивания. В программе BLASTN (для нуклеотидных последовательностей) в качестве параметров по умолчанию используется wordlength (N) 11, expectation (E) 10, M=5, N=-4 и сравнение обеих цепей. Для аминокислотных последовательностей в программе BLASTP в качестве параметров по умолчанию используется wordlength 3 и expectation (E) 10, а также матрица замен BLOSUM62 (см. Henikoff and Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915, 1989) alignments (B) 50, expectation (E) 10, M=5, N=-4 и сравнение обеих цепей.

Алгоритм BLAST также выполняет статистический анализ подобия между двумя последовательностями (см., например, Karlin and Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5787, 1993). Одним из показателей подобия, которые дает алгоритм BLAST, является наименьшая суммарная вероятность (P(N)), которая обеспечивает показание вероятности, с которой случайно может возникнуть совпадение между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями. Например, нуклеиновую кислоту считают подобной референсной последовательности, если наименьшая суммарная вероятность при сравнении анализируемой нуклеиновой кислоты с референсной нуклеиновой кислотой составляет меньше чем приблизительно 0,2, более предпочтительно меньше чем приблизительно 0,01 и наиболее предпоч-

тительно меньше чем приблизительно 0,001.

Процент идентичности между двумя аминокислотными последовательностями также может быть определен при использовании алгоритма Ю. Мейерса и У. Миллера (E. Meyers and W. Miller, *Comput. Appl. Biosci.*, 4:11-17, 1988), который был включен в программу ALIGN (версии 2.0), при использовании таблицы весов замен остатков PAM120, штрафа за продление пропуска 12 и штрафа за пропуск 4. Кроме того, процент идентичности между двумя аминокислотными последовательностями может быть определен при использовании алгоритма Нидлмана и Вунша (Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:444-453, 1970), который был включен в программу GAP в пакете программ GCG (доступный по адресу www.gcg.com), с использованием матрицы Blossom 62 или матрицы PAM250, и веса пропуска 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4 и веса длины 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

Кроме процента идентичности последовательностей, отмеченного выше, другой показатель того, что две последовательности нуклеиновых кислот или полипептидов по существу идентичны, состоит в том, что полипептид, кодируемый первой нуклеиновой кислотой, является иммунологически перекрестно реактивным с антителами, индуцированными против полипептида, кодируемого второй нуклеиновой кислотой, как описано ниже. Таким образом, полипептид, как правило, по существу идентичен второму полипептиду, например, когда эти два пептида отличаются только консервативными заменами. Другой показатель того, что две последовательности нуклеиновых кислот являются по существу идентичными, состоит в том, что эти две молекулы или их комплементы гибридизуются друг с другом при строгих условиях, как описано ниже. Еще один показатель того, что две последовательности нуклеиновых кислот являются по существу идентичными, состоит в том, что одни и те же праймеры могут использоваться для амплификации последовательности.

Термин "выделенное антитело" (или его антигенсвязывающий фрагмент) при использовании в настоящем описании относится к антителу (или его антигенсвязывающему фрагменту), которое по существу не содержит других антител, обладающих разными антигенными специфичностями (например, выделенное антитело, которое специфично связывает BMP6, по существу не содержит антител, которые специфично связывают другие антигены кроме BMP6). Кроме того, выделенное антитело может по существу не содержать другого клеточного материала и/или химических соединений.

Термин "изотип" относится к классу антитела (например, IgM, IgE, IgG, такому как IgG1 или IgG4), который обеспечивают гены константной области тяжелой цепи. Изотип также включает модифицированные варианты одного из этих классов, где модификации были сделаны для изменения функции Fc, например, для увеличения или уменьшения эффекторных функций или связывания с Fc-рецепторами.

Термин "Kassoc" или "Ka", или "KA", или "K_A" при использовании в настоящем описании, как предполагается, относится к скорости ассоциации при конкретном взаимодействии антитела-антигена, тогда как термин "Kdis" или "Kd" при использовании в настоящем описании, как предполагается, относится к скорости диссоциации при конкретном взаимодействии антитела-антигена. В одном варианте осуществления термин "K_D" при использовании в настоящем описании, как предполагается, относится к константе диссоциации, которую получают из отношения Kd к Ka (т.е. Kd/Ka) и выражают в молярной концентрации (M). Значения K_D для антител могут быть определены при использовании способов, хорошо известных в уровне техники. Способ определения K_D антитела проводят при использовании поверхностного плазмонного резонанса или при использовании биосенсорной системы, такой как система Biacore®.

Термины "моноклональное антитело" (или его антигенсвязывающий фрагмент) или "композиция моноклонального антитела" (или его антигенсвязывающего фрагмента) при использовании в настоящем описании относятся к получению молекулы антитела (или его антигенсвязывающего фрагмента) одно-молекулярной композиции. Композиция моноклонального антитела демонстрирует моносpezifичность связывания и аффинность к конкретному эпитопу.

Термин "нуклеиновая кислота" используется в настоящем описании наравне с термином "полинуклеотид" и относится к дезоксирибонуклеотидам или рибонуклеотидам и их полимерам или в одно- или в двухцепочечной форме. Термин охватывает нуклеиновые кислоты, содержащие известные аналоги нуклеотидов или модифицированные остатки скелета или связи, которые являются синтетическими, природными и не встречающимися в природе, которые обладают аналогичными связывающими свойствами, как референсная нуклеиновая кислота, и которые метаболизируются аналогично референсным нуклеотидам. Примеры таких аналогов включают, без ограничения перечисленными, фосфоротиоаты, фосфорамидаты, метилфосфонаты, хиральные метилфосфонаты, 2-О-метил рибонуклеотиды, пептид-нуклеиновые кислоты (ПНК).

Если не указано иное, конкретная последовательность нуклеиновой кислоты также неявным образом охватывает соответствующие консервативно модифицированные варианты (например, замены вырожденных кодонов) и комплементарные последовательности, а также прямо указанную последовательность. В частности, как подробно показано ниже, замены вырожденных кодонов могут быть получены при создании последовательностей, в которых третье положение одного или нескольких выбранных (или всех) кодонов заменено смешанным основанием и/или остатками дезоксиинозина (Batzer et al., *Nucleic Acid Res.* 19:5081, 1991; Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608, 1985; и Rossolini et al., *Mol. Cell.*

Probes 8:91-98, 1994).

Термин "функционально связанный" относится к функциональному отношению между двумя или более полинуклеотидными сегментами (например, ДНК). Как правило, это относится к функциональному отношению регулирующей транскрипцию последовательности и транскрибируемой последовательности. Например, последовательность промотора или энхансера функционально связана с кодирующей последовательностью, если она стимулирует или модулирует транскрипцию кодирующей последовательности в соответствующей клетке-хозяине или другой системе экспрессии. Обычно регулирующие транскрипцию промоторные последовательности, которые функционально связаны с транскрибируемой последовательностью, физически контактируют с транскрибируемой последовательностью, т.е. они являются *цис-действующими*. Однако некоторые регулирующие транскрипцию последовательности, такие как энхансеры, не должны физически контактировать или располагаться в непосредственной близости с кодирующими последовательностями, транскрипцию которых они усиливают.

При использовании в настоящем описании термин "оптимизированный" означает, что нуклеотидная последовательность была изменена, чтобы кодировать аминокислотную последовательность с использованием кодонов, которые предпочтительны в продуцирующей клетке или организме, обычно эукариотической клетке, например клетке *Pichia*, клетке яичника китайского хомячка (СНО) или клетке человека. Оптимизированная нуклеотидная последовательность сконструирована с полным или максимально возможным сохранением аминокислотной последовательности, первоначально кодируемой исходной нуклеотидной последовательностью, которая также известна как "родительская" последовательность. Оптимизированные последовательности в настоящем изобретении были сконструированы с кодонами, которые предпочтительны в клетках млекопитающих. Однако оптимизированная экспрессия этих последовательностей в других эукариотических клетках или прокариотических клетках также предусмотрена в настоящем изобретении. Аминокислотные последовательности, кодируемые оптимизированными нуклеотидными последовательностями, также указаны как оптимизированные.

Термины "полипептид" и "белок" попеременно используются в настоящем описании для обозначения полимера из аминокислотных остатков. Данные термины относятся к полимерам из аминокислот, в которых один или более аминокислотных остатков являются искусственными химическими миметиками соответствующей природной аминокислоты, а также к природным полимерам из аминокислот и не встречающемуся в природе полимеру из аминокислот. Если не указано иное, конкретная полипептидная последовательность также неявным образом охватывает соответствующие консервативно модифицированные варианты.

Термин "рекомбинантное человеческое антитело" (или его антигенсвязывающий фрагмент) при использовании в настоящем описании включает все человеческие антитела (и их антигенсвязывающие фрагменты), которые получены, экспрессированы, созданы или выделены с помощью рекомбинантных методов, такие как антитела, выделенные из животного (например, мыши), которое является трансгенным или трансхромосомным по человеческим иммуноглобулиновым генам, или гибридомы, полученной из них, антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансформированной для экспрессии человеческого антитела, например, из трансфектомы, антитела, выделенные из рекомбинантной, комбинаторной библиотеки человеческих антител, и антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные с помощью любых других способов, которые включают сплайсинг всей или части последовательностей человеческого иммуноглобулинового гена с другими последовательностями ДНК. Такие рекомбинантные человеческие антитела имеют вариабельные области, в которых каркасные и CDR области получены из человеческих иммуноглобулиновых последовательностей зародышевой линии. В одном варианте осуществления, тем не менее, такие рекомбинантные человеческие антитела могут быть подвергнуты *in vitro* мутагенезу (или, в случае использования животного, трансгенного по человеческим последовательностям Ig, *in vivo* соматическому мутагенезу), и, таким образом, аминокислотные последовательности VH и VL областей рекомбинантных антител являются последовательностями, которые, одновременно с тем, что они получены из и относятся к человеческим последовательностям VH и VL зародышевой линии, могут не существовать в природе в рамках репертуара человеческих антител зародышевой линии *in vivo*.

Термин "рекомбинантная клетка-хозяин" (или просто "клетка-хозяин") относится к клетке, в которую был введен рекомбинантный вектор экспрессии. Следует понимать, что такие термины, как предполагается, относятся не только к конкретной рассматриваемой клетке, но и к потомству такой клетки. Поскольку некоторые модификации могут происходить в последующих поколениях либо в результате мутации, либо из-за воздействий внешней среды, такое потомство может, фактически, не быть идентичным родительской клетке, но все еще включено в рамки термина "клетка-хозяин", используемого в настоящем описании.

Термин "пациент" включает человека и животных, не относящихся к человеку. Не относящиеся к человеку животные включают всех позвоночных, например, млекопитающих и не млекопитающих, таких как не относящиеся к человеку приматы, овцы, собака, корова, курица, амфибии и рептилии. Кроме тех случаев, когда указано отдельно, термины "пациент" или "пациент" используются в настоящем описании попеременно.

Термин "лечение" включает введение композиций или антител с целью предотвращения или задержки возникновения симптомов, осложнений или биохимических проявлений заболевания (например, анемии), облегчения симптомов или приостановки или ингибирования дальнейшего развития заболевания, состояния или нарушения. Лечение может быть профилактическим (с целью предотвращения или задержки возникновения заболевания или предотвращения проявления его клинических или субклинических симптомов) или терапевтическим подавлением или облегчением симптомов после проявления заболевания.

Термин "вектор" используется для обозначения полинуклеотидной молекулы, способной к транспортировке другого полинуклеотида, с которым он был связан. Одним из типов вектора является "плазмида", которая относится к кольцевой петле двухцепочечной ДНК, в которую могут быть лигированы дополнительные сегменты ДНК. Другим типом вектора является вирусный вектор, в котором дополнительные сегменты ДНК могут быть лигированы в вирусный геном. Некоторые векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они введены (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальную точку начала репликации и эписомные векторы млекопитающих). Другие векторы (например, неэписомные векторы млекопитающих) могут быть встроены в геном клетки-хозяина при введении в клетку-хозяина, и, таким образом, реплицируются вместе с геномом организма-хозяина. Кроме того, некоторые векторы способны направлять экспрессию генов, с которыми они функционально связаны. Такие векторы указаны в настоящем описании как "рекомбинантные векторы экспрессии" (или просто "векторы экспрессии"). Как правило, векторы экспрессии, которые могут быть использованы в методах рекомбинантных ДНК, часто находятся в форме плазмид. В настоящем описании "плазида" и "вектор" могут использоваться попеременно, поскольку плазида является наиболее часто используемой формой вектора. Впрочем, предполагается, что изобретение включает такие другие формы векторов экспрессии, такие как вирусные векторы (например, дефектные по репликации ретровирусы, аденовирусы и адено-ассоциированные вирусы), которые имеют эквивалентные функции.

Термин "гематокрит", используемый в настоящем описании, также известен как объем осажденных клеток (ОСК) или объемная доля эритроцитов (EVF) и является объемом (%) эритроцитов в крови. Обычно он составляет приблизительно 45% у мужчин и приблизительно 50% у женщин. Его считают неотъемлемой частью результатов общего анализа крови человека наряду с концентрацией гемоглобина, количеством лейкоцитов и количеством тромбоцитов. В одном варианте осуществления анемия относится к аномально низкому гематокриту, в противоположность полицитемии, которая является аномально высоким гематокритом.

Краткое описание фигур

На фиг. 1А показано ингибирование активности BMP антагонистическими антителами 5, 6 и 7 в анализе с репортерным геном. Показана активность против BMP2, BMP5, BMP6 и BMP7. На фиг. 1В показан анализ связывания ELISA, в котором исследовали связывание антитела 7 с человеческим BMP6, человеческим BMP7, человеческим BMP5, мышинным BMP6, hBaffR, BSA и Neu. На данной фигуре и других различных фигурах, и где-либо в настоящем описании: Ab 5=Антитело 5; Ab 6=Антитело 6 и Ab 7=Антитело 7.

На фиг. 2 показаны фармакодинамические профили в предварительном исследовании ФК на крысах при однократном введении дозы. Использовали антитела 5, 6 и 7. Уровни гепсидина и железа в сыворотке измеряли через 1, 6 ч, 1, 2, 4, 8, 16 дней после введения дозы (10 мг/кг, в/в).

На фиг. 3 показано дозозависимое действие антитела к BMP6 в отношении сывороточных биомаркеров метаболизма железа. Сверху: концентрация hIgG в сыворотке в динамике после однократной в/в инъекции антитела 6 в указанных дозах. Снизу: левая панель - количественный анализ концентрации гепсидина в сыворотке после однократной инъекции антитела 6 или контрольного IgG человека, и правая панель - концентрация железа в сыворотке.

На фиг. 4 показано терапевтическое применение антитела к BMP6 при ЭСП-резистентной анемии в модели воспаления на мышах. Сверху: экспериментальная схема ВА-индуцированной ЭСП-резистентной анемии в модели воспаления. Снизу: параметры эритропоэза через 13 дней после обработки ВА. HGB: гемоглобин; HCT: гематокрит; RETA: количество ретикулоцитов; RET-HE: эквивалентный гемоглобин ретикулоцитов. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ в сравнении с ВА+EPO+hIgG1.

На фиг. 5 показано картирование линейных эпитопов HDxMS (водород/дейтериевый обмен, сопряженный с масс-спектрометрией). Показан эпитоп BMP6, связываемый антителом 7 (остатки 88-102 человеческого BMP6 (QTLVHLMNPEYVPRK (SEQ ID NO: 92))). При использовании HDxMS было установлено, что антитело 676, гуманизированный вариант коммерчески доступного антитела к BMP6, связывалось с эпитопом, состоящим из остатков 23-35 BMP6 человека (VSSASDYNSSSELK (SEQ ID NO: 95)).

На фиг. 6 показан протокол 1-й части клинической программы исследования безопасности и эффективности антител к BMP6.

На фиг. 7 показано дерево решений с подбором дозы для клинической программы исследования безопасности и эффективности антител к BMP6.

На фиг. 8 показан протокол 2-й части клинической программы исследования безопасности и эффективности антител к BMP6.

На фиг. 9 показаны фармакокинетические профили при однократном введении дозы антитела 7 у самцов крыс.

На фиг. 10 показано дозозависимое действие антитела 7 в отношении сывороточных биомаркеров метаболизма железа у крыс. Показан количественный анализ концентрации гепсидина в сыворотке после однократной инъекции антитела 7 или контроля (растворитель) в указанной дозе. На панели слева показано увеличенное изображение действия в течение первых 24 ч после введения.

На фиг. 11 показано дозозависимое действие антитела 7 в отношении железа в сыворотке у крыс. Показан количественный анализ концентрации железа в сыворотке после однократной инъекции антитела 7 или контроля (растворитель) в указанной дозе. На панели слева показано увеличенное изображение действия в течение первых 24 часов после введения.

На фиг. 12 показан профиль зависимости концентрации от времени при однократной в/в инъекции дозы антитела 7 (3 мг/кг) у яванских макаков. На графике указана полная концентрация антитела 7 (свободного и ВМР6-связанного).

На фиг. 13 показана концентрация гепсидина и Fe в сыворотке у самцов яванских макаков после однократной внутривенной инъекции антитела 7 в дозе 3 мг/кг. Показаны данные трех разных обезьян, а также среднее.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфично связываются с белком ВМР6, а также фармацевтическим композициям, способам получения и способам применения таких антител и композиций.

Антитела к ВМР6 и их антигенсвязывающие фрагменты

Настоящее изобретение относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфично связываются с человеческим ВМР6.

ВМР6, секретлируемый лиганд-фактор роста семейства белков ВМР, был идентифицирован как важный эндогенный регулятор экспрессии в печени гепсидина, гормона, регулирующего метаболизм железа. Не связываясь с какой-либо конкретной теорией, в настоящем описании предложено антагонистическое антитело к ВМР6 в качестве гепсидин-понижающей терапии, которое предположительно будет эффективным у больных с железodefицитной анемией, обеспечивая преодоление резистентности к эритропоэз-стимулирующему препарату (ЭСП), которая вносит существенный вклад в тяжесть первопричинного заболевания и часто является прогностическим фактором неблагоприятного исхода заболевания.

Примерами таких антител против человеческого ВМР6 являются антитела 3, 5, 6 и 7, последовательности которых перечислены в табл. 1.

Все антитела 5, 6 и 7 связываются с высокой аффинностью с человеческим ВМР6, с высокой селективностью по сравнению с человеческим ВМР7, человеческим ВМР5 и человеческим ВМР2 (см. фиг. 1А). Все эти антитела также демонстрируют уменьшение гепсидина в сыворотке и увеличение железа в сыворотке у крыс (см. фиг. 2).

Чтобы предоставить новые свидетельства того, что воздействие на этот путь может приводить к улучшению функциональных конечных показателей, исследовали способность ВМР6-специфичных антител, Антител 5-7, модулировать сывороточные биомаркеры метаболизма железа у нормальных мышей и крыс, и способствовать устранению ЭСП-резистентной анемии в модели анемии при воспалении на мышцах. Было обнаружено, что однократная инъекция животным антитела к ВМР6 приводила к длительному увеличению уровней железа в сыворотке, сопровождаемому мощной супрессией циркулирующего гепсидина. Кроме того, терапевтическое лечение мышей, подвергнутых вызванной воспалением анемии, значительно улучшало эритропоэтические параметры в ответ на параллельное лечение эритропоэтином.

В настоящем описании ингибирование сигнализации ВМР6 в модели анемии при воспалении на мышцах существенно улучшало железозависимые эритроцитарные показатели.

Антагонистические антитела к ВМР6, раскрытые в настоящем изобретении, представляют новый терапевтический подход к безопасному улучшению состояния при анемии с пониженной чувствительностью к эритропоэтину. Без привязки к какой-либо конкретной теории, в настоящем описании предполагается, что это может произойти в результате мобилизации и доступности депо железа, требуемого в эритроидном компартменте.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к выделенным антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые связываются с более высокой в 100, 500 или 1000 раз аффинностью с человеческим белком ВМР6, чем с любым из: человеческого белка ВМР5 или человеческого белка ВМР7. Специфичность к ВМР6 без связывания с ВМР7 важна, поскольку нокаут ВМР6 не является летальным для мышей. Однако мыши с нокаутом ВМР7 погибают после рождения с нарушениями почек, глаз и костей. Отдельные нокауты какого-либо гена не вызывают изменений кардиогенеза, однако двойной нокаут ВМР6 и ВМР7 продемонстрировал несколько дефектов и задержек в развитии сердца; эмбрионы погибали от сердечной недостаточности. ВМР7 важен в предотвращении развития хронической болезни сердца, связанной с фиброзом. Таким образом, перекрестная реактивность антитела против ВМР6 с ВМР7 не желательна. Антитела, предложенные в настоящем изобретении, специфичны к ВМР6 по сравнению с ВМР7; см., например, табл. 4А. На фиг. 1В также показано подтверждение специфично-

сти связывания с человеческим BMP6 по сравнению с человеческими белками BMP2, BMP5 и BMP7. Напротив, было показано, что коммерчески доступное антитело к BMP6 (R&D Systems), например, обладает сильной перекрестной реактивностью к BMP7 в анализе с репортерным геном и одновременно ингибирует BMP6 и BMP7.

Антитела согласно изобретению включают, без ограничения, человеческие моноклональные антитела, выделенные, как описано в примерах (см. раздел 6 ниже).

Примерами таких антител против человеческого BMP6 являются антитела 3, 5, 6 и 7, последовательности которых перечислены в табл. 1.

Зрелое антитело 7 получено при удалении PTM на уровне зародышевой линии из NOV0442_VL (YGQ), которое получено из исходного IgG хита NOV0442 (VH3_3-15, VII_1e). Антитело 7 связывается с высокой аффинностью с человеческим BMP6 в анализе связывания ELISA, с 500-кратной селективностью по сравнению с человеческим BMP7 (т.е. аффинность к человеческому BMP6 в 500 раз больше, чем к человеческому BMP7). Это антитело также не имеет поддающейся обнаружению активности против человеческого BMP2 или BMP5. Пептид BMP6, распознаваемый исходным IgG NOV0442 и антителом 7, показан на фиг. 5. Пептид включает аминокислоты QTLVHLMNPEYVPKP (SEQ ID NO: 92) человеческого BMP6. В отличие от IgG NOV0442 и антитела 7, гуманизированное мАТ 507 (R&D Systems) связывается с последовательностью VSSASDYNSELK (SEQ ID NO: 95) человеческого BMP6. Таким образом, эпитоп, распознаваемый IgG NOV0442 и антителом 7, представляет собой новый эпитоп BMP6. Антитело 7 также ингибирует связывание BMP6 с рецепторами *in vitro*. Связывание BMP6 с BMPRIА максимально ингибировано на 59%; связывание с BMPRIВ максимально ингибировано на 85%; и связывание с RGM-с максимально ингибировано на 72%. Однократная обработка крыс в дозе 10 мг/кг приводила к длительной супрессии циркулирующего гепсидина. Расчетная минимальная эффективная доза у мышей меньше или равна 0,1 мг/кг. Железо в сыворотке также показало увеличение, а гепсидин показал уменьшение после однократной дозы антитела 3 мг/кг у обезьян. У мышей при использовании антигена *Brucella abortus* для моделирования анемии, результат лечения антителом 7 (2 мг/кг) согласуется с клинически значимым эритропоэтическим ответом на длительную терапию ЕРО с постепенным повышением гемоглобина >2,0 г/дл относительно исходного уровня.

В антителе 7 потенциальный участок посттрансляционной модификации был удален в результате мутации N51Q в LCDR2 для увеличения гомогенности последующего продукта. Антитело, полученное из VH3/лямбда1 каркаса, было сконструировано для соответствия ближайшей человеческой последовательности зародышевой линии: в VH с мутацией V40A, в VL с мутациями D1Q, I2S и введением аминокислот Y49 и G50 для восстановления каркаса, в котором первоначально отсутствовали эти 2 остатка.

Данная работа привела к созданию антитела 7 (=NOV0958=NOV0806_VH[V40A]_VL [D1Q, I2S, Y49, G50, N51Q]).

Все антитела 3, 5, 6 и 7 показывают высокую специфичность к человеческому белку BMP6 по сравнению с человеческими белками BMP2, BMP5 или BMP7. Эпитоп всех этих антител, как и было предсказано, один и тот же, поскольку все они получены из одного исходного Fab перед созреванием аффинности. Антитело 3, например, имеет общий Fab клон с обоими антителами 5 и 7 перед созреванием аффинности HCDR2. Антитело 5 получено из NOV0442 (VH3_3-15, VII_1e)→NOV0442_VL (YGQ)→(созревание аффинности HCDR2)→Антитело 5. Антитело 3 получено из NOV0442 (VH3_3-15, VII_1e)→NOV0442_VL (YGS)→(созревание аффинности HCDR2)→Антитело 3. Дополнительная подробная информация относительно получения антител, описанных в настоящем изобретении, представлена в примерах.

Настоящее изобретение относится к антителам, которые специфично связывают BMP6 (например, человеческий белок BMP6), при этом указанные антитела включают домен VH, перечисленный в табл. 1. Настоящее изобретение также относится к антителам, которые специфично связываются с белком BMP6, при этом указанные антитела включают VH CDR, имеющий аминокислотную последовательность любой из VH CDR, перечисленных в табл. 1. В частности, изобретение относится к антителам, которые специфично связываются с белком BMP6, при этом указанные антитела включают (или, в альтернативе, состоят из) одну, две, три, четыре, пять или более VH CDR, имеющих аминокислотную последовательность любой из VH CDR, перечисленных в табл. 1.

Изобретение также относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфично связываются с BMP6, при этом указанные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты включают (или, в альтернативе, состоят из) аминокислотную последовательность VH, перечисленную в табл. 1, где не больше чем приблизительно 10 аминокислот в каркасной последовательности (например, последовательности, которая не является CDR) были подвергнуты мутации (где мутация, в качестве различных неограничивающих примеров, является добавлением, заменой или делецией). Изобретение также относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфично связываются с BMP6, при этом указанные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты включают (или, в альтернативе, состоят из) аминокислотную последовательность VH, перечисленную в табл. 1, где не больше чем 10 аминокислот в каркасной последовательности (например, последовательности, которая не является

CDR) были подвергнуты мутации (где мутация, в качестве различных неограничивающих примеров, является добавлением, заменой или делецией).

Изобретение также относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфично связываются с BMP6, при этом указанные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты включают (или, в альтернативе, состоят из) аминокислотную последовательность VH, перечисленную в табл. 1, где не больше чем приблизительно 20 аминокислот в каркасной последовательности (например, последовательности, которая не является CDR) были подвергнуты мутации (где мутация, в качестве различных неограничивающих примеров, является добавлением, заменой или делецией). Изобретение также относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфично связываются с BMP6, при этом указанные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты включают (или, в альтернативе, состоят из) аминокислотную последовательность VH, перечисленную в табл. 1, где не больше чем 20 аминокислот в каркасной последовательности (например, последовательности, которая не является CDR) были подвергнуты мутации (где мутация, в качестве различных неограничивающих примеров, является добавлением, заменой или делецией).

Изобретение также относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфично связываются с BMP6, при этом указанные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты включают (или, в альтернативе, состоят из) аминокислотную последовательность VL, перечисленную в табл. 1, где не больше чем приблизительно 10 аминокислот в каркасной последовательности (например, последовательности, которая не является CDR) были подвергнуты мутации (где мутация, в качестве различных неограничивающих примеров, является добавлением, заменой или делецией). Изобретение также относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфично связываются с BMP6, при этом указанные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты включают (или, в альтернативе, состоят из) аминокислотную последовательность VL, перечисленную в табл. 1, где не больше чем 10 аминокислот в каркасной последовательности (например, последовательности, которая не является CDR) были подвергнуты мутации (где мутация, в качестве различных неограничивающих примеров, является добавлением, заменой или делецией).

Изобретение также относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфично связываются с BMP6, при этом указанные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты включают (или, в альтернативе, состоят из) аминокислотную последовательность VL, перечисленную в табл. 1, где не больше чем приблизительно 20 аминокислот в каркасной последовательности (например, последовательности, которая не является CDR) были подвергнуты мутации (где мутация, в качестве различных неограничивающих примеров, является добавлением, заменой или делецией). Изобретение также относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфично связываются с BMP6, при этом указанные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты включают (или, в альтернативе, состоят из) аминокислотную последовательность VL, перечисленную в табл. 1, где не больше чем 20 аминокислот в каркасной последовательности (например, последовательности, которая не является CDR) были подвергнуты мутации (где мутация, в качестве различных неограничивающих примеров, является добавлением, заменой или делецией).

Настоящее изобретение относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфично связываются с белком BMP6, при этом указанные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты включают домен VL, перечисленный в табл. 1. Настоящее изобретение также относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфично связываются с белком BMP6, при этом указанные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты включают VL CDR, имеющую аминокислотную последовательность любой из VL CDR, перечисленных в табл. 1. В частности, изобретение относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфично связываются с белком BMP6, при этом указанные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты включают (или, в альтернативе, состоят из) одну, две, три или более VL CDR, имеющих аминокислотную последовательность любой из VL CDR, перечисленных в табл. 1.

Другие антитела и их антигенсвязывающие фрагменты согласно изобретению включают аминокислоты, которые были подвергнуты мутации, и при этом обладают по меньшей мере 60, 70, 80, 90 или 95% идентичности в CDR-областях с CDR-областями, представленными в последовательностях, описанных в табл. 1. В одном варианте осуществления они включают мутантные аминокислотные последовательности, в которых не более чем 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот были подвергнуты мутации в CDR-областях по сравнению с CDR-областями, представленными в последовательности, описанной в табл. 1.

Настоящее изобретение также относится к последовательностям нуклеиновых кислот, которые кодируют VH, VL, полноразмерную тяжелую цепь и полноразмерную легкую цепь антител и их антигенсвязывающих фрагментов, которые специфично связываются с белком BMP6. Такие последовательности нуклеиновых кислот могут быть оптимизированы для экспрессии в клетках млекопитающих (например, в табл. 1 показаны примерные последовательности нуклеиновых кислот тяжелой цепи и легкой цепи антител 3, 5, 6 и 7).

Таблица 1

Примеры антител к ВМР6 настоящего изобретения

АНТИТЕЛО 3			SEQ ID NO:
Кэбат	HCDR1	SYVVH	9
Кэбат	HCDR2	RIKDHKQGYTTAYAASVKG	10
Кэбат	HCDR3	VERSKSGFDN	11
Чотиа	HCDR1	GFTFSSY	12
Чотиа	HCDR2	KDHKQGYT	13
Чотиа	HCDR3	VERSKSGFDN	14
	VH	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYVHWVR QAPGKGLEWVGRIKDHKQGYTTAYAASVKGRTISRDD SKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCARVERSKSGFDNWGQG TLVTVSS	15
	ДНК VH	caggtgcaattggtggaagcggcggtggcctggtgaa accaggcggcagcctgcgccctgagctgcccgcctccg gattcaccttttcttcttacgttggtcattgggtgctgc caggccccgggcaaggtctcgagtggtgggcccgtat caaagaccacaaacagggtacactactgcttatgccg cctctgtgaaaggccgctttaccattagccgcgatgat tcgaaaaacacccctgtatctgcaaatgaacagcctgaa aaccgaagatacggcgtgtattattgcgcgctgttg aacgttctaaatctggtttcgataactggggccaaggc accctggtgactgttagctca	16
	Тяжелая цепь	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYVHWVR QAPGKGLEWVGRIKDHKQGYTTAYAASVKGRTISRDD SKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCARVERSKSGFDNWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKT TCEPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTFLHQLDNLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFCFVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	17
	ДНК тяжелой цепи	caggtgcaattggtggaagcggcggtggcctggtgaa accaggcggcagcctgcgccctgagctgcccgcctccg gattcaccttttcttcttacgttggtcattgggtgctgc caggccccgggcaaggtctcgagtggtgggcccgtat caaagaccacaaacagggtacactactgcttatgccg cctctgtgaaaggccgctttaccattagccgcgatgat tcgaaaaacacccctgtatctgcaaatgaacagcctgaa aaccgaagatacggcgtgtattattgcgcgctgttg aacgttctaaatctggtttcgataactggggccaaggc accctggtgactgttagctcagcctccaccaagggtcc atcggtcttccccctggcacctcctccaagagcacct ctgggggacacagcgccctgggtgctgctggtcaaggac tacttccccgaaccggtgacggtgtcggtggaactcagg cgccctgaccagcggtgacacacttcccggctgtcc tacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtg accgtgcccctccagcagcttgggcaaccagacctacat ctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaagggtg acaagagagttgagcccaaatctgtgacaaaaactcac acatgcccaccgtgcccagcactgaaactcctgggggg accgtcagttcttctcttcccccaaaacccaaggaca ccctcatgatctccccgacccctgaggtcacatgctg	18

		gtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagtt caactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgcca agacaaagccgaggagagcagtaaacagcacgtac cggtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactg gctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaaca aagccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaa gccaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccct gcccccatcccgaggagatgaccaagaaccaggtca gcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgac atcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaa caactacaagaccacgcctcccggtgctggactccgacg gctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaaag agcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgt gatgatgaggctctgcacaaccactacacgcagaaga gcctctccctgtctccgggtaaa	
Кэбат	LCDR1	TGSSSNIGAGYSVH	19
Кэбат	LCDR2	GSSERPS	20
Кэбат	LCDR3	QSWDSSQTLVV	21
Чотиа	LCDR1	SSSNIGAGYS	22
Чотиа	LCDR2	GSS	23
Чотиа	LCDR3	WDSSQTLV	24
	VL	QSVLTQPPSVSGAPGQRTISCTGSSSNIGAGYSVHWY QQLPGTAPKLLIYGSSERPSGVPDRFSGSKSGTSASLA ITGLQAEDEADYYCQSWDSSQTLVVFGGGTKLTVL	25
	ДНК VL	CAGAGCGTGCTGACCCAGCCGCGGAGCGTGAGCGGTGC ACCGGGCCAGCGCGTGACCATTAGCTGTACCGGCAGCA GCAGCAACATTGGTGCTGGTTACTCTGTGCATTGGTAC CAGCAGCTGCCGGGCACGGCGCCGAAACTGCTGATCTA TGGTAGCTCTGAACGCCGAGCGCGTGCCGGATCGCT TTAGCGGATCCAAAAGCGGCACCGCCAGCCTGGCG ATTACCGGCTGCAAGCAGAAGACGAAGCGGATTATTA CTGCCAGTCTTGGGACTCTTCTCAGACTCTGGTTGTGT TTGGCGGCGGCACGAAGTTAACCGTCCTA	26
	Легкая цепь	QSVLTQPPSVSGAPGQRTISCTGSSSNIGAGYSVHWY QQLPGTAPKLLIYGSSERPSGVPDRFSGSKSGTSASLA ITGLQAEDEADYYCQSWDSSQTLVVFGGGTKLTVLGQP KAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVA WKADSSPVKAGVETTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQW KSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	27
	ДНК легкой цепи	CAGAGCGTGCTGACCCAGCCGCGGAGCGTGAGCGGTGC ACCGGGCCAGCGCGTGACCATTAGCTGTACCGGCAGCA GCAGCAACATTGGTGCTGGTTACTCTGTGCATTGGTAC CAGCAGCTGCCGGGCACGGCGCCGAAACTGCTGATCTA TGGTAGCTCTGAACGCCGAGCGCGTGCCGGATCGCT TTAGCGGATCCAAAAGCGGCACCGCCAGCCTGGCG ATTACCGGCTGCAAGCAGAAGACGAAGCGGATTATTA CTGCCAGTCTTGGGACTCTTCTCAGACTCTGGTTGTGT TTGGCGGCGGCACGAAGTTAACCGTCCTAGGTACGCC AAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTCCCCCTCCTC TGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTC TCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCGGTGACAGTGGCC TGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGCGGGAGTGGA GACCACCACACCTCCAAACAAGCAACAACAAGTACG CGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGG AAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTACGCATGA AGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCACAGAAT GTTCA	28
АНТИТЕЛО 5			
Кэбат	HCDR1	SYVVH	29
Кэбат	HCDR2	RIKRESSSYTMYAAPVKG	30
Кэбат	HCDR3	VERSKSGFDN	31

Чотиа	HCDR1	GFTFSSY	32
Чотиа	HCDR2	KRESSSYT	33
Чотиа	HCDR3	VERSKSGFDN	34
	VH	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYVHWVR QAPGKGLEWVGRIKRESSSYTMYAAPVKGRFTISRDD SKNTLYLQMNLSKLTEDTAVYYCARVERSKSGFDNWDGQ TLVTVSS	35
	ДНК VH	CAGGTGCAGCTGGTGAATCAGGCGGCGGACTGGTCAA GCCTGGCGGTAGCCTGAGACTGAGCTGCGCTGCTAGTG GCTTCACCTTCTCTAGCTACGTGGTGCCTGGGTGAGA CAGGCCCCCTGGTAAAGGCCTGGAGTGGGTGCGACGGAT TAAGAGAGAGTCTCTAGCTACACTACTATGTACGCCG CTCCCGTGAAGGGCCGGTTCATATCTCTAGGGACGAC TCTAAGAACACCCCTGTACCTGCAGATGAATAGCCTGAA AACCGAGGACACCGCCGTCTACTACTGCGCTAGAGTGG AACGGTCTAAGTCAAGGCTTCGATAACTGGGGTCAGGGC ACCCCTGGTCAACCGTCTCTAGC	36
	Тяжелая цепь	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYVHWVR QAPGKGLEWVGRIKRESSSYTMYAAPVKGRFTISRDD SKNTLYLQMNLSKLTEDTAVYYCARVERSKSGFDNWDGQ TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKD YFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK	37
	ДНК тяжелой цепи	CAGGTGCAGCTGGTGAATCAGGCGGCGGACTGGTCAA GCCTGGCGGTAGCCTGAGACTGAGCTGCGCTGCTAGTG GCTTCACCTTCTCTAGCTACGTGGTGCCTGGGTGAGA CAGGCCCCCTGGTAAAGGCCTGGAGTGGGTGCGACGGAT TAAGAGAGAGTCTCTAGCTACACTACTATGTACGCCG CTCCCGTGAAGGGCCGGTTCATATCTCTAGGGACGAC TCTAAGAACACCCCTGTACCTGCAGATGAATAGCCTGAA AACCGAGGACACCGCCGTCTACTACTGCGCTAGAGTGG AACGGTCTAAGTCAAGGCTTCGATAACTGGGGTCAGGGC ACCCCTGGTCAACCGTGTCTAGCGCTAGCACTAAGGGCCC AAGTGTGTTTCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGTCTACTT CCGGCGGAAGTGTGCTGCCCTGGGTGCTGCTGGTGAAGGAC TACTTCCCCGAGCCCGTGACAGTGTCTTGGAACTCTGG GGCTCTGACTTCCGGCGTGACACCTTCCCGCCGTGCTG TGCAGAGCAGCGGCCGTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTG ACAGTGGCCCTCCAGCTCTCTGGGAACCCAGACCTATAT CTGCAACGTGAACCAAGCCAGCAACACCAAGGTGG ACAAGAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCAC ACCTGCCCCCCTGCCAGCTCCAGAACTGCTGGGAGG GCCTTCCGTGTTCTGTTCCTTCCCCCAAGCCCAAGGACA CCCTGATGATCAGCAGGACCCCGAGGTGACCTGCGTG GTGGTGGACGTGTCCACGAGGACCCAGAGGTGAAGTT CAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCA AGACCAAGCCAGAGAGGAGCAGTACAACAGCAGCTAC AGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGACACAGGACTG GCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAAGTCTCCAACA AGGCCCTGCCAGCCCAATCGAAAAGACAATCAGCAAG GCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTGTACACCCCT GCCCCCAGCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGT CCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTACCCAGCGAT ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCGAGAA CAACTACAAGACCAACCCCCCAGTGTGGACAGCGACG GCAGCTTCTTCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAG TCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAAGTGCAGCGT	38

		GATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGT CCCTGAGCCTGAGCCCCGCAAG	
Кэбат	LCDR1	TGSSSNIGAGYSVH	39
Кэбат	LCDR2	GQSERPS	40
Кэбат	LCDR3	QSWDSSQTLVV	41
Чотиа	LCDR1	SSSNIGAGYS	42
Чотиа	LCDR2	GQS	43
Чотиа	LCDR3	WDSSQTLV	44
	VL	QSVLTQPPSVSGAPGQRVITISCTGSSSNIGAGYSVHWY QQLPGTAPKLLIYGQSERPSGVPDRFSGSKSGTSASLA ITGLQAEDEADYYCQSWDSSQTLVVFGGGTKLTVL	45
	ДНК VL	CAGTCAGTCCTGACTCAGCCCCCTAGCGTCAGCGGCGC TCCCGGTCAGAGAGTGACTATTAGCTGCACCGGCTCTA GCTCTAATATCGGGCTGGCTATAGCGTGCCTGGTAT CAGCAGCTGCCGGCACCGCCCCCTAAGCTGCTGATCTA CGGTCAGTCAGAGCGGCCCTAGCGGCTGCCGATAGGT TTAGCGGCTCTAAGTCAGGCACTAGCGCTAGTCTGGCT ATCACCGGCCCTGCAGGCTGAGGACGAGGCCGACTACTA CTGTCACTCCTGGGACTCTAGTCAGACCCCTGGTGGTGT TCGGCGGAGGCACTAAGCTGACCGTGCTG	46
	Легкая цепь	QSVLTQPPSVSGAPGQRVITISCTGSSSNIGAGYSVHWY QQLPGTAPKLLIYGQSERPSGVPDRFSGSKSGTSASLA ITGLQAEDEADYYCQSWDSSQTLVVFGGGTKLTVLGQP KAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVA WKADSSPVKAGVETTPSKQSNKKAASSYLSTPEQW KSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	47
	ДНК легкой цепи	CAGTCAGTCCTGACTCAGCCCCCTAGCGTCAGCGGCGC TCCCGGTCAGAGAGTGACTATTAGCTGCACCGGCTCTA GCTCTAATATCGGGCTGGCTATAGCGTGCCTGGTAT CAGCAGCTGCCGGCACCGCCCCCTAAGCTGCTGATCTA CGGTCAGTCAGAGCGGCCCTAGCGGCTGCCGATAGGT TTAGCGGCTCTAAGTCAGGCACTAGCGCTAGTCTGGCT ATCACCGGCCCTGCAGGCTGAGGACGAGGCCGACTACTA CTGTCACTCCTGGGACTCTAGTCAGACCCCTGGTGGTGT TCGGCGGAGGCACTAAGCTGACCGTGCTGGGTGAGCCT AAGGCTGCCCCCAGCGTGACCTGTCCCCCAGCAG CGAGGAGCTGCAGGCCAACAAGGCCACCTGGTGTGCC TGATCAGCGACTTCTACCCAGCGCCGTGACCGTGGCC TGGAAGGCCGACAGCAGCCCCGTGAAGGCCGGCGTGA GACCACCACCCAGCAAGCAGAGCAACAAGTACG CCGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACCCCGAGCAGTGG AAGAGCCACAGGTCCTACAGCTGCCAGGTGACCCACGA GGGCAGCACCGTGAAAAGACCGTGCCCCAACCAGGT GCAGC	48
АНТИТЕЛО 6			
Кэбат	HCDR1	SYVVH	49
Кэбат	HCDR2	RTRHSDMGYATSYAAPVKG	50
Кэбат	HCDR3	VERSKSGFDN	51
Чотиа	HCDR1	GFTFSSY	52
Чотиа	HCDR2	RHSDMGYA	53
Чотиа	HCDR3	VERSKSGFDN	54
	VH	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYVHWVR QAPGKGLEWVGRTRHSDMGYATSYAAPVKGRFTISRDD SKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCARVERSKSGFDNWGQG TLVTVSS	55
	ДНК VH	CAGGTGCAGCTGGTGAATCAGGCGGCGACTGGTCAA GCCTGGCGGTAGCCTGAGACTGAGCTGCGCTGCTAGTG GCTTCACCTTCTCTAGCTACGTGGTGCCTGGGTGAGA CAGGCCCTGGTAAAGGCTGGAGTGGGTGGGACGGAC TAGACACTCAGATATGGGCTACGCTACTAGCTACGCCG	56

		CTCCCGTGAAGGGCCGGTTCATATCTCTAGGGACGAC TCTAAGAACACCCCTGTACCTGCAGATGAATAGCCTGAA AACCAGAGACACCGCGTCTACTACTGCGCTAGAGTGG AACGGTCTAAGTCAGGCTTCGATAACTGGGGTCAGGGC ACCCGTGGTCACCGTGTCTAGC	
	Тяжелая цепь	QVQLVESGGGLVKGPGSLRLSCAASGFTFSSYVHWVR QAPGKLEWVGRTRHSDMGYATSYAAPVKGRFTISRDD SKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCARVERSKSGFDNWGGG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVHLQDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	57
	ДНК тяжелой цепи	CAGGTGCAGCTGGTGGGAATCAGGCGGCGGACTGGTCAA GCCTGGCGGTAGCCTGAGACTGAGCTGCGCTGCTAGTG GCTTCACCTTCTCTAGCTACGTGGTGCAGTGGGTGAGA CAGGCCCTGGTAAAGGCTGGAGTGGGTGCGGACGGAC TAGACACTCAGATATGGGCTACGCTACTAGCTACGCCG CTCCCGTGAAGGGCCGGTTCATATCTCTAGGGACGAC TCTAAGAACACCCCTGTACCTGCAGATGAATAGCCTGAA AACCAGAGACACCGCGTCTACTACTGCGCTAGAGTGG AACGGTCTAAGTCAGGCTTCGATAACTGGGGTCAGGGC ACCCGTGGTCACCGTGTCTAGCGCTAGCACTAAGGGCCC AAGTGTGTTTCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGTCTACTT CCGGCGGAAGTGTGCCCTGGGTGCTTGGTGAAGGAC TACTTCCCGAGCCCGTGACAGTGTCTGGAACTCTGG GGCTCTGACTTCCGGCGTGACACCTTCCCGCGGTGC TGCAGAGCAGCGGCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTG ACAGTGCCCTCCAGCTCTCTGGGAACCCAGACCTATAT CTGCAACGTGAACCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGG ACAAGAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCAC ACCTGCCCCCCTGCCAGCTCCAGAACTGCTGGGAGG GCCTTCCGTGTTCTGTTCCCCCAAGCCCAAGGACA CCCTGATGATCAGCAGGACCCCGAGGTGACCTGCGTG GTGGTGGACGTGTCCACAGGACCCAGAGGTGAAGTT CAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCA AGACCAAGCCAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTAC AGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTG GCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAAGTCTCCAACA AGGCCCTGCCAGCCCCAATCGAAAAGACAATCAGCAAG GCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTGTACACCT GCCCCCAGCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGT CCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGAT ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAA CAACTACAAGACCAACCCCCAGTGTGGACAGCGACG GCAGTTCTTCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAG TCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCACTGTCAGCGT GATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGT CCCTGAGCCTGAGCCCCGGAAG	58
Кэбат	LCDR1	TGSSSNIGAGYSVH	59
Кэбат	LCDR2	GQSERPS	60
Кэбат	LCDR3	QSWDSSQTLVV	61
Чотиа	LCDR1	SSSNIGAGYS	62
Чотиа	LCDR2	GQS	63
Чотиа	LCDR3	WDSSQTLV	64
	VL	QSVLTQPPSVSGAPGQRVITISCTGSSSNIGAGYSVHWY QQLPGTAPKLLIYGQSERPSGVPDRFSGSKSGTSASLA ITGLQAEDEADYYCQSWDSSQTLVVFGGGTKLTVL	65

	ДНК VL	CAGTCAGTCCTGACTCAGCCCCCTAGCGTCAGCGGCGC TCCCGGTCAGAGAGTGACTATTAGCTGCACCGGCTCTA GCTCTAATATCGGCGCTGGCTATAGCGTGCCTGGTAT CAGCAGCTGCCCGGCACCGCCCCCTAAGCTGCTGATCTA CGGTCACTCAGAGCGGCTAGCGGCGTGCCCGATAGGT TTAGCGGCTCTAAGTCAGGCACTAGCGCTAGTCTGGCT ATCACCGGCTGCAGGCTGAGGACGAGGCCGACTACTA CTGTCACTCCTGGGACTCTAGTCAGACCCTGGTGGTGT TCGGCGGAGGCACTAAGCTGACCGTGCTG	66
	Легкая цепь	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTIISCTGSSSNIGAGYSVHWY QQLPGTAPKLLIYGQSERPSGVDFRFSGSKSGTASLA ITGLQAEDEADYYCQSWDSSQTLVVFGGTKLTVLGQP KAAPSVTLFPSPSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVA WKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKNYAASSYLSLTPEQW KSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	67
	ДНК легкой цепи	CAGTCAGTCCTGACTCAGCCCCCTAGCGTCAGCGGCGC TCCCGGTCAGAGAGTGACTATTAGCTGCACCGGCTCTA GCTCTAATATCGGCGCTGGCTATAGCGTGCCTGGTAT CAGCAGCTGCCCGGCACCGCCCCCTAAGCTGCTGATCTA CGGTCACTCAGAGCGGCTAGCGGCGTGCCCGATAGGT TTAGCGGCTCTAAGTCAGGCACTAGCGCTAGTCTGGCT ATCACCGGCTGCAGGCTGAGGACGAGGCCGACTACTA CTGTCACTCCTGGGACTCTAGTCAGACCCTGGTGGTGT TCGGCGGAGGCACTAAGCTGACCGTGCTGGGTGAGCCT AAGGCTGCCCCAGCGTGACCTGTCCCCCAGCAG CGAGGAGCTGCAGGCCAACAGGCCACCTGGTGTGCC TGATCAGCGACTTCTACCCAGGCGCGGTGACCGTGGCC TGAAGGCCGACAGCAGCCCCGTGAAGGCCGGCGTGGA GACCACCACCCCCAGCAAGCAGAGCAACAAAGTACG CCGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACCCCCGAGCAGTGG AAGAGCCACAGGTCTACAGCTGCCAGGTGACCCACGA GGGCAGCACCGTGGAAAAGACCGTGGCCCCAACCGAGT GCAGC	68
АНТИТЕЛО 7			
Кэбат	HCDR1	SYVNH	69
Кэбат	HCDR2	RIRLETHGYAAEYAASVKG	70
Кэбат	HCDR3	VERSKSGFDN	71
Чотиа	HCDR1	GFTFSSY	72
Чотиа	HCDR2	RLETHGYA	73
Чотиа	HCDR3	VERSKSGFDN	74
	VH	QVQLVESGGGLVKKPGGSLRLSCAASGFTFSSYVHWVR QAPGKGLEWVGRI RLETHGYAAEYAASVKGRFTISRDD SKNTLYLQMNLSLKTEDTAVYYCARVERSKSGFDNWDGQG TLVTSS	75
	ДНК VH	CAGGTGCAGCTGGTGAATCAGGCGGCGGACTGGTCAA GCCTGGCGGTAGCCTGAGACTGAGCTGCGCTGCTAGTG GCTTCACCTTCTTAGCTACGTGGTGCCTGGGTGAGA CAGGCCCTGGTAAGGCTGAGTGGGTGCGACGGAT TAGACTGGAACCTACGGCTACGCCGCCGAGTACGCCG CTAGTGTGAAGGGCCGGTCACTATCTCTAGGGACGAC TCTAAGAACACCTGTACCTGCAGATGAATAGCCTGAA AACCGAGGACACCGCGTCTACTACTGCGCTAGAGTGG AACGGTCTAAGTCAGGCTTCGATAACTGGGGTCAGGGC ACCCTGGTCAACGTGTCTAGC	76
	Тяжелая цепь	QVQLVESGGGLVKKPGGSLRLSCAASGFTFSSYVHWVR QAPGKGLEWVGRI RLETHGYAAEYAASVKGRFTISRDD SKNTLYLQMNLSLKTEDTAVYYCARVERSKSGFDNWDGQG TLVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH TCTPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV	77

		VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSQSVMHREALHNNHYTQKSLSLSPGK	
	ДНК тяжелой цепи	CAGGTGCAGCTGGTGGGAATCAGGCGGCGGACTGGTCAA GCCTGGCGGTAGCCTGAGACTGAGCTGCGCTGCTAGTG GCTTCACCTTCTCTAGCTACGTGGTGCAGTGGGTGAGA CAGGCCCTGGTAAAGGCCTGGAGTGGGTGCGACGGAT TAGACTGGAACTCACGGCTACGCCGCCGAGTACGCCG CTAGTGTGAAGGGCCGGTCTACTATCTCTAGGGACGAC TCTAAGAACACCCCTGTACCTGCAGATGAATAGCCTGAA AACCGAGGACACCGCCGTCTACTACTGCGCTAGAGTGG AACGGTCTAAGTCAGGCTTCGATAACTGGGGTCAGGGC ACCCTGGTCACCGTGTCTAGCGCTAGCACTAAGGGCCC AAGTGTGTTTCCCCTGGCCCCAGCAGCAAGTCTACTT CCGGCGGAAGTGTGCCCTGGGTGCTGCTGGTGAAGGAC TACTTCCCCGAGCCCGTGACAGTGTCTGGAAGTCTGG GGCTCTGACTTCCGGCGTGACACCTTCCCCGCCGTGC TGCAGAGCAGCGGCCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTG ACAGTGCCCTCCAGCTCTCTGGGAACCCAGACCTATAT CTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGG ACAAGAGAGTGGAGCCCCAAGAGCTGCGACAAGCCAC ACCTGCCCCCCTGCCAGCTCCAGAACTGCTGGGAGG GCCTTCCGTGTTCTGTTCCTTCCCCCAAGCCCAAGGACA CCCTGATGATCAGCAGGACCCCGAGGTGACCTGCGTG GTGGTGGACGTGTCCACGAGGACCCAGAGGTGAAGTT CAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCA AGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTAC AGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGACCAAGGACTG GCTGAACGGCAAAGAATAACAAGTGAAGTCTCCAACA AGGCCCTGCCAGCCCAATCGAAAAGACAATCAGCAAG GCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTGTACACCTT GCCCCCAGCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGT CCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGAT ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGCCAGCCCGAGAA CAACTACAAGACCAACCCCCAGTGTGGACAGCGACG GCAGCTTCTTCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAG TCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGT GATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGT CCCTGAGCCTGAGCCCCGCAAG	78
Кэбат	LCDR1	TGSSSNIGAGYSVH	79
Кэбат	LCDR2	GQSERPS	80
Кэбат	LCDR3	QSWDSSQTLVV	81
Чотиа	LCDR1	SSSNIGAGYS	82
Чотиа	LCDR2	GQS	83
Чотиа	LCDR3	WDSSQTLV	84
	VL	QSVLTQPPSVSGAPGQRTISCTGSSSNIGAGYSVHWY QQLPGTAPKLLIYGQSERPSGVDPDRFSGSKSGTSASLA ITGLQAEDEADYYCQSWDSSQTLVVFGGGTKLTVL	85
	ДНК VL	CAGTCAGTCCTGACTCAGCCCCCTAGCGTCAGCGGCGC TCCCGGTCAAGAGTGAATATAGCTGCACCGGCTCTA GCTCTAATATCGGCGCTGGCTATAGCGTGCACTGGTAT CAGCAGCTGCCGGCACCGCCCTAAGCTGCTGATCTA CGGTCACTCAGAGCGGCTAGCGGCGTGCCCGATAGGT TTAGCGGCTCTAAGTCAGGCACTAGCGCTAGTCTGGCT ATCACCGGCTGCAGGCTGAGGACGAGGCCGACTACTA CTGTCACTCTGGGACTCTAGTCAGACCCCTGGTGGTGT TCGGCGGAGGCACTAAGCTGACCGTGTG	86
	Легкая цепь	QSVLTQPPSVSGAPGQRTISCTGSSSNIGAGYSVHWY QQLPGTAPKLLIYGQSERPSGVDPDRFSGSKSGTSASLA ITGLQAEDEADYYCQSWDSSQTLVVFGGGTKLTVLQGP	87
		KAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVA WKADSSPVKAGVETTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQW KSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	
	ДНК легкой цепи	CAGTCAGTCCTGACTCAGCCCCCTAGCGTCAGCGGCGC TCCCGGTCAAGAGTGAATATAGCTGCACCGGCTCTA GCTCTAATATCGGCGCTGGCTATAGCGTGCACTGGTAT CAGCAGCTGCCGGCACCGCCCTAAGCTGCTGATCTA CGGTCACTCAGAGCGGCTAGCGGCGTGCCCGATAGGT TTAGCGGCTCTAAGTCAGGCACTAGCGCTAGTCTGGCT ATCACCGGCTGCAGGCTGAGGACGAGGCCGACTACTA CTGTCACTCTGGGACTCTAGTCAGACCCCTGGTGGTGT TCGGCGGAGGCACTAAGCTGACCGTGTGGGTGAGCCT AAGGCTGCCCCAGCGTGACCTGTTCCTTCCCCAGCAG CGAGGAGCTGCAGGCCAACAGGCCACCCCTGGTGTGCC TGATCAGCGACTTCTACCCAGCGCGCTGACCGTGGCC TGAAGGCCGACAGCAGCCCCGTGAAGGCCGGCGTGGGA GACCAACCCCCAGCAAGCAGAGCAACAACAAGTACG CCGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACCCCGAGCAGTGG AAGAGCCACAGGTCTACAGCTGCCAGGTGACCCACGA GGGCAGCACCGTGGAAAAGACCGTGGCCCAACCGAGT GCAGC	88

Другие антитела и их антигенсвязывающие фрагменты согласно изобретению включают тех, в ко-

торых аминокислоты или нуклеиновые кислоты, кодирующие аминокислоты, были подвергнуты мутации, и при этом обладают по меньшей мере 60, 70, 80, 90 или 95% идентичности с последовательностями, описанными в табл. 1. В одном варианте осуществления они включают мутантные аминокислотные последовательности, в которых не более чем 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот были подвергнуты мутации в переменных областях по сравнению с переменными областями, представленными в последовательности, описанной в табл. 1, с сохранением по существу такой же терапевтической активности.

В другом определенном варианте осуществления настоящее изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые связывают человеческий BMP6 и включают последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в SEQ ID NO: 9, 10 и 11 соответственно и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в SEQ ID NO: 19, 20 и 21 соответственно.

В другом определенном варианте осуществления настоящее изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые связывают человеческий BMP6 и включают последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в SEQ ID NO: 12, 13 и 14 соответственно и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в SEQ ID NO: 22, 23 и 24 соответственно.

В другом определенном варианте осуществления настоящее изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые связывают человеческий BMP6 и включают последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в SEQ ID NO: 29, 30 и 31 соответственно и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в SEQ ID NO: 39, 40 и 41 соответственно.

В другом определенном варианте осуществления настоящее изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые связывают человеческий BMP6 и включают последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в SEQ ID NO: 32, 33 и 34 соответственно и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в SEQ ID NO: 42, 43 и 44 соответственно.

В другом определенном варианте осуществления настоящее изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые связывают человеческий BMP6 и включают последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в SEQ ID NO: 49, 50 и 51 соответственно и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в SEQ ID NO: 59, 60 и 61 соответственно.

В другом определенном варианте осуществления настоящее изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые связывают человеческий BMP6 и включают последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в SEQ ID NO: 52, 53 и 54 соответственно и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в SEQ ID NO: 62, 63 и 64 соответственно.

В другом определенном варианте осуществления настоящее изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые связывают человеческий BMP6 и включают последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в SEQ ID NO: 69, 70 и 71 соответственно и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в SEQ ID NO: 79, 80 и 81 соответственно.

В другом определенном варианте осуществления настоящее изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые связывают человеческий BMP6 и включают последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в SEQ ID NO: 72, 73 и 74 соответственно и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в SEQ ID NO: 82, 83 и 84 соответственно.

Поскольку каждое из этих антител может связываться с BMP6, последовательности VH, VL, полноразмерной легкой цепи и полноразмерной тяжелой цепи (аминокислотные последовательности и нуклеотидные последовательности, кодирующие аминокислотные последовательности) могут быть "смешаны и комбинированы" с получением других BMP6-связывающих антител и их антигенсвязывающих фрагментов согласно изобретению. Такие "смешанные и комбинированные" BMP6-связывающие антитела могут быть исследованы при использовании анализов связывания, известных в уровне техники (например, ELISA и других анализов, описанные в разделе примеры). При смешивании и комбинировании этих цепей последовательность VH из конкретной пары VH/VL нужно заменить структурно подобной последовательностью VH. Аналогичным образом, последовательность полноразмерной тяжелой цепи из конкретной пары полноразмерной тяжелой цепи/полноразмерной легкой цепи нужно заменить структурно подобной последовательностью полноразмерной тяжелой цепи. Аналогичным образом, последовательность VL из конкретной пары VH/VL нужно заменить структурно подобной последовательностью VL. Аналогичным образом, последовательность полноразмерной легкой цепи из конкретной пары полноразмерной тяжелой цепи/полноразмерной легкой цепи нужно заменить структурно подобной последовательностью полноразмерной легкой цепи.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к BMP6-связывающим антителам, которые включают CDR1, CDR2 и CDR3 области тяжелой цепи и легкой цепи, как описано в табл. 1, или их комбинации. CDR-области определены при использовании системы Кэбата (Kabat et al. 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) или при использовании системы Чотиа [Chothia et al. 1987 J. Mol. Biol. 196:901-917; and Al-Lazikani et al. 1997 J. Mol. Biol. 273:927-948].

Учитывая, что каждое из этих антител может связываться с BMP6, и что антигенсвязывающую специфичность обеспечивают, прежде всего, области CDR1, 2 и 3, последовательности VH CDR1, 2 и 3 и последовательности VL CDR1, 2 и 3 могут быть "смешаны и комбинированы" (т.е. CDR-области из раз-

личных антител могут быть смешаны и комбинированы, хотя каждое антитело должно содержать VH CDR1, 2 и 3 и VL CDR1, 2 и 3) с получением других BMP6-связывающих молекул согласно изобретению. Такие "смешанные и комбинированные" BMP6-связывающие антитела могут быть исследованы при использовании анализов связывания, известных в уровне техники и описанных в примерах (например, анализов ELISA). Когда последовательности VH CDR смешаны и комбинированы, последовательность CDR1, CDR2 и/или CDR3 из конкретной последовательности VH нужно заменить структурно подобной последовательностью (последовательностями) CDR. Аналогичным образом, когда последовательности VL CDR смешаны и комбинированы, последовательность CDR1, CDR2 и/или CDR3 из конкретной последовательности VL нужно заменить структурно подобной последовательностью (последовательностями) CDR. Среднему специалисту будет очевидно, что новые последовательности VH и VL могут быть созданы путем мутации одной или нескольких последовательностей VH и/или VL CDR областей со структурно подобными последовательностями из последовательностей CDR, показанных в настоящем описании для моноклональных антител настоящего изобретения.

Таким образом, настоящее изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающей области, включающим вариабельную область тяжелой цепи CDR1, включающую аминокислотную последовательность, выбранную из любого из SEQ ID NO: 29, 49, 69, 12, 32, 52, 72 или 9; вариабельную область тяжелой цепи CDR2, включающую аминокислотную последовательность, выбранную из любого из SEQ ID NO: 10, 30, 50, 70, 13, 33, 53 или 73; вариабельную область тяжелой цепи CDR3, включающую аминокислотную последовательность, выбранную из любого из SEQ ID NO: 11, 31, 51, 71, 14, 34, 54 или 74; вариабельную область легкой цепи CDR1, включающую аминокислотную последовательность, выбранную из любого из SEQ ID NO: 19, 39, 59, 79, 22, 42, 62 или 82; вариабельную область легкой цепи CDR2, включающую аминокислотную последовательность, выбранную из любого из SEQ ID NO: 20, 40, 60, 80, 23, 43, 63 или 83; и вариабельную область легкой цепи CDR3, включающую аминокислотную последовательность, выбранную из любого из SEQ ID NO: 21, 41, 61, 81, 24, 44, 64 или 84; где антитело специфично связывает BMP6.

В одном варианте осуществления антитело, которое специфично связывается с BMP6, является антителом, которое описано в табл. 1.

При использовании в настоящем описании человеческое антитело включает вариабельные области тяжелой или легкой цепи или полноразмерные тяжелые или легкие цепи, которые являются "продуктом" или "получены из" конкретной последовательности зародышевой линии, если вариабельные области или полноразмерные цепи антитела получены из системы, которая использует человеческие иммуноглобулиновые гены зародышевой линии. Такие системы включают иммунизацию трансгенной мыши, несущей человеческие иммуноглобулиновые гены, представляющим интерес антигеном или скрининг библиотеки человеческих иммуноглобулиновых генов, презентирующей на бактериофаге с представляющим интерес антигеном. Человеческое антитело, которое является "продуктом" или "получено из" человеческой иммуноглобулиновой последовательности зародышевой линии, может быть определено в таком качестве при сравнении аминокислотной последовательности человеческого антитела с аминокислотными последовательностями человеческих иммуноглобулинов зародышевой линии и отборе человеческой иммуноглобулиновой последовательности зародышевой линии, которая является ближайшей по последовательности (т.е. обладающей наибольшим % идентичности) с последовательностью человеческого антитела. Человеческое антитело, которое является "продуктом" или "получено из" конкретной человеческой иммуноглобулиновой последовательности зародышевой линии, может содержать аминокислотные различия по сравнению с последовательностью зародышевой линии, обусловленные, например, природными соматическими мутациями или намеренным введением сайт-направленных мутаций. Однако в VH или VL каркасных областях выбранное человеческое антитело, как правило, по меньшей мере на 90% идентично по аминокислотной последовательности аминокислотной последовательности, кодируемой человеческим иммуноглобулиновым геном зародышевой линии, и содержит аминокислотные остатки, которые определяют человеческое антитело как человеческое при сравнении с аминокислотными последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии других биологических видов (например, мышинными последовательностями зародышевой линии). В некоторых случаях человеческое антитело может быть по меньшей мере на 60, 70, 80, 90% или по меньшей мере на 95%, или по меньшей мере даже на 96, 97, 98 или 99% идентичным по аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, кодируемой иммуноглобулиновым геном зародышевой линии. Как правило, рекомбинантное человеческое антитело будет демонстрировать не более чем 10 аминокислотных различий с аминокислотной последовательностью, кодируемой человеческим иммуноглобулиновым геном зародышевой линии в VH или VL каркасных областях. В некоторых случаях человеческое антитело может демонстрировать не более чем 5, или даже не более чем 4, 3, 2 или 1 аминокислотное различие с аминокислотными последовательностями, кодируемыми иммуноглобулиновым геном зародышевой линии.

Представители семейства BMP и гепсидин

В одном варианте осуществления изобретение относится к антителу или его связывающему фрагменту, которые специфично связываются с BMP6, являются антителом. В одном варианте осуществления антитело или его связывающий фрагмент описаны в табл. 1.

В одном варианте осуществления антитело или его связывающий фрагмент специфично связываются с BMP6, но не связываются с другими белками BMP (такими как BMP2, BMP5 или BMP7).

BMP6, секретируемый лиганд-фактор роста семейства BMP, представляет собой 30 кДа, связанный дисульфидной связью гомодимер в своей зрелой активной форме. Данный белок является членом суперсемейства TGF-бета. Костные морфогенетические белки известны своей способностью вызывать рост кости и хряща. BMP6 способен индуцировать все остеогенные маркеры в мезенхимальных стволовых клетках.

Костные морфогенетические белки (BMP) являются семейством секретируемых сигнальных молекул, которые могут вызывать эктопический рост кости. Белки BMP являются частью суперсемейства трансформирующего фактора роста бета (TGF-бета). Белки BMP первоначально были идентифицированы по способности деминерализованного костного экстракта вызывать внутрихрящевой остеогенез *in vivo* на внескелетном участке. Благодаря его экспрессии на ранней стадии эмбриогенеза предполагают, что BMP, кодируемый этим геном, играет роль при раннем развитии. Кроме того, тот факт, что этот BMP является близко родственным с BMP5 и BMP7, привел к предположению наличия возможной активности, индуцирующей рост кости. Дополнительная функция BMP6 была определена, как описано в *Nature Genetics* April; 41 [4]:386-8.

Мыши с нокаутом BMP6 жизнеспособны и фертильны, и демонстрируют нормальное развитие костной и хрящевой ткани.

BMP6 является основным регулятором гепсидина, малого пептида, секретируемого в печени, который является главным регулятором метаболизма железа у млекопитающих. Гепсидин регулирует как количество железа, поглощаемого в двенадцатиперстной кишке из пищи, так и железа, высвобождаемого ретикулоэндотелиальными клетками. Уровень гепсидина повышается множеством стимулирующих факторов, включающих воспаление и перенасыщение железом, и понижается при анемии, гипоксии и дефиците железа.

Без привязки к какой-либо конкретной теории, в настоящем описании предполагается, что антагонистическое антитело к BMP6 в качестве гепсидин-понижающей терапии предположительно будет эффективным у больных с железодефицитной анемией, обеспечивая преодоление резистентности к эритропоэз-стимулирующему препарату (ЭСП), которая вносит существенный вклад в тяжесть первопричинного заболевания и часто является прогностическим фактором неблагоприятного исхода. При его взаимодействии с рецепторами BMPRI и BMPRII он вызывает димеризацию рецепторов и транскрипцию гепсидина. BMP6 также связывается с корецептором HJV в клетках печени и мышечных клетках.

Таким образом, BMP6, как известно, повышает экспрессию гепсидина. Гепсидин, как известно, является ключевым гормоном, участвующим в гомеостазе железа. Высокие уровни гепсидина связаны с железодефицитным эритропоэзом при АХЗ.

В WO 2010/056981 раскрыто, что введение мышам антитела к BMP6 уменьшало уровень гепсидина и повышало уровень железа.

В уровне техники BMP6 также описан, например, в: Hahn et al. 1992 *Genomics* 14: 759-62; Sauer-mann et al. 1993 *J. Neurosci. Res.* 33: 142; Celeste et al. 1991 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 9843; Schluesener et al. 1995 *Atherosclerosis* 113: 153; Gitelman et al. 1994 *J. Cell Biol.* 126: 1595; Barnes et al. 1997 *W. J. Urol.* 13: 337; и Hamdy et al. 1997 *Cancer Res.* 57: 4427.

BMP2, как и другие костные морфогенетические белки, играет важную роль в развитии костной и хрящевой ткани. Он участвует в сигнальном пути hedgehog, сигнальном пути TGF-бета и во взаимодействии цитокинов с цитокиновыми рецепторами. Он также участвует в дифференцировке миоцитов сердца и эпителиально-мезенхимальном переходе. BMP2 играет множество важных ролей, как отмечено в Kishimoto et al. 1997 *Dev.* 124: 4457; Ma et al. 2005 *Dev.* 132: 5601; Wang et al. *Bone* 48: 524; и Rosen 2009 *Cyt. Growth Fact. Rev.* 20: 475. Таким образом, предпочтительно, чтобы антитело к BMP6 не связывалось с BMP2.

Также BMP2 описан, помимо прочего, в: Sampath et al. 1990 *J. Biol. Chem.* 265: 13198; Chen et al. 2004 *Growth Factors* 22: 233; Marie et al. 2002 *Histol. Histopath.* 17: 877; Nickel et al. 2001 *J. Bone Joint Surg.* 83-A Supp. 1: S7-14; Kirsch et al. 2000 *FEBS Lett.* 468: 215; Kirsch et al. 2000 *EMBO J.* 19: 3314; Gilboa et al. 2000 *Mol. Biol. Cell* 11: 1023.

BMP5 также является представителем суперсемейства TGF-бета. Как и другие белки BMP, он известен своей способностью вызывать развитие костной и хрящевой ткани. BMP5 экспрессируется в трабекулярной сети и диске зрительного нерва и может играть роль в развитии и нормальной функции. Он также экспрессируется в легких и печени.

Дополнительная информация о BMP5 известна в уровне техники, например, Hahn et al. 1992 *Genomics* 14: 759; Beck et al. 2003 *BMC Neurosci.* 2: 12; Celeste et al. 1991 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 9843; и Sakaue et al. 1996 *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 221: 768.

BMP7 также является представителем суперсемейства TGF-бета. Как и другие представители семейства белков BMP, он играет ключевую роль в превращении мезенхимальных клеток в кость и хрящ. Он вызывает фосфорилирование SMAD1 и SMAD5, что в свою очередь вызывают транскрипцию многочисленных остеогенных генов.

Как отмечено выше, мыши с нокаутом BMP6 жизнеспособны и фертильны, и демонстрируют нормальное развитие кости и хряща. Однако мыши с нокаутом BMP7 погибают после рождения с нарушениями почек, глаз и кости. Отдельные нокауты любого из генов не вызывают изменений кардиогенеза, однако двойной нокаут BMP6 и BMP7 продемонстрировал несколько дефектов и задержек развития сердца; эмбрионы погибали от сердечной недостаточности. BMP7 важен в предотвращении развития хронической болезни сердца, связанной с фиброзом. Поэтому перекрестная реактивность антитела против BMP6 с BMP7 не желательна.

Дополнительная информация, связанная с BMP7, предоставлена в уровне техники, например, Hahn et al. 1992 *Genomics* 14: 759; Chen et al. 2004 *Growth Factors* 22: 233; Itoh et al. 2001 *EMBO J.* 20: 4132; Zeisberg et al. 2003 *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 285: F1060; Kallui et al. 2009 *J. Clin. Invest.* 119: 1420; и Wang et al. 2001 *J. Am. Soc. Neph.* 12: 2392.

Гепсидин является пептидным гормоном, также известным как HAMP (противомикробный белок или пептид гепсидин).

Недавнее событие дупликации гена в эволюции мышей привело к появлению у мышей двух аналогичных генов гепсидина, гепсидина 1 и гепсидина 2, Ilyin et al. 2003 *FEBS Lett.* 542: 22-26. Мышиный гепсидин 2 не содержит несколько консервативных остатков, обнаруженных в гепсидинах млекопитающих, Lou et al. 2004 *Blood* 103: 2816-2821.

Продукт гена гепсидина участвует в поддержании гомеостаза железа, при этом он необходим для регуляции накопления железа в макрофагах и для абсорбции железа в кишечнике. Эти пептиды проявляют противомикробную активность.

Препробелок (или препогормон или препогепсидин) (84 ак) и пробелок (или прогормон или прогепсидин) (60 ак) процессируются в зрелые пептиды размером 20, 22 и 25 аминокислот. 25-ак пептид секретируется, главным образом, в печени и считается "главным регулятором" метаболизма железа. 20- и 22-ак метаболиты присутствуют в моче. N-концевая область гепсидина необходима для функции; делеция 5 N-концевых аминокислот приводит к потере функции.

Активные пептиды гепсидина богаты цистеинами, которые образуют внутримолекулярные связи, которые стабилизируют их бета-складчатые структуры.

Гепсидин в основном синтезируется в печени, при этом меньшие количества, как было установлено, синтезировались в других тканях, Bekri et al. 2006 *Gastroent.* 131: 788-96.

25-ак пептид гепсидина секретируется, главным образом, в печени и считается "главным регулятором" метаболизма железа. Гепсидин ингибирует транспортировку железа, связываясь с каналом экспорта железа, ферропортином, который расположен на базолатеральной поверхности энтероцитов кишечника и плазматической мембране ретикулоэндотелиальных клеток (макрофагов). Ингибируя ферропортин, гепсидин препятствует секреции железа энтероцитами кишечника в воротную систему печени, функционально снижая, таким образом, абсорбцию железа. Ингибирование ферропортина также препятствует высвобождению железа из макрофагов; поэтому гепсидин поддерживает гомеостаз железа. Активность гепсидина также частично ответственна за секвестрацию железа, наблюдаемую при анемии на фоне хронического воспаления, такого как воспалительное заболевание кишечника, хроническая сердечная недостаточность, карциномы, ревматоидный артрит и почечная недостаточность.

Мутации в гене гепсидина вызывают гемохроматоз типа 2В, также известный как ювенильный гемохроматоз, заболевание, вызванное тяжелым перенасыщением железа, которое приводит к кардиомиопатии, циррозу и эндокринной недостаточности.

Большинство случаев ювенильного гемохроматоза происходит вследствие мутаций в гемоювелине, регуляторе продукции гепсидина.

Генетически модифицированные мыши, созданные с гиперэкспрессией гепсидина, погибают вскоре после рождения с тяжелым железodefицитом, что указывает на центральную и незаменимую роль в регуляции обмена железа. Первые подтверждения, которые связывали гепсидин с анемией при воспалении, были получены при анализе исследователями тканей двух больных с опухолями печени и тяжелой микроцитарной анемией, которая не отвечала на препараты железа. Опухолевая ткань повышенно продуцировала гепсидин, и удаление опухолей хирургическим путем привело к излечению анемии.

Существует множество заболеваний, при которых нарушение нормальной абсорбции железа способствует развитию дефицита железа и железodefицитной анемии. Лечение будет зависеть от уровней гепсидина, поскольку пероральное лечение, скорее всего, будет неэффективным, если гепсидин блокирует абсорбцию в тонком кишечнике.

В одном варианте осуществления введения антитела или его связывающего фрагмента к BMP6 уменьшает активность и/или уровень гепсидина и, таким образом, может применяться в лечении анемии. В одном варианте осуществления изобретение относится к способу снижения активности или уровня гепсидина у пациента, включающему стадию введения пациенту антитела или его антигенсвязывающего

фрагмента к ВМР6. В одном варианте осуществления активность или уровень гепсидина уменьшены по меньшей мере на 50%.

Ингибиторы гепсидина, такие как антитела к ВМР6, могут применяться для лечения ассоциированного с гепсидином заболевания. Это включает любое заболевание, ассоциированное с гепсидином и/или мутацией, и/или гиперэкспрессией дикого типа и/или мутантного гепсидина, и/или заболевания, где прогрессирование заболевания усиливается или прогноз ухудшается в присутствии гепсидина и/или в результате мутации, и/или гиперэкспрессии дикого типа и/или мутантного гепсидина, и/или пониженной почечной элиминации гепсидина с мочой.

Неограничивающие примеры ассоциированных с гепсидином заболеваний включают: анемию, железодефицитный эритропоэз, гипохромность, нарушенное усвоение железа с пищей, секвестрацию железа, анемию при воспалении (АИ), атеросклероз, диабет и многие нейродегенеративные нарушения, такие как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и атацию Фридриха, сердечную недостаточность, хроническую болезнь почек, кардиоренальный анемический синдром, инфекцию, потерю крови, гемолиз, дефицит витамина В12 или фолата, гиперпаратиреоз, гемоглобинопатии и злокачественные новообразования, рак, СПИД, хирургическое вмешательство, плохой рост и/или потерю волос. В одном варианте осуществления пациент является пациентом на диализе. В одном варианте осуществления ассоциированным с гепсидином заболеванием является анемия, и пациент является пациентом на диализе. Распространенность железодефицитной и ЭСП-рефрактерной анемии высока в группе лиц, нуждающихся в хроническом гемодиализе.

Анемия включает, среди прочего, анемию при хроническом заболевании (АХЗ), анемию при хронической болезни почек (ХБП), анемию при раке, эритропоэз-стимулирующий препарат (ЭСП) резистентную анемию и/или железодефицитную анемию.

Анемия при ХБП является распространенным и ранним осложнением хронической болезни почек. Анемия при раке вызвана гематологическими злокачественными новообразованиями и некоторыми солидными опухолями. Как определено в настоящем описании, данный термин также включает анемию, вызванную химиотерапией, которая представляет собой анемию, вызванную химиотерапевтическими средствами. Анемия при хронических болезнях почек может вызывать прогрессирование диабетической нейропатии, сердечно-сосудистого заболевания, ретинопатии и других нарушений. Ассоциированная с раком анемия связана с повышенным риском смерти.

Некоторые хронические заболевания, такие как рак, заболевание почек и аутоиммунные нарушения, могут приводить к анемии. Избыточно активные воспалительные цитокины могут вызывать дисрегуляцию гомеостаза железа, снижение эритропоэза и сокращение жизненного цикла эритроцитов. Некоторые способы лечения анемии включают применение ЭСП, эритропоэтина, железа (в виде пищевой добавки) или переливание крови.

Гепсидин является ключевым гормоном, участвующим в гомеостазе железа. Высокий уровень гепсидина связывался с железодефицитным эритропоэзом при АХЗ. ВМР6, как известно, повышает экспрессию гепсидина.

Различные типы антител и их антигенсвязывающих фрагментов к ВМР6 описаны ниже.

Гомологичные антитела

В еще одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, включающим аминокислотные последовательности, которые гомологичны последовательностям, описанным в табл. 1, при этом указанное антитело связывается с ВМР6 и сохраняет требуемые функциональные свойства тех антител, которые описаны в табл. 1.

Например, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу (или его функциональному антигенсвязывающему фрагменту), включающему переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, где переменная область тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16; 36; 56 или 76; переменная область легкой цепи включает аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 26; 46; 66 или 86; антитело специфично связывается с белком ВМР6, и антитело может ингибировать лизис эритроцитов в гемолитическом тесте, где гемолитический тест известен в уровне техники. В определенном примере такие антитела имеют значение IC_{50} в гемолитическом тесте 20-200 пМ при использовании человеческой ВМР6-обедненной сыворотки, которую восстанавливают 100 пМ человеческого ВМР6.

В одном варианте осуществления аминокислотные последовательности VH и/или VL могут быть на 50, 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичными последовательностям, представленным в табл. 1. В одном варианте осуществления аминокислотные последовательности VH и/или VL могут быть идентичными за исключением аминокислотной замены не более чем в 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных положениях. Антитело, имеющее VH и VL области, обладающие высокой (т.е. 80% или больше) идентичностью с VH и VL областями, описанными в табл. 1, может быть получено с помощью мутагенеза (например, сайт-направленного или ПЦР-опосредованного мутагенеза) молекул нуклеиновых кислот, кодируемых в

SEQ ID NO: 16; 36; 56 или 76; и 26; 46; 66 или 86, соответственно, с последующей проверкой кодируемого измененного антитела на сохранение функции при использовании функциональных анализов, описанных в настоящем изобретении.

В одном варианте осуществления аминокислотные последовательности полноразмерной тяжелой цепи и/или полноразмерной легкой цепи могут быть на 50, 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичными последовательностям, представленным в табл. 1. Антитело, имеющее полноразмерную тяжелую цепь и полноразмерную легкую цепь, обладающие высокой (т.е. 80% или больше) идентичностью с полноразмерными тяжелыми цепями любого из SEQ ID NO: 18; 38; 58 или 78 и полноразмерными легкими цепями любого из SEQ ID NO: 28; 48; 68 или 88, соответственно, может быть получено с помощью мутагенеза (например, сайт-направленного или ПЦР-опосредованного мутагенеза) молекул нуклеиновых кислот, кодирующих такие полипептиды, соответственно, с последующей проверкой кодируемого измененного антитела на сохранение функции при использовании функциональных анализов, описанных в настоящем изобретении.

В одном варианте осуществления нуклеотидные последовательности полноразмерной тяжелой цепи и/или полноразмерной легкой цепи могут быть на 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичными последовательностям, представленным в табл. 1.

В одном варианте осуществления нуклеотидные последовательности переменных областей тяжелой цепи и/или легкой цепи могут быть на 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичными последовательностям, представленным в табл. 1.

При использовании в настоящем описании процент идентичности между двумя последовательностями зависит от количества идентичных положений, общих для данных последовательностей (т.е. % идентичности равен количеству идентичных положений/общее количество положений×100), с учетом количества пропусков и длины каждого пропуска, которые требуется ввести для оптимального выравнивания двух последовательностей. Сравнение последовательностей и определение процента идентичности между двумя последовательностями могут быть выполнены при использовании математического алгоритма, как описано в неограничивающих примерах ниже.

Дополнительно или альтернативно белковые последовательности настоящего изобретения могут также применяться в качестве "запрашиваемой последовательности", для выполнения поиска в общедоступных базах данных, например, с целью определения родственных последовательностей. Например, такие поиски могут быть выполнены при использовании программы BLAST (версии 2.0) (Altschul, et al., 1990 J. Mol. Biol. 215:403-10).

Антитела с консервативными модификациями.

В одном варианте осуществления антитело согласно изобретению имеет переменную область тяжелой цепи, включающую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, и переменную область легкой цепи, включающую последовательности CDR1, CDR2, и CDR3, где одна или более таких последовательностей CDR имеют определенные аминокислотные последовательности на основе антител, описанных в настоящем изобретении, или их консервативные модификации, и где антитела сохраняют требуемые функциональные свойства BМР6-связывающих антител и их антигенсвязывающих фрагментов согласно изобретению. Таким образом, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его функциональному антигенсвязывающему фрагменту, состоящим из переменной области тяжелой цепи, включающей последовательности CDR1, CDR2, и CDR3, и переменной области легкой цепи, включающей последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, где: переменная область тяжелой цепи CDR1 включает аминокислотную последовательность, выбранную из любого из SEQ ID NO: 29, 49, 69, 12, 32, 52, 72 или 9, или их консервативные варианты; переменная область тяжелой цепи CDR2 включает аминокислотную последовательность, выбранную из любого из SEQ ID NO: 10, 30, 50, 70, 13, 33, 53 или 73, или их консервативные варианты; переменная область тяжелой цепи CDR3 включает аминокислотную последовательность, выбранную из любого из SEQ ID NO: 11, 31, 51, 71, 14, 34, 54 или 74, или их консервативные варианты; переменная область легкой цепи CDR1 включает аминокислотную последовательность, выбранную из любого из SEQ ID NO: 19, 39, 59, 79, 22, 42, 62 или 82, или их консервативные варианты; переменная область легкой цепи CDR2 включает аминокислотную последовательность, выбранную из любого из SEQ ID NO: 20, 40, 60, 80, 23, 43, 63 или 83, или их консервативные варианты; и переменная область легкой цепи CDR3 включает аминокислотную последовательность, выбранную из любого из SEQ ID NO: 21, 41, 61, 81, 24, 44, 64 или 84, или их консервативные варианты; антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфично связываются с BМР6 и ингибируют лизис эритроцитов в гемолитическом тесте.

В одном варианте осуществления антитело согласно изобретению, оптимизированное для экспрессии в клетке млекопитающего, имеет полноразмерную последовательность тяжелой цепи и полноразмерную последовательность легкой цепи, где одна или более этих последовательностей имеют определенные аминокислотные последовательности на основе антител, описанных в настоящем изобретении, или их консервативные модификации, и где антитела сохраняют требуемые функциональные свойства BМР6-связывающих антител и их антигенсвязывающих фрагментов согласно изобретению. Таким образом, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу, оптимизированному для экс-

прессии в клетке млекопитающего, состоящее из полноразмерной тяжелой цепи и полноразмерной легкой цепи, где: полноразмерная тяжелая цепь имеет аминокислотные последовательности, выбранные из группы SEQ ID NO: 18; 38; 58 или 78, и их консервативные модификации; и полноразмерная легкая цепь имеет аминокислотные последовательности, выбранные из группы SEQ ID NO: 28; 48; 68 или 88, и их консервативные модификации; антитело специфично связывается с BMR6; и антитело ингибирует лизис эритроцитов в гемолитическом тесте, как описано в настоящем изобретении. В определенном варианте осуществления такие антитела имеют значение IC_{50} в гемолитическом тесте 20-200 пМ при использовании человеческой BMR6-обедненной сыворотки, которую восстанавливают 100 пМ человеческого BMR6.

Антитела, которые связываются с одним и тем же эпитопом

Настоящее изобретение относится к антителам, которые связываются с одним и тем же эпитопом, как и BMR6-связывающие антитела, перечисленные в табл. 1. Эпитоп, связываемый антителом 7, показан на фиг. 5. Дополнительные антитела, таким образом, могут быть определены на основе их способности перекрестно конкурировать (например, конкурентно ингибировать связывание, статистически значимым образом) с другими антителами и их антигенсвязывающими фрагментами согласно изобретению в анализах связывания BMR6. Способность тестируемого антитела ингибировать связывание антител и их антигенсвязывающих фрагментов согласно настоящему изобретению с белком BMR6 демонстрирует, что тестируемое антитело может конкурировать с таким антителом за связывание с BMR6; такое антитело, согласно неограничивающей теории, может связываться с таким же или родственным (например, структурно подобным или пространственно ближайшим) эпитопом на BMR6, как и антитело, с которым оно конкурирует. В определенном варианте осуществления антитело, которое связывается с таким же эпитопом на BMR6, как антитела и их антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению, является человеческим моноклональным антителом. Такие человеческие моноклональные антитела могут быть получены и выделены, как описано в настоящем изобретении.

После определения требуемого эпитопа на антигене, антитела к данному эпитопу можно получить, например, с применением способов, описанных в настоящем изобретении. В альтернативе, в ходе процесса открытия, получения и анализа антител можно получать информацию о нужных эпитопах. Затем на основе этой информации можно подвергать антитела конкурентному скринингу на связывание с тем же эпитопом. Подход для достижения этого состоит в проведении исследований с перекрестной конкуренцией для поиска антител, которые конкурентно связываются друг с другом, например, антитела конкурируют за связывание с антигеном. Высокопроизводительный способ "сортировки" антител, основанный на их перекрестной конкуренции, описан в международной заявке на патент WO 2003/48731. Как будет очевидно специалисту в данной области, практически все, с чем может специфично связываться антитело, может быть эпитопом. Эпитоп может включать те остатки, с которыми связывается антитело.

Обычно антитела, специфичные к конкретному антигену-мишени, предпочтительно распознают эпитоп на антигене-мишени в сложной смеси белков и/или макромолекул.

Области данного полипептида, которые включают эпитоп, могут быть определены при использовании любого количества методик картирования эпитопов, известных в уровне техники. См., например, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, New Jersey. Например, линейные эпитопы могут быть определены, например, при одновременном синтезе большого количества пептидов на твердых подложках, причем пептиды соответствуют частям белковой молекулы, и взаимодействию пептидов с антителами, тогда как пептиды все еще прикреплены к подложкам. Такие методики известны в уровне техники и описаны, например, в патенте США 4708871; Geysen et al., (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 8:3998-4002; Geysen et al., (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:78-182; Geysen et al., (1986) Mol. Immunol. 23:709-715. Аналогичным образом, конформационные эпитопы можно с легкостью идентифицировать путем определения пространственной структуры аминокислот BMR6, например, с помощью водород/дейтериевого обмена, рентгеновской кристаллографии и двумерного ядерного магнитного резонанса. См., например, Epitope Mapping Protocols, выше. Антигенные области белков могут быть также идентифицированы при использовании стандартных кривых антигенности и гидрофобности, таких как вычисляемые при использовании, например, программы Omega версии 1.0, доступной от Oxford Molecular Group. В этой компьютерной программе применен метод Хоппа/Вудса, Hopp et al., (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:3824-3828; для определения профилей антигенности, и методика Кайта-Дулитла, Kyte et al., (1982) J. Mol. Biol. 157:105-132; для кривых гидрофобности.

Сконструированные и модифицированные антитела Антитело согласно изобретению также может быть получено при использовании антитела, имеющего одну или более последовательностей VH и/или VL, которые показаны в настоящем изобретении в качестве исходного материала для конструирования модифицированного антитела, где модифицированное антитело может обладать измененными свойствами по сравнению с исходным антителом. Антитело может быть сконструировано путем модификации одного или нескольких остатков в одной или обеих вариабельных областях (т.е. VH и VL), например, в одной или более CDR областях и/или в одной или более каркасных областях. Дополнительно или альтернативно антитело может быть сконструировано путем изменения остатков в константной области(ях), например, для изменения эффекторной функции(й) антитела.

Одним из типов конструирования варибельной области, которое может быть выполнено, является CDR-графтинг. Антитела взаимодействуют с антигенами-мишенями преимущественно через остатки аминокислот, которые расположены в шести определяющих комплементарность областях (CDR) тяжелой и легкой цепи. Поэтому аминокислотные последовательности в CDR-областях более разнообразны в отдельных антителах, чем последовательности за пределами CDR-областей. Поскольку CDR последовательности ответственны за большую часть взаимодействий антитела-антигена, можно экспрессировать рекомбинантные антитела, которые воспроизводят свойства определенных природных антител, посредством конструирования векторов экспрессии, которые включают CDR последовательности из определенного природного антитела, перевитые на каркасные последовательности из другого антитела с другими свойствами (см., например, Riechmann, L. et al., 1998 *Nature* 332:323-327; Jones, P. et al., 1986 *Nature* 321:522-525; Queen, C. et al., 1989 *Proc. Natl. Acad. U.S.A.* 86:10029-10033; патент США 5225539 (Winter) и патенты США 5530101; 5585089; 5693762 и 6180370 (Queen et al.)).

Такие каркасные последовательности могут быть получены из общедоступных баз данных ДНК или опубликованных источников, которые включают последовательности генов антител зародышевой линии. Например, последовательности ДНК зародышевой линии человеческих генов варибельной области тяжелой и легкой цепи можно найти в базе данных человеческих последовательностей зародышевой линии "VBase" (доступной в Интернете по адресу www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase), а также в Kabat, E.A., et al., 1991 *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Tomlinson, I. M., et al., 1992 *J. Mol. Biol.* 227:776-798; и Cox, J. P. L. et al., 1994 *Eur. J. Immunol.* 24:827-836; содержание каждого из которых прямо включено в настоящую заявку посредством отсылки.

Примерами каркасных последовательностей для применения в антителах и их антигенсвязывающих фрагментах согласно изобретению являются каркасные последовательности, которые структурно подобны каркасным последовательностям, применяемым в выбранных антителах и их антигенсвязывающих фрагментах согласно настоящему изобретению, например, консенсусные последовательности и/или каркасные последовательности, применяемые в моноклональных антителах согласно изобретению. Последовательности CDR1, 2 и 3 VH и последовательности CDR1, 2 и 3 VL могут быть перевиты на каркасные области, которые имеют идентичную последовательность, как последовательность, обнаруженная в гене иммуноглобулина зародышевой линии, из которого происходит каркасная последовательность, или CDR последовательности могут быть перевиты на каркасные области, которые содержат одну или более мутаций по сравнению с последовательностями зародышевой линии. Например, было обнаружено, что в некоторых случаях предпочтительно подвергнуть остатки в каркасных областях мутации с сохранением или увеличением антигенсвязывающей способности антитела (см., например, патенты США 5530101; 5585089; 5693762 и 6180370 (Queen et al.)).

Другой тип модификации варибельной области заключается в мутации остатков аминокислот в CDR1, CDR2 и/или CDR3 областях VH и/или VL, чтобы, таким образом, улучшить одно или более связывающих свойств (например, аффинность) представляющего интерес антитела, и известен как "созревание аффинности". Сайт-направленный мутагенез или ПЦР-опосредованный мутагенез могут быть выполнены для введения мутации(й), при этом влияние на связывание антитела или другое представляющее интерес функциональное свойство можно оценить в *in vitro* или *in vivo* анализах, как описано в настоящем изобретении и представлено в примерах. Могут быть введены консервативные модификации (как обсуждается выше). Мутации могут быть аминокислотными заменами, добавлениями или делециями. Кроме того, как правило, изменены не больше одного, двух, трех, четырех или пяти остатков в CDR области.

Графтинг антигенсвязывающих доменов в альтернативные каркасы или скаффолды

Целый ряд каркасов или скаффолдов антител/иммуноглобулинов может использоваться при условии, что полученный полипептид будет включать по меньшей мере одну связывающую область, которая специфично связывается с BМР6. Такие каркасы или скаффолды включают 5 основных идиотипов человеческих иммуноглобулинов, их антигенсвязывающие фрагменты, и включают иммуноглобулины животных других видов, предпочтительно имеющие гуманизированные аспекты. Антитела с одной тяжелой цепью, такие как антитела, обнаруженные у верблюдовых, особенно интересны в этом отношении. Специалисты продолжают открывать и создавать новые каркасы, скаффолды и фрагменты.

В одном аспекте изобретение относится к способу создания антител не на основе иммуноглобулина с применением неиммуноглобулиновых скаффолдов, на которые могут быть перевиты CDR изобретения. Известные или будущие неиммуноглобулиновые каркасы и скаффолды могут использоваться при условии, что они включают связывающую область, специфичную к целевому белку BМР6. Известные неиммуноглобулиновые каркасы или скаффолды включают, без ограничения перечисленными, фибронектин (Compound Therapeutics, Inc., Waltham, Mass.), анкирин (Molecular Partners AG, Zurich, Switzerland), доменные антитела (Domantis, Ltd., Cambridge, Mass., и Ablynx nv, Zwijnaarde, Belgium), липокалин (Pieris Proteolab AG, Freising, Germany), малые модульные иммуно-фармацевтические средства (Trubion Pharmaceuticals Inc., Seattle, Wash.), макситела (Avidia, Inc., Mountain View, Calif.), белок А (Affibody AG, Sweden) и аффилин (гамма-кристаллин или убиквитин) (SciI Proteins GmbH, Halle, Germany).

Фибронектиновые скаффолды основаны на домене фибронектина III типа (например, десятом модуле фибронектина III типа (10 домен Fn3)). Домен фибронектина III типа имеет 7 или 8 бета-тяжей, которые распределены между двумя бета-слоями, которые упаковываются друг напротив друга, формируя кор белка, а также содержит петли (аналогичные CDR-областям), которые соединяют бета-тяжи друг с другом и являются гидрофильными. Существует по меньшей мере три таких петли на каждом краю бета-складчатого сэндвича, где край является границей белка, перпендикулярного направлению бета-тяжей (см. патент США 6818418). Такие скаффолды на основе фибронектина не относятся к иммуноглобулину, хотя общая укладка очень близка наименьшему функциональному фрагменту антител, варибельной области тяжелой цепи, которая включает всю антиген-распознающую единицу в IgG верблюда и ламы. Благодаря такой структуре неиммуноглобулиновое антитело имитирует антигенсвязывающие свойства, которые подобны по своей природе и аффинности свойствам антител. Такие скаффолды могут применяться в стратегии рандомизации и перетасовки петель *in vitro*, которая подобна процессу созревания аффинности антител *in vivo*. Эти молекулы на основе фибронектина могут применяться в качестве скаффолдов, где области петель молекулы могут быть заменены CDR-областями изобретения при использовании стандартных методов клонирования.

Технология анкирина основана на применении белков с повторяющимися модулями на основе анкирина в качестве скаффолдов, несущих варибельные области, которые могут применяться для связывания с различными мишенями. Модуль анкиринового повтора представляет собой полипептид длиной 33 аминокислоты, состоящий из двух антипараллельных альфа-спиралей и бета-изгиба. Связывание варибельных областей обычно оптимизируют при помощи рибосомного дисплея.

Авимеры получают из природного А-домен-содержащего белка, такого как LRP-1. Эти домены используются благодаря своей природе белок-белковых взаимодействий, при этом у человека более 250 белков структурно основаны на А-доменах. Авимеры состоят из некоторого количества различных номерных "А-доменов" (2-10), связанных аминокислотным линкером. Могут быть получены авимеры, которые могут связываться с антигеном-мишенью, при использовании методики, описанной, например, в публикациях заявок на патенты США 20040175756; 20050053973; 20050048512 и 20060008844.

Аффитела, аффинные лиганды, представляют собой небольшие простые белки, состоящие из трех-спирального тяжа на основе скаффолда одного из IgG-связывающих доменов белка А. Белок А, поверхностный белок золотистого стафилококка *Staphylococcus aureus*. Этот каркасный домен состоит из 58 аминокислот, 13 из которых рандомизируют с получением библиотек аффител с большим количеством вариантов лигандов (см., например, патент США 5831012). Молекулы аффител подобны антителам, при этом они имеют молекулярную массу 6 кДа, по сравнению с молекулярной массой антител, которая составляет 150 кДа. Несмотря на свой небольшой размер, связывающий участок молекул аффител подобен связывающему участку антитела.

Антикарины являются продуктами, разработанными компанией Pieris ProteoLab AG. Они получены из липокалинов, широко распространенной группы небольших и жестких белков, которые обычно участвуют в физиологическом транспорте или хранении химически чувствительных или нерастворимых соединений. Несколько природных липокалинов присутствуют в тканях или жидкостях тела человека. Белковая архитектура напоминает структуру иммуноглобулинов с гиперварибельными петлями сверху жесткого каркаса. Однако в отличие от антител или их рекомбинантных фрагментов, липокалины состоят из одной полипептидной цепи из 160-180 аминокислотных остатков, являясь лишь незначительно больше, чем один домен иммуноглобулина. Набор из четырех петель, которые формируют связывающий карман, демонстрирует выраженную структурную пластичность и допускает множество боковых цепей. Форму связывающего участка можно, таким образом, изменять запатентованным способом, чтобы распознавать требуемые молекулы-мишени различной формы с высокой аффинностью и специфичностью. Один белок семейства липокалинов, билин-связывающий белок (BBP) из *Pieris Brassicae* использовали для создания антикалинов посредством мутагенеза набора из четырех петель. Одним из примеров заявки на патент, в которой описаны антикарины, является публикация PCT WO199916873.

Молекулы аффилинов представляют собой небольшие неиммуноглобулиновые белки, которые созданы со специфической аффинностью к белкам и малым молекулам. Новые молекулы аффилинов могут быть очень быстро отобраны из двух библиотек, каждая из которых основана на отдельном каркасном белке человеческого происхождения. Молекулы аффилинов не демонстрируют структурной гомологии с белками иммуноглобулинов. В настоящее время используются два аффилиновых скаффолда, один из которых является гамма-кристаллином, человеческим структурным белком хрусталика глаза, а другой является белком из суперсемейства "убиквитина". Оба человеческих скаффолда очень маленькие, демонстрируют термостабильность и практически устойчивы к изменениям pH и денатурирующим агентам. Такая высокая стабильность обусловлена главным образом расширенной бета-складчатой структурой данных белков. Примеры белков на основе гамма-кристаллина описаны в WO 200104144, и примеры "убиквитин-подобных" белков описаны в WO 2004106368.

Миметики белковых эпитопов (РЕМ) представляют собой циклические пептидоподобные молекулы среднего размера (мол. вес 1-2 кДа), имитирующие бета-шпильчатые вторичные структуры белков, основную вторичную структуру, участвующую в белок-белковых взаимодействиях.

Антитела, связывающие человеческий BМР6, могут быть получены с применением способов, известных в уровне техники. Например, технология "гуманиринг", используемая для превращения нечеловеческих антител в сконструированные человеческие антитела. В патентной публикации США 20050008625 описан *in vivo* способ замены вариабельной области нечеловеческого антитела человеческой вариабельной областью в антителе с сохранением или улучшением связывающих свойств по сравнению с нечеловеческим антителом. Способ основан на направляемой эпитопами замене вариабельных областей нечеловеческого референсного антитела полностью человеческим антителом. Получаемое человеческое антитело обычно отличается по структуре от референсного нечеловеческого антитела, но связывается с таким же эпитопом на том же антигене, что и референсное антитело. Коротко, серийный направляемый эпитопами метод замены комплементарности осуществляют посредством обеспечения конкуренции в клетках между "конкурентом" и библиотекой разнообразных гибридов референсного антитела ("тестируемых антител") для связывания с ограниченными количествами антигена в присутствии репортерной системы, которая реагирует на связывание тестируемого антитела с антигеном. Конкурент может быть референсным антителом или его производным, таким как одноцепочечный Fv-фрагмент. Конкурент может быть также природным или искусственным лигандом антигена, который связывается с тем же эпитопом, что и референсное антитело. Единственным требованием к конкуренту является то, что он должен связываться с тем же эпитопом, что и референсное антитело, и конкурировать с референсным антителом за связывание с антигеном.

Тестируемые антитела имеют одну общую антигенсвязывающую V-область из нечеловеческого референсного антитела, при этом другую V-область выбирают случайно из обширного источника, такого как библиотека репертуара человеческих антител. Общая V-область из референсного антитела служит гидом, направляющим тестируемые антитела на тот же эпитоп на антигене, и в той же самой ориентации, чтобы отбор проходил в направлении наиболее высокого антигенсвязывающего соответствия референсному антителу.

Для обнаружения требуемых взаимодействий между тестируемыми антителами и антигеном могут использоваться множество типов репортерной системы. Например, дополняющие репортер фрагменты могут быть связаны с антигеном и тестируемым антителом, соответственно, при этом активация репортера в результате комплементации фрагмента происходит только в том случае, когда тестируемое антитело связывается с антигеном. При совместной экспрессии слитых конструкций тестируемого антитела и антигена-репортерного фрагмента с конкурентом активация репортера становится зависимой от способности тестируемого антитела конкурировать с конкурентом, которая пропорциональна аффинности тестируемого антитела к антигену. Другие репортерные системы, которые могут использоваться, включают реактиватор системы реактивации аутоингибируемого репортера (RAIR), раскрытый в заявке на патент США 10/208730 (публикация 20030198971), или систему конкурентной активации, раскрытую в заявке на патент США 10/076845 (публикация 20030157579).

В случае серийной эпитоп-направляемой системы замены комплементарности отбор производят с целью обнаружения клеток, которые экспрессируют одно тестируемое антитело вместе с конкурентом, антигеном и компонентами репортера. В этих клетках каждое тестируемое антитело конкурирует один на один с конкурентом за связывание с ограниченным количеством антигена. Активность репортера пропорциональна количеству антигена, связавшегося с тестируемым антителом, которое в свою очередь пропорционально аффинности тестируемого антитела к антигену и стабильности тестируемого антитела. Тестируемые антитела первоначально отбирают по их активности в сравнении с активностью референсного антитела, при экспрессии в качестве тестируемого антитела. Результатом первого раунда отбора является набор "гибридных" антител, каждое из которых состоит из той же нечеловеческой V-области из референсного антитела и человеческой V-области из библиотеки, и каждое из которых связывается с тем же эпитопом на антигене, что и референсное антитело. Одно или более гибридных антител, отобранных в первом раунде, будет обладать аффинностью к антигену, сопоставимой или превышающей аффинность референсного антитела.

Во втором этапе замены V-области человеческие V-области, отобранные в первом этапе, используются в качестве гида для отбора человеческих замен оставшейся V-области нечеловеческого референсного антитела при использовании обширной библиотеки когнатных человеческих V-областей. Гибридные антитела, отобранные в первом раунде, могут также использоваться в качестве конкурентов для второго раунда отбора. Результатом второго раунда отбора является набор полностью человеческих антител, которые отличаются по структуре от референсного антитела, но которые конкурируют с референсным антителом за связывание с одним и тем же антигеном. Некоторые отобранные человеческие антитела связываются с тем же эпитопом на том же антигене, что и референсное антитело. Из этих отобранных человеческих антител одно или более связываются с тем же эпитопом с аффинностью, которая сопоставима или выше, чем у референсного антитела.

При использовании одного из мышинных или химерных BМР6-связывающих антител, описанных выше в качестве референсного антитела, данный способ может с легкостью применяться для получения человеческих антител, которые связываются с человеческим BМР6 с такой же специфичностью связывания и такой же или лучшей аффинностью связывания. Кроме того, такие антитела, связывающие челове-

ческий BMR6, могут быть также приобретены у компаний, которые обычно производят человеческие антитела, например, KaloBios, Inc. (Mountain View, Calif.).

Антитела верблюдовых

Белки антител, полученные от членов семейства верблюдов и дромадеров (*Camelus bactrianus* и *Camelus dromaderius*), включающего представителей Нового света, таких как виды лам (*Lama pacos*, *Lama glama* и *Lama vicugna*), были исследованы по размеру, структурной сложности и антигенности для людей. Некоторые IgG антитела из этого семейства млекопитающих, как было обнаружено в природе, не имеют легких цепей, и, таким образом, структурно отличаются от типичной четырехцепочечной четвертичной структуры, содержащей две тяжелых и две легких цепи, как в антителах других животных. См. PCT/EP93/02214 (WO 94/04678, опубликованная 3 марта 1994 г.).

Область антитела верблюдовых, которая является малым одиночным варибельным доменом, обозначаемым как VHH, может быть получена методами генной инженерии в виде небольшого белка, обладающего высокой аффинностью к мишени, в результате чего получают белок с низкой молекулярной массой на основе антитела, известный как "верблюжье нанотело". См. патент США 5759808, выданный 2 июня 1998 года; см. также Stijlemans, B. et al., 2004 J Biol Chem 279: 1256-1261; Dumoulin, M. et al., 2003 Nature 424: 783-788; Pleschberger, M. et al. 2003 Bioconjugate Chem 14: 440-448; Cortez-Retamozo, V. et al. 2002 Int J Cancer 89: 456-62; и Lauwereys, M. et al. 1998 EMBO J 17: 3512-3520. Сконструированные библиотеки верблюжьих антител и фрагментов антител коммерчески доступны, например, от Ablynx, Ghent, Belgium. Как и в случае с другими антителами и их антигенсвязывающими фрагментами нечеловеческого происхождения, аминокислотная последовательность верблюжьего антитела может быть изменена рекомбинантно, с получением последовательности, которая в большей степени подобна человеческой последовательности, т.е. нанотело может быть "гуманизировано". Таким образом, природная низкая антигенность верблюжьих антител для людей может быть еще больше снижена.

Верблюжье нанотело имеет молекулярную массу, составляющую приблизительно одну десятую от массы человеческой молекулы IgG, и белок имеет физический диаметр лишь несколько миллимикрон. Одним из следствий малого размера является способность верблюжьих нанотел связываться с антигенными участками, которые функционально необнаружимы для более крупных белков антител, т.е. верблюжьим нанотелом могут применяться в качестве реагентов для обнаружения антигенов, которые в иных случаях являются скрытыми при использовании классических иммунологических методов, а также в качестве возможных терапевтических средств. Таким образом, еще одним следствием малого размера является то, что верблюжье нанотело может ингибировать, связываясь со специфическим участком в борозде или узком углублении белка-мишени, и, следовательно, может служить в качестве, которое больше напоминает функцию классического низкомолекулярного лекарственного средства, нежели природного антитела.

Низкая молекулярная масса и компактный размер также приводят к верблюжьим нанотелам, являющимся экстремально термостойкими, устойчивыми при экстремальных значениях pH и протеолитическом расщеплении, а также с низкой антигенностью. Другое следствие заключается в том, что верблюжьим нанотелом с легкостью переходят из сердечно-сосудистой системы в ткани, и даже проникают через гематоэнцефалический барьер и могут лечить нарушения, которые поражают нервную ткань. Нанотела также могут способствовать транспорту лекарственного средства через гематоэнцефалический барьер. См. заявку на патент США 20040161738, опубликованную 19 августа 2004 года. Такие свойства, в сочетании с низкой антигенностью для людей, указывают на большой терапевтический потенциал. Кроме того, эти молекулы могут полностью экспрессироваться в прокариотических клетках, таких как *E. coli*, и экспрессироваться в виде слитых белков с бактериофагом и при этом являться функциональными.

Таким образом, признаком настоящего изобретения является верблюжье антитело или нанотело, обладающее высокой аффинностью к BMR6. В одном варианте осуществления в настоящем изобретении верблюжье антитело или нанотело естественно продуцировано у верблюдового животного, т.е. продуцировано верблюдовым после иммунизации BMR6 или его пептидным фрагментом с применением способов, описанных в настоящем изобретении для других антител. В альтернативе BMR6-связывающее верблюжье нанотело сконструировано, т.е. получено в результате отбора, например, из библиотеки фага, презентующего подвергнувшиеся надлежащим образом мутагенезу белки верблюжьего нанотела, с использованием методик сортировки с BMR6 в качестве мишени, как описано в примерах ниже. Сконструированные нанотела могут быть также индивидуально модифицированы с помощью методов генной инженерии для изменения полупериода существования в организме реципиента от 45 мин до 2 недель. В определенном варианте осуществления верблюжье антитело или нанотело получено при графтинге CDR последовательностей тяжелой или легкой цепи человеческих антител согласно изобретению в нанотело или каркасные последовательности однодоменного антитела, как описано, например, в PCT/EP93/02214.

Биспецифические молекулы и мультивалентные антитела

В другом аспекте настоящего изобретения представлены биспецифические или мультиспецифические молекулы, включающие BМР6-связывающее антитело или его фрагмент согласно изобретению. Антитело согласно изобретению или его антигенсвязывающие области могут быть дериватизированы или связаны с другой функциональной молекулой, например другим пептидом или белком (например, другим антителом или лигандом рецептора), с получением биспецифической молекулы, которая связывается по меньшей мере с двумя разными участками связывания или молекулами-мишенями. Антитело согласно изобретению может быть фактически дериватизировано или связано с более чем одной функциональной молекулой, с получением мультиспецифических молекул, которые связываются с более чем двумя разными участками связывания и/или молекулами-мишенями; такие мультиспецифические молекулы, как предполагается, также охвачены термином "биспецифическая молекула", используемым в настоящем описании. Для создания биспецифической молекулы согласно изобретению антитело изобретения может быть функционально связано (например, посредством химического сшивания, генетического слияния, нековалентного связывания или иным способом) с одной или более другими связывающими молекулами, такими как другое антитело, фрагмент антитела, пептид или связывающий миметик, в результате чего получают биспецифическую молекулу.

Таким образом, настоящее изобретение включает биспецифические молекулы, включающие по меньшей мере одну первую специфичность связывания в отношении BМР6 и вторую специфичность связывания в отношении второго эпитопа-мишени. Например, второй целевой эпитоп является другим эпитопом BМР6, отличающимся от первого эпитопа-мишени.

Кроме того, в изобретении, в котором биспецифическая молекула является мультиспецифической, молекула может дополнительно включать третью специфичность связывания, в дополнение к первому и второму эпитопам-мишеням.

В одном варианте осуществления биспецифические молекулы изобретения включают в качестве специфичности связывания по меньшей мере одно антитело или фрагмент антитела, включающий, например, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv или одноцепочечный Fv. Антитело также может быть димером легкой цепи или тяжелой цепи или их любым минимальным фрагментом, таким как Fv или одноцепочечная конструкция, описанная в патенте США 4946778 (Ladner et al.).

Диатела представляют собой бивалентные, биспецифические молекулы, в которых VH и VL домены экспрессируются на одной полипептидной цепи, связанные линкером, который слишком короткий, чтобы допускать спаривание между двумя доменами на одной цепи. VH и VL домены спариваются с комплементарными доменами другой цепи, создавая в результате два антигенсвязывающих участка (см., например, Holliger et al., 1993 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak et al., 1994 Structure 2:1121-1123). Диатела могут быть получены при экспрессии двух полипептидных цепей со структурой либо VHA-VLB и VHB-VLA (конфигурация VH-VL), либо VLA-VHB и VLB-VHA (конфигурация VL-VH) в одной клетке. Большинство из них может быть экспрессировано в растворимой форме в бактериях. Одноцепочечные диатела (scDb) получают при соединении двух формирующих диатело полипептидных цепей линкером длиной приблизительно 15 аминокислотных остатков (см. Holliger and Winter, 1997 Cancer Immunol. Immunother., 45 (3-4):128-30; Wu et al., 1996 Immunotechnology, 2(1):21-36). scDb можно экспрессировать в бактериях в растворимой, активной мономерной форме (см. Holliger and Winter, 1997 Cancer Immunol. Immunother., 45(34):128-30; Wu et al., 1996 Immunotechnology, 2(1):21-36; Pluckthun and Pack, 1997 Immunotechnology, 3(2): 83-105; Ridgway et al., 1996 Protein Eng., 9(7):617-21). Диатело может быть слито с Fc, с получением "ди-диатела" (см. Lu et al., 2004 J. Biol. Chem., 279(4):2856-65).

Другие антитела, которые могут применяться в биспецифических молекулах изобретения, являются мышинными, химерными и гуманизированными моноклональными антителами.

Биспецифические молекулы настоящего изобретения могут быть получены при конъюгировании составных специфичностей связывания с применением способов, известных в уровне техники. Например, каждая специфичность связывания биспецифической молекулы может быть создана отдельно и затем конъюгирована друг с другом. В случае, когда специфичности связывания являются белками или пептидами, различные сшивающие или перекрестно связывающие агенты могут использоваться для ковалентного конъюгирования. Примеры перекрестно связывающих агентов включают белок А, цианамид, N-ацетил-сукцинимидил-5-тиоацетат (SATA), 5,5'-дителиобис(2-нитробензойную кислоту) (DTNB), офенилендималеимид (oPDM), N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP) и сульфосукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (сульфо-SMCC) (см., например, Karpovsky et al., 1984 J. Exp. Med. 160:1686; Liu, M A et al., 1985 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8648). Другие методы включают описанные в Paulus, 1985 Behring Ins. Mitt. No. 78, 118-132; Brennan et al., 1985 Science 229:81-83, и Glennie et al., 1987 J. Immunol. 139: 2367-2375. Конъюгирующими агентами являются SATA и сульфос-SMCC, оба доступны от Pierce Chemical Co. (Rockford, Ill.).

В случае, когда специфичности связывания являются антителами, они могут быть конъюгированы с помощью сульфгидрильного связывания C-концевых шарнирных областей двух тяжелых цепей. В определенном варианте осуществления модифицированная шарнирная область содержит нечетное число сульфгидрильных остатков, например один, перед конъюгированием.

В альтернативе обе специфичности связывания могут кодироваться в одном векторе и экспрессироваться и собираться в одной клетке-хозяине. Данный способ особенно удобен, если биспецифическая молекула представляет собой $mAb \times mAb$, $mAb \times Fab$, $Fab \times F(ab')_2$ или лиганд $\times Fab$ слитый белок. Биспецифическая молекула согласно изобретению может быть одноцепочечной молекулой, включающей одно одноцепочечное антитело и связывающую детерминанту, или одноцепочечной биспецифической молекулой, включающей две связывающих детерминанты. Биспецифические молекулы могут включать по меньшей мере две одноцепочечные молекулы. Способы получения биспецифических молекул описаны, например, в патенте США 5260203; патенте США 5455030; патенте США 4881175; патенте США 5132405; патенте США 5091513; патенте США 5476786; патенте США 5013653; патенте США 5258498; и патенте США 5482858.

Связывание биспецифических молекул с их специфическими мишенями может быть подтверждено, например, с помощью твердофазного иммуоферментного анализа (ELISA), радиоиммуноанализа (РИА), FACS анализа, биоанализа (например, ингибирование роста) или Вестерн-блот анализа. Каждый из указанных анализов обычно позволяет обнаруживать присутствие представляющих особый интерес комплексов белка-антитела при использовании меченого реагента (например, антитела), специфичного к интересующему комплексу.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к мультивалентным соединениям, включающим по меньшей мере две идентичных или различных антигенсвязывающих части антител и их антигенсвязывающих фрагментов согласно изобретению к BMR6. Антигенсвязывающие части могут быть связаны посредством слияния белков или ковалентного или нековалентного связывания. В альтернативе способы связывания были описаны для биспецифических молекул. Тетравалентные соединения могут быть получены, например, при перекрестном сшивании антител и их антигенсвязывающих фрагментов согласно изобретению с антителом или антигенсвязывающим фрагментом, которые связываются с константными областями антител и их антигенсвязывающих фрагментов согласно изобретению, например, шарнирной областью или Fc.

Тримеризующий домен описан, например, в патенте Boreau Pharma EP1012280 B1. Пентамеризующие модули описаны, например, в PCT/EP97/05897.

Антитела с увеличенным полупериодом существования

В настоящем изобретении предусмотрены антитела, которые специфично связываются с BMR6, которые обладают увеличенным полупериодом существования *in vivo*.

Множество факторов могут влиять на полупериод существования белка *in vivo*. В качестве примеров, почечная фильтрация, метаболизм в печени, расщепление протеолитическими ферментами (протеазами) и иммуногенные реакции (например, нейтрализация белка антителами и захват макрофагами и дендритными клетками). Для увеличения полупериода существования антител и их антигенсвязывающих фрагментов настоящего изобретения может использоваться множество стратегий. Например, химическое связывание с полиэтиленгликолем (ПЭГ), reCODE ПЭГ, каркасом антитела, полисиаловой кислотой (ПСК), гидроксипропилахрилатом (ГЭК), альбумин-связывающими лигандами и углеводными щитами; генетическое слияние с белками, связывающимися с сывороточными белками, такими как альбумин, IgG, FcRn и трансферрин; сшивание (генетическое или химическое) с другими связывающими молекулами, которые связываются с сывороточными белками, такие как нанотела, Fab-фрагменты, дарпины, авимеры, аффитела и антикаины; генетическое слияние с рПЭГ, альбумином, доменом альбумина, альбумин-связывающими белками и Fc; или включение в наноносители, лекарственные формы с замедленным высвобождением или медицинские устройства.

Для увеличения продолжительности циркуляции в сыворотке антител *in vivo*, инертные полимерные молекулы, такие как ПЭГ с высоким молекулярным весом, могут быть присоединены к антителам или их фрагменту через многофункциональный линкер или без него, или путем сайт-специфического конъюгирования ПЭГ с N-или C-концом антител, или через эпислон-аминогруппы, присутствующие на остатках лизина. Для пэгирования антитела, антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, как правило, подвергают взаимодействию с полиэтиленгликолем (ПЭГ), таким как реакционно-способный сложный эфир или альдегидное производное ПЭГ, при условиях, в которых одна или более групп ПЭГ связываются с антителом или фрагментом антитела. Пэгирование может быть выполнено с помощью реакции ацилирования или реакции алкилирования с использованием реакционно-способной молекулы ПЭГ (или аналогичного реакционно-способного водорастворимого полимера). При использовании в настоящем описании термин "полиэтиленгликоль" охватывает любую из форм ПЭГ, которые использовали для получения производных других белков, такие как моно(C_1 - C_{10})алкокси- или арилокси-полиэтиленгликоль или полиэтиленгликоль-малеимид. В одном варианте осуществления пэгированное антитело является агликозильированным антителом. Будет использоваться дериватизация линейного или разветвленного полимера, которая приводит к минимальной потере биологической активности. Степень конъюгирования можно точно контролировать с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ и масс-спектрометрии, что гарантирует надлежащее конъюгирование молекул ПЭГ с антителами. Непрореагировавший ПЭГ можно отделить от конъюгатов антитела-ПЭГ с помощью эксклюзионной или ионообменной хроматографии. Пэгированные антитела можно проанализировать на связывающую актив-

ность, а также на эффективность *in vivo* с помощью способов, известных специалистам, например, с помощью иммуноанализов, описанных в настоящем изобретении. Способы пэгилирования белков известны в уровне техники и могут быть применены к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам согласно изобретению. См., например, EP 0154316 (Nishimura et al.) и EP 0401384 (Ishikawa et al.).

Другие модифицированные технологии ПЭГилирования включают технологию реконструирующей химически ортогональной направленной инженерии (ReCODE ПЭГ), которая позволяет вводить химически специфические боковые цепи в биосинтетические белки с помощью реконструирующей системы, которая включает тРНК-синтазу и тРНК. Данная технология позволяет включать более 30 новых аминокислот в биосинтетические белки в *E. coli*, дрожжах и клетках млекопитающих. тРНК включает нормативную аминокислоту в любое положение, в котором присутствует амбер-кодон, преобразуя амбер из терминирующего кодона в кодон, который сигнализирует о включении химически указанной аминокислоты.

Технология рекомбинантного ПЭГилирования (рПЭГ) также может применяться для удлинения полупериода существования в сыворотке. Данная технология включает генетическое слияние конечного неструктурного белкового сегмента из 300-600 аминокислот с существующим фармацевтическим белком. Поскольку кажущаяся молекулярная масса такой неструктурной белковой цепи приблизительно в 15 раз больше, чем ее фактическая молекулярная масса, длительность полупериода существования белка в сыворотке значительно увеличивается. В отличие от традиционного ПЭГилирования, которое требует химического конъюгирования и повторной очистки, процесс производства значительно упрощается, и продукт является гомогенным.

Полисиалирование является другой технологией, в которой для увеличения продолжительности действия и повышения стабильности терапевтических пептидов и белков используется природный полимер, полисиаловая кислота (ПСК). ПСК - полимер сиаловой кислоты (сахара). В случае применения для доставки белковых и терапевтических пептидных лекарственных средств, полисиаловая кислота обеспечивает защитную микросреду при конъюгировании. Она увеличивает продолжительность действия терапевтического белка в кровотоке и препятствует его распознаванию иммунной системой. Полимер ПСК присутствует в природе в теле человека. Его используют некоторые бактерии, которые появились несколько миллионов лет назад, чтобы покрывать им свои клеточные стенки. Такие полисиалированные в естественном состоянии бактерии при этом смогли, посредством молекулярной мимикрии, уклониться от воздействия иммунной системы организма. ПСК, наиболее совершенная технология маскировки в природе, может быть легко получена из таких бактерий в больших количествах и с заданными физическими свойствами. Бактериальная ПСК совершенно не иммуногена, даже при связывании с белками, поскольку она химически идентична ПСК в теле человека.

Другая технология включает применение производных гидроксиэтилкрахмала ("ГЭК"), связываемых с антителами. ГЭК представляет собой модифицированный природный полимер, получаемый из крахмала восковой кукурузы, и может расщепляться ферментами тела. Растворы ГЭК обычно применяют для замещения недостающего объема крови и улучшения реологических свойств крови. ГЭКилирование антитела обеспечивает увеличение длительности полупериода циркуляции, увеличивает стабильность молекулы, а также уменьшает почечный клиренс, что приводит к увеличению биологической активности. При изменении различных параметров, таких как молекулярная масса ГЭК, может быть получен широкий спектр различных конъюгатов ГЭК-антител.

Антитела, имеющие увеличенный полупериод существования *in vivo*, также могут быть получены путем введения одной или более аминокислотных модификаций (т.е. замен, вставок или делеций) в константный домен IgG или его FcRn связывающий фрагмент (предпочтительно в Fc-фрагмент или шарнирную область Fc-домена). См., например, публикацию международной заявки WO 98/23289; публикацию международной заявки WO 97/34631; и патент США 6277375.

Кроме того, антитела могут быть конъюгированы с альбумином, чтобы антитело или фрагмент антитела были более стабильными *in vivo* или имели более длительный полупериод существования *in vivo*. Такие методы известны в уровне техники, см., например, публикации международных заявок WO 93/15199, WO 93/15200 и WO 01/77137; и европейский патент EP 413622.

Стратегии увеличения полупериода существования особенно полезны в случае нанотел, связывающих средств на основе фибронектина и других антител или белков, для которых требуется увеличенный полупериод существования *in vivo*.

Конъюгаты антител

Настоящее изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфично связываются с BMR6, рекомбинантно слитые или химически конъюгированные (включая ковалентное и нековалентное конъюгирование) с гетерологичным белком или полипептидом (или его антигенсвязывающим фрагментом, предпочтительно с полипептидом из по меньшей мере 10, по меньшей мере 20, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 60, по меньшей мере 70, по меньшей мере 80, по меньшей мере 90 или по меньшей мере 100 аминокислот) с получением слитых белков. В частности, изобретение относится к слитым белкам, включающим антигенсвязывающий фрагмент антитела, описанного в настоящем изобретении (например, Fab-фрагмент, Fd-

фрагмент, Fv-фрагмент, F(ab)₂-фрагмент, VH-домен, CDR VH, VL-домен или CDR VL), и гетерологичный белок, полипептид или пептид. Способы слияния или конъюгирования белков, полипептидов или пептидов с антителом или фрагментом антитела известны в уровне техники. См., например, патенты США 5336603, 5622929, 5359046, 5349053, 5447851, и 5112946; европейские патенты EP 307434 и EP 367166; публикации международных заявок WO 96/04388 и WO 91/06570; Ashkenazi et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 10535-10539; Zheng et al., 1995, J. Immunol. 154:5590-5600; и Vil et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:11337-11341.

Дополнительные слитые белки могут быть получены с помощью методов перетасовки генов, перетасовки мотивов, перетасовки экзонов и/или перетасовки кодонов (совокупно называемых "перетасовкой ДНК"). Перетасовка ДНК может использоваться для изменения активности антител и их антигенсвязывающих фрагментов согласно изобретению (например, антител и их антигенсвязывающих фрагментов с более высокой аффинностью и более низкой скоростью диссоциации). См., в общем, патенты США 5605793, 5811238, 5830721, 5834252 и 5837458; Patten et al., 1997, Curr. Opin. Biotechnol. 8:724-33; Narayana, 1998, Trends Biotechnol. 16(2):76-82; Hansson, et al., 1999, J. Mol. Biol. 287:265-76; и Lorenzo and Blasco, 1998, Biotechniques 24(2):308-313 (каждый из указанных патентов и публикаций настоящим полностью включен посредством отсылки). Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты или кодируемые антитела и их антигенсвязывающие фрагменты могут быть изменены посредством случайного мутагенеза в ПЦР пониженной точности, случайной вставки нуклеотидов или других методов перед рекомбинацией. Полинуклеотид, кодирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфично связываются с BMR6, могут быть рекомбинированы с одним или более компонентами, мотивами, секциями, частями, доменами, фрагментами и т.д. одной или более гетерологичных молекул.

Кроме того, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты могут быть слиты с маркерными последовательностями, такими как пептид для облегчения очистки. В одном варианте осуществления маркерная аминокислотная последовательность является гексагистидиновым пептидом (SEQ ID NO: 96), таким как метка, предоставленная в векторе pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, Calif., 91311), помимо прочих, многие из которых коммерчески доступны. Как описано в Gentz et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824, например, гексагистидин (SEQ ID NO: 96) обеспечивает удобную очистку слитого белка. Другие пептидные метки, применяемые для очистки, включают, без ограничения перечисленными, гемагглютининовую ("ГА") метку, которая соответствует эпитопу, полученному из белка гемагглютинина вируса гриппа (Wilson et al., 1984, Cell 37:767), и метку "flag".

В одном варианте осуществления антитела и их антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению конъюгированы с диагностическим или детектируемым средством. Такие антитела могут применяться для мониторинга или прогнозирования возникновения, развития, прогрессирования и/или тяжести заболевания или нарушения в качестве части клинической процедуры исследования, такой как определение эффективности конкретной терапии. Такой диагноз и детектирование могут быть выполнены при соединении антитела с детектируемыми веществам, включающими, без ограничения перечисленными, различные ферменты, такие как, без ограничения перечисленными, пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, бета-галактозидазу или ацетилхолинэстеразу; простетические группы, такие как, без ограничения перечисленными, стрептавидин/биотин и авидин/биотин; флуоресцентные материалы, такие как, без ограничения перечисленными, умбеллиферон, флуоресцеин, флуоресцеина изотиоцианат, родамин, дихлортриазиниламин флуоресцеин, дансилхлорид или фикоэритрин; люминесцентные материалы, такие как, без ограничения перечисленными, люминол; биолюминесцентные материалы, такие как, без ограничения перечисленными, люциферазу, люциферин и экворин; радиоактивные материалы, такие как, без ограничения перечисленными, иод (¹³¹I, ¹²⁵I, ¹²³I и ¹²¹I), углерод (¹⁴C), серу (³⁵S), тритий (³H), индий (¹¹⁵In, ¹¹³In, ¹¹²In и ¹¹¹In), технеций (⁹⁹Tc), таллий (²⁰¹Tl), галлий (⁶⁸Ga, ⁶⁷Ga), палладий (¹⁰³Pd), молибден (⁹⁹Mo), ксенон (¹³³Xe), фтор (¹⁸F), ¹⁵³Sm, ¹⁷⁷Lu, ¹⁵⁹Gd, ¹⁴⁹Pm, ¹⁴⁰La, ¹⁷⁵Yb, ¹⁶⁶Ho, ⁹⁰Y, ⁴⁷Sc, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁴²Pr, ¹⁰⁵Rh, ⁹⁷Ru, ⁶⁸Ge, ⁵⁷Co, ⁶⁵Zn, ⁸⁵Sr, ³²P, ¹⁵³Gd, ¹⁶⁹Yb, ⁵¹Cr, ⁵⁴Mn, ⁷⁵Se, ¹¹³Sn и ¹¹⁷Sn; и позитронно-активные металлы, используемые в различных типах позитронно-эмиссионной томографии, и нерадиоактивные парамагнитные ионы металлов.

Настоящее изобретение также охватывает применение антител и их антигенсвязывающих фрагментов, конъюгированных с терапевтической молекулой. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть конъюгированы с терапевтической молекулой, такой как цитотоксин, например, цитостатическое или разрушающее клетки средство, терапевтическое средство или ион радиоактивного металла, например, источники альфа-излучения. Цитотоксин или цитотоксическое средство включают любое вещество, которое разрушающе действует на клетки.

Кроме того, антитело, его антигенсвязывающий фрагмент могут быть конъюгированы с терапевтической молекулой или молекулой лекарственного средства, которая модифицирует данный биологический ответ. Терапевтические молекулы или молекулы лекарственного средства не следует расценивать, как ограниченные классическими химическими терапевтическими средствами. Например, молекула лекарственного средства может быть белком, пептидом или полипептидом, обладающим требуемой биологической активностью. Такие белки могут включать, например, токсин, такой как абрин, рицин А, экзотоксин *Pseudomonas*, токсин холеры или дифтерийный токсин; белок, такой как фактор некроза опухоли,

альфа-интерферон, бета-интерферон, фактор роста нервов, фактор роста тромбоцитов, тканевой активатор плазминогена, апоптотическое средство, антиангиогенное средство; или модификатор биологического ответа, такой как, например, лимфокин.

Кроме того, антитело может быть конъюгировано с терапевтическими молекулами, такими как ион радиоактивного металла, такие как источники альфа-излучения, такие как ^{213}Bi , или макроциклические хелатообразователи, применяемые для конъюгирования ионов радиометаллов, включающих, без ограничения перечисленными, ^{131}In , ^{131}Lu , ^{131}Y , ^{131}Ho , ^{131}Sm , с полипептидами. В одном варианте осуществления макроциклическим хелатообразователем является 1,4,7,10-тетраазаациклододекан-N,N',N'',N'''-тетрауксусная кислота (DOTA), которая может быть присоединена к антителу через линкерную молекулу. Такие линкерные молекулы общеизвестны в уровне техники и описаны в Denardo et al., 1998, Clin Cancer Res. 4(10):2483-90; Peterson et al., 1999, Bioconjug. Chem. 10(4):553-7; и Zimmerman et al., 1999, Nucl. Med. Biol. 26(8):943-50, полностью включенных посредством отсылки.

Способы конъюгирования терапевтических молекул с антителами известны, см., например, Amon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", в Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), стр. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", в Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), стр. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", в Monoclonal Antibodies 84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), стр. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", в Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), стр. 303-16 (Academic Press 1985) и Thorpe et al., 1982, Immunol. Rev. 62:119-58.

Антитела могут быть также прикреплены к твердым подложкам, которые особенно полезны для иммунологических анализов или очистки антигена-мишени. Такие твердые подложки включают, без ограничения перечисленным, стекло, целлюлозу, полиакриламид, нейлон, полистирол, поливинилхлорид или полипропилен.

Способы получения антител согласно изобретению

Нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела Изобретение относится к по существу очищенным молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют полипептиды, включающие сегменты или домены цепей BMP6-связывающих антител, описанных выше. Некоторые нуклеиновые кислоты согласно изобретению включают нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи, показанную в любом из SEQ ID NO: 16; 36; 56 или 76, и/или нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельную область легкой цепи, показанную в любом из SEQ ID NO: 26; 46; 66 или 86. В определенном варианте осуществления молекулы нуклеиновых кислот идентифицированы в табл. 1. Некоторые другие молекулы нуклеиновых кислот изобретения включают нуклеотидные последовательности, которые по существу идентичны (например, по меньшей мере на 65, 80%, 95% или 99%) нуклеотидным последовательностям, идентифицированным в табл. 1. В случае экспрессии с подходящих векторов экспрессии, полипептиды, кодируемые такими полинуклеотидами, способны демонстрировать BMP6 антигенсвязывающую способность.

Также изобретение относится к полинуклеотидам, которые кодируют по меньшей мере одну CDR-область и обычно все три CDR-области из тяжелой или легкой цепи BMP6-связывающего антитела, представленного в табл. 1. Некоторые другие полинуклеотиды кодируют всю или по существу всю последовательность вариабельной области тяжелой цепи и/или легкой цепи BMP6-связывающего антитела, представленного в табл. 1. Вследствие вырожденности генетического кода множество последовательностей нуклеиновых кислот кодируют каждую из аминокислотных иммуноглобулиновых последовательностей.

Молекулы нуклеиновых кислот согласно изобретению могут кодировать и вариабельную область, и константную область антитела. Некоторые последовательности нуклеиновых кислот согласно изобретению включают нуклеотиды, кодирующие зрелую последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая по существу идентична (например, по меньшей мере на 80%, 90% или 99%) зрелой последовательности вариабельной области тяжелой цепи, представленной в любом из SEQ ID NO: 16; 36; 56 или 76. Некоторые другие последовательности нуклеиновых кислот, включают нуклеотид, кодирующий зрелую последовательность вариабельной области легкой цепи, которая по существу идентична (например, по меньшей мере на 80%, 90% или 99%) зрелой последовательности вариабельной области легкой цепи, представленной в любом из SEQ ID NO: 26; 46; 66 или 86.

Полинуклеотидные последовательности могут быть получены с помощью твердофазного синтеза ДНК de novo или при ПЦР мутагенезе существующей последовательности (например, последовательности, описанной в примерах ниже), кодирующей BMP6-связывающее антитело или его связывающий фрагмент. Прямой химический синтез нуклеиновых кислот может быть выполнен с помощью способов, известных в уровне техники, таких как фосфотриэфиновый метод (Narang et al., 1979, Meth. Enzymol. 68:90); фосфодиэфирный метод (Brown et al., Meth. Enzymol. 68:109, 1979); диэтилфосфорамидитный метод (Beaucage et al., Tetra. Lett., 22:1859, 1981); и метод синтеза на твердой подложке из патента США 4458066. Введение мутаций в полинуклеотидные последовательности с помощью ПЦР может быть вы-

полнено, как описано, например, в PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, H.A. Erlich (Ed.), Freeman Press, NY, N.Y., 1992; PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis et al. (Ed.), Academic Press, San Diego, Calif., 1990; Mattila et al., Nucleic Acids Res. 19:967, 1991; и Eckert et al., PCR Methods and Applications 1:17, 1991.

Также изобретение относится к векторам экспрессии и клеткам-хозяевам для продукции BМР6-связывающих антител, описанных выше. Различные векторы экспрессии могут использоваться для экспрессии полинуклеотидов, кодирующих цепи или связывающие фрагменты BМР6-связывающих антител. Для продукции антител в клетке-хозяине на основе клетки млекопитающего, могут использоваться вирусные и невирусные векторы экспрессии. Невирусные векторы и системы включают плазмиды, эписомные векторы, как правило, с кассетой экспрессии для экспрессии белка или РНК, и человеческие искусственные хромосомы (см., например, Harrington et al., Nat Genet. 15:345, 1997). Например, невирусные векторы, которые могут быть использованы для экспрессии BМР6-связывающих полинуклеотидов и полипептидов в клетках млекопитающего (например, человека), включают рThioHis A, В и С, рсDNA3.1/His, рEBVHis A, В и С, (Invitrogen, San Diego, Calif.), векторы MPSV и многие другие векторы, известные в уровне техники для экспрессии других белков. Пригодные для использования вирусные векторы включают векторы на основе ретровирусов, аденовирусов, аденоассоциированных вирусов, вирусов герпеса, векторы на основе SV40, вируса папилломы, НВР вируса Эпштейна-Барр, векторы на основе вируса коровьей оспы и вируса леса Семлики (SFV). См., Brent et al., выше; Smith, Annu. Rev. Microbiol. 49:807, 1995; и Rosenfeld et al., Cell 68:143, 1992.

Выбор вектора экспрессии зависит от предполагаемых клеток-хозяев, в которых должен экспрессироваться вектор. Как правило, векторы экспрессии содержат промотор и другие регуляторные последовательности (например, энхансеры), которые функционально связаны с полинуклеотидами, кодирующими антигенсвязывающий фрагмент цепи BМР6-связывающего антитела. В одном варианте осуществления индуцируемый промотор используется для предотвращения экспрессии встроенных последовательностей за исключением индуцирующих условий. Индуцируемые промоторы включают, например, арабинозный, lacZ, металлотионеиновый промотор или промотор теплового шока. Культуры трансформированных организмов можно размножать при нестимулирующих условиях без изменения состава популяции в сторону кодирующих последовательностей, продукты экспрессии которых лучше переносят клетки-хозяева. В дополнение к промоторам другие регуляторные элементы также могут требоваться или могут быть нужны для эффективной экспрессии антигенсвязывающего фрагмента цепи BМР6-связывающего антитела. Такие элементы, как правило, включают иницирующий кодон ATG и смежный участок связывания рибосомы или другие последовательности. Кроме того, эффективность экспрессии может быть повышена при включении энхансеров, соответствующих используемой клеточной системе (см., например, Scharf et al., Results Probl. Cell Differ. 20:125, 1994; и Bittner et al., Meth. Enzymol., 153:516, 1987). Например, энхансер SV40 или энхансер CMV могут использоваться для повышения экспрессии в клетках-хозяевах, относящихся к клеткам млекопитающих.

Векторы экспрессии могут также обеспечивать положение сигнальной последовательности секреции для получения слитого белка с полипептидами, кодируемыми встроенными последовательностями BМР6-связывающего антитела. Обычно встроенные последовательности BМР6-связывающего антитела связаны с сигнальными последовательностями перед включением в вектор. Векторы, которые будут применяться для вставки последовательностей, кодирующих переменные домены легкой и тяжелой цепи BМР6-связывающего антитела, иногда также кодируют константные области или их части. Такие векторы обеспечивают экспрессию переменных областей в виде слитых белков с константными областями, что приводит к продукции интактных антител и их антигенсвязывающих фрагментов. Как правило, такие константные области являются человеческими.

Клетки-хозяева для введения и экспрессии цепей BМР6-связывающих антител могут быть прокариотическими или эукариотическими. *E.coli* является одним из прокариотических хозяев, пригодных для клонирования и экспрессии полинуклеотидов настоящего изобретения. Другие микроорганизмы-хозяева, подходящие для применения, включают бациллы, такие как *Bacillus subtilis*, и другие энтеробактерии, такие как *Salmonella*, *Serratia* и различные виды *Pseudomonas*. Для таких прокариотических хозяев также можно создать векторы экспрессии, которые, как правило, содержат последовательности регуляции экспрессии, совместимые с клеткой-хозяином (например, точку начала репликации). Кроме того, будет присутствовать любое количество различных известных промоторов, таких как лактозная промоторная система, триптофановая (*trp*) промоторная система, бета-лактамазная промоторная система или промоторная система из фага лямбда. Промоторы, как правило, регулируют экспрессию, необязательно с помощью последовательности оператора, и содержат последовательности участка связывания рибосомы и т.п. для иницирования и терминирования транскрипции и трансляции. Другие микроорганизмы, такие как дрожжи, также могут использоваться для экспрессии BМР6-связывающих полипептидов согласно изобретению. Также могут использоваться клетки насекомых в сочетании с бакуловирусными векторами.

В одном варианте осуществления клетки-хозяева, относящиеся к клеткам млекопитающих, используются для экспрессии и продукции BМР6-связывающих полипептидов настоящего изобретения. Например, они могут быть любой клеточной линией гибридомы, экспрессирующей эндогенные иммуног-

лобулиновые гены (например, клон миеломной гибридомы 1D6.C9, как описано в примерах), или линией клеток млекопитающих, несущих экзогенный вектор экспрессии (например, клеток миеломы SP2/0, представленных ниже). Они включают любую нормальную смертную или нормальную или аномальную бессмертную клетку животного или человека. Например, было разработано множество подходящих линий клеток-хозяев, способных секретировать интактные иммуноглобулины, включая клеточные линии СНО, различные клеточные линии Cos, клетки HeLa, линии миеломных клеток, трансформированные В-клетки и гибридомы. Применение культуры клеток ткани млекопитающего для экспрессии полипептидов обсуждается в общем, например, в Winnacker, FROM GENES TO CLONES, VCH Publishers, N.Y., N.Y., 1987. Векторы экспрессии для клеток-хозяев, относящихся к клеткам млекопитающих, могут включать последовательности регуляции экспрессии, такие как точку начала репликации, промотор и энхансер (см., например, Queen, et al., Immunol. Rev. 89:49-68, 1986), а также необходимые информационные участки процессинга, такие как участки связывания рибосомы, участки сплайсинга РНК, участки полиадезилации и последовательности терминации транскрипции. Эти векторы экспрессии обычно содержат промоторы, полученные из генов млекопитающих или из вирусов млекопитающих. Подходящие промоторы могут быть конститутивными, специфическими для типа клетки, стадия-специфическими и/или модулируемыми или регулируемыми. Подходящие промоторы включают, без ограничения перечисленными, металлотионеиновый промотор, конститутивный большой поздний промотор аденовируса, индуцируемый дексаметазоном промотор MMTV, промотор SV40, промотор MRP роIII, конститутивный промотор MPSV, индуцируемый тетрациклином промотор CMV (такой как человеческий предранний промотор CMV), конститутивный промотор CMV и комбинации промоторов-энхансеров, известные в уровне техники.

Способы введения векторов экспрессии, содержащих представляющие интерес полинуклеотидные последовательности, различаются в зависимости от типа клеточного хозяина. Например, трансфекцию с хлоридом кальция обычно используют для прокариотических клеток, тогда как обработку фосфатом кальция или электропорацию можно использовать для других клеточных хозяев (см. в общем Sambrook, et al., выше). Другие способы включают, например, электропорацию, обработку фосфатом кальция, опосредованную липосомами трансформацию, инъекцию и микроинъекцию, баллистические методы, вирусомы, иммунолипосомы, конъюгаты поликатиона:нуклеиновой кислоты, голую ДНК, искусственные вирионы, слияние со структурным белком VP22 вируса герпеса (Elliot and O'Hare, Cell 88:223, 1997), увеличенный специальными веществами захват ДНК и трансдукцию *ex vivo*. Для длительной продукции рекомбинантных белков с высоким выходом часто требуется стабильная экспрессия. Например, клеточные линии, которые стабильно экспрессируют цепи ВМР6-связывающего антитела или связывающие фрагменты, могут быть получены с применением векторов экспрессии согласно изобретению, которые содержат вирусные точки начала репликации или эндогенные элементы экспрессии и ген селективного маркера. После введения вектора клетки можно выращивать в течение 1-2 дней в обогащенных средах перед их переносом в селективные среды. Назначение селективного маркера состоит в том, чтобы придавать устойчивость к селекции, при этом его присутствие обеспечивает рост клеток, которые успешно экспрессируют введенные последовательности в селективных средах. Устойчивые, стабильно трансфицированные клетки можно размножать при использовании методик культивирования тканей, подходящих для определенного типа клеток.

Получение моноклональных антител согласно изобретению

Моноклональные антитела (мАт) могут быть получены множеством способов, включая стандартные методики получения моноклональных антител, например, стандартный метод гибридизации соматических клеток Колера и Милстейна (Kohler and Milstein, 1975 Nature 256:495). Для получения моноклонального антитела можно использовать множество методов, например, вирусную или онкогенную трансформацию В-лимфоцитов.

Системой, в которой для получения гибридом используют животных, является мышьяная система. Получение гибридом в мышья является хорошо отработанной методикой. Протоколы иммунизации и способы выделения иммунизированных спленоцитов для слияния известны в уровне техники. Участники слияния (например, мышьяные миеломные клетки) и методики слияния также известны.

Химерные или гуманизированные антитела и их антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению могут быть получены на основе последовательности мышьяного моноклонального антитела, полученного, как описано выше. ДНК, кодирующая тяжелую и легкую цепи иммуноглобулинов, может быть получена из представляющей интерес мышьяной гибридомы и генно-инженерно изменена с целью включения немышьяных (например, человеческих) иммуноглобулиновых последовательностей с применением стандартных методов молекулярной биологии. Например, для создания химерного антитела мышьяные вариабельные области могут быть связаны с человеческими константными областями при использовании методов, известных в уровне техники (см., например, патент США 4816567 (Cabilly et al.)). Для создания гуманизированного антитела мышьяные CDR-области могут быть встроены в человеческую каркасную последовательность при использовании методов, известных в уровне техники. См., например, патент США 5225539 (Winter) и патенты США 5530101; 5585089; 5693762 и 6180370 (Queen et al.).

В определенном варианте осуществления антитела согласно изобретению являются человеческими моноклональными антителами. Такие человеческие моноклональные антитела, направленные против ВМР6, могут быть получены при использовании трансгенных или трансхромосомных мышей, несущих части человеческой иммунной системы, а не мышинной системы. Такие трансгенные и трансхромосомные мыши включают мышей, указанных в настоящем описании как мыши HuMAb и мыши КМ, соответственно, и совокупно указанных в настоящем описании как "мыши с Ig человека".

Мышь HuMAb® (Medarex, Inc.) содержит минилокусы генов иммуноглобулинов человека, которые кодируют неперестроенные последовательности тяжелой (мю и гамма) и каппа легкой цепей иммуноглобулинов человека, и имеет направленные мутации, которые инактивируют эндогенные локусы мю и каппа цепей (см., например, Lonberg, et al., 1994 *Nature* 368 (6474): 856-859). Таким образом, мыши демонстрируют пониженную экспрессию мышинового IgM или К, и, в ответ на иммунизацию, введенные человеческие трансгены тяжелой и легкой цепи подвергаются переключению класса и соматической мутации с продукцией высокоаффинного моноклонального человеческого IgG каппа (Lonberg, N. et al., 1994, выше; обзор Lonberg, N., 1994 *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101; Lonberg, N. and Huszar, D., 1995 *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93, и Harding, F. and Lonberg, N., 1995 *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764:536-546). Получение и применение мышей HuMAb и геномные модификации, которые несут такие мыши, также описаны в Taylor, L. et al., 1992 *Nucleic Acids Research* 20:6287-6295; Chen, J. et al., 1993 *International Immunology* 5: 647-656; Tuaillon et al., 1993 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:3720-3724; Choi et al., 1993 *Nature Genetics* 4:117-123; Chen, J. et al., 1993 *EMBO J.* 12: 821-830; Tuaillon et al., 1994 *J. Immunol.* 152:2912-2920; Taylor, L. et al., 1994 *International Immunology* 579-591; и Fishwild, D. et al., 1996 *Nature Biotechnology* 14: 845-851, содержание которых настоящим прямо включены посредством отсылки. См. также патенты США 5545806; 5569825; 5625126; 5633425; 5789650; 5877397; 5661016; 5814318; 5874299; и 5770429 (Lonberg and Kay); патент США 5545807 (Surani et al.); публикации PCT WO 92/103918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/113852, WO 98/24884 и WO 99/45962 (Lonberg and Kay); и публикацию PCT WO 01/14424 (Korman et al.).

В другом варианте осуществления человеческие антитела согласно изобретению могут быть индуцированы с применением мыши, которая несет человеческие иммуноглобулиновые последовательности на трансгенах и трансхромосомах, такой как мышь, которая несет трансген человеческой тяжелой цепи и трансхромосому человеческой легкой цепи. Такие мыши, указанные в настоящем описании как "мыши КМ", подробно описаны в публикации PCT WO 02/43478 (Ishida et al.).

Кроме того, альтернативные системы на основе трансгенных животных, экспрессирующих человеческие иммуноглобулиновые гены, доступны в уровне техники и могут применяться для индукции ВМР6-связывающих антител и их антигенсвязывающих фрагментов согласно изобретению. Например, может использоваться альтернативная трансгенная система, называемая Xenomouse (Abgenix, Inc.). Такие мыши описаны, например, в патентах США 5939598; 6075181; 6114598; 6150584 и 6162963 (Kucheralapati et al.).

Кроме того, альтернативные системы на основе трансхромосомных животных, экспрессирующих человеческие иммуноглобулиновые гены, доступны в уровне техники и могут применяться для индукции ВМР6-связывающих антител согласно изобретению. Например, могут использоваться мыши, несущие трансхромосому человеческой тяжелой цепи и трансхромосому человеческой легкой цепи, называемые "мышью ТС"; такие мыши описаны в Tomizuka et al., 2000 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:722-727. Кроме того, в уровне техники были описаны коровы, несущие трансхромосомы человеческих тяжелой и легкой цепей (Kuroiwa et al., 2002 *Nature Biotechnology* 20:889-894), которые могут применяться для индукции ВМР6-связывающих антител согласно изобретению.

Человеческие моноклональные антитела согласно изобретению также могут быть получены при использовании методов фагового дисплея для скрининга библиотек человеческих иммуноглобулиновых генов. Такие методы фагового дисплея для выделения человеческих антител известны в уровне техники или описаны в примерах ниже. См., например: патенты США 5223409; 5403484; и 5571698 (Ladner et al.); патенты США 5427908 и 5580717 (Dower et al.); патенты США 5969108 и 6172197 (McCafferty et al.); и патенты США 5885793; 6521404; 6544731; 6555313; 6582915 и 6593081 (Griffiths et al.).

Человеческие моноклональные антитела согласно изобретению также могут быть получены при использовании мышей с ТКИД, у которых человеческие иммунциты были воссозданы таким образом, что при их иммунизации может быть получен человеческий гуморальный иммунный ответ. Такие мыши описаны, например, в патентах США 5476996 и 5698767 (Wilson et al.).

Инженерия каркасных или Fc-областей

Сконструированные антитела и их антигенсвязывающие фрагменты согласно изобретению включают антитела и антигенсвязывающие фрагменты, в которых модификации были сделаны в каркасных остатках в VH и/или VL, например, для улучшения свойств антитела. Как правило, такие модификации каркаса делают для уменьшения иммуногенности антитела. Например, один метод заключается в "обратной мутации" одного или более каркасных остатков до соответствующей последовательности зародышевой линии. Более конкретно, антитело, которое было подвергнуто соматической мутации, может содержать каркасные остатки, которые отличаются от последовательности зародышевой линии, из которой

происходит антители. Такие остатки могут быть определены при сравнении каркасных последовательностей антитела с последовательностями зародышевой линии, из которых происходит антитело. Для возврата последовательностей каркасной области к их конфигурации зародышевой линии, соматические мутации могут производить "обратную мутацию" с получением последовательности зародышевой линии, например, при помощи сайт-направленного мутагенеза. Предполагается, что такие "обратно мутированные" антитела также включены в изобретение.

Другой тип модификации каркасных областей включает мутацию одного или более остатков в каркасной области или даже в одной или более CDR-областях с целью удаления Т-клеточных эпитопов, что приводит к уменьшению потенциальной иммуногенности антитела. Данный подход также называется "деиммунизацией" и более подробно описан в патентной публикации США 20030153043 (Carr et al.).

В дополнение или в качестве альтернативы модификациям, сделанным в каркасных или CDR-областях, антитела изобретения могут быть подвергнуты генно-инженерным манипуляциям с целью включения модификаций в Fc-область, как правило, для изменения одного или более функциональных свойств антитела, таких как полупериод существования в сыворотке, реакция связывания комплемента, связывание с Fc-рецептором и/или антигензависимая клеточная цитотоксичность. Кроме того, антитело согласно изобретению может быть химически модифицировано (например, одна или более химических молекул могут быть присоединены к антителу) или модифицировано с изменением его гликозилирования, опять же для изменения одного или более функциональных свойств антитела. Каждый из этих вариантов осуществления более подробно описан ниже. Нумерация остатков в Fc-области соответствует нумерации по EU-индексу Кэбата.

В одном варианте осуществления шарнирная область СН1 изменена таким образом, что число остатков цистеина в шарнирной области изменено, например увеличено или уменьшено. Данный подход также описан в патенте США 5677425 (Bodmer et al.). Количество остатков цистеина в шарнирной области СН1 изменяют, например, для облегчения сборки легких и тяжелых цепей или для увеличения или уменьшения стабильности антитела.

В другом варианте осуществления шарнир Fc-области антитела подвергнут мутации для уменьшения биологического полупериода существования антитела. Более конкретно, одна или более аминокислотных мутаций введены в область интерфейса СН2-СН3 доменов Fc-шарнирного фрагмента, таким образом, что антитело имеет ухудшенное связывание со стафилококковым белком А (SpA) по сравнению со связыванием SpA нативного Fc-шарнирного домена. Данный подход более подробно описан в патенте США 6165745 (Ward et al.).

В другом варианте осуществления антитело модифицировано с целью увеличения его полупериода существования. Возможны различные подходы. Например, может быть введена одна или более следующих мутаций: T252L, T254S, T256F, как описано в патенте США 6277375 (Ward et al.). В альтернативе для увеличения биологического полупериода существования антитело может быть изменено в СН1 или СL области с включением эпитопа связывания с рецептором спасения, взятого из двух петель СН2 домена Fc-области IgG, как описано в патенте США 5869046 и 6121022 (Presta et al.).

В одном варианте осуществления Fc-область изменена путем замены по меньшей мере одного аминокислотного остатка другим аминокислотным остатком с целью изменения эффекторных функций антитела. Например, одна или более аминокислот могут быть заменены другим аминокислотным остатком таким образом, что антитело имеет измененную аффинность к эффекторному лиганду, но сохраняет антигенсвязывающую способность исходного антитела. Эффекторный лиганд, аффинность к которому изменяют, может быть, например, Fc-рецептором или компонентом C1 комплемента. Данный подход более подробно описан в патентах США 5624821 и 5648260 (Winter et al.).

В другом варианте осуществления одна или более аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков, могут быть заменены другим аминокислотным остатком таким образом, что антитело имеет измененное связывание с C1q и/или уменьшенную или устраненную комплементзависимую цитотоксичность (CDC). Данный подход более подробно описан в патенте США 6194551 (Idusogie et al.).

В другом варианте осуществления один или более аминокислотных остатков изменены, чтобы таким образом изменить способность антитела связывать комплемент. Данный подход описан также в публикации PCT WO 94/29351 (Bodmer et al.).

В еще одном варианте осуществления Fc-область изменена с целью увеличения способности антитела опосредовать антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) и/или повышения аффинности антитела к Fc-гамма рецептору путем модификации одной или более аминокислот. Данный подход описан также в публикации PCT WO 00/42072 (Presta). Кроме того, участки связывания Fc-гамма RI, Fc-гамма RII, Fc-гамма RIИ и FcRn на IgG1 человека были картированы, и были описаны варианты с улучшенным связыванием (см. Shields, R.L. et al., 2001 J. Biol. Chem. 276:6591-6604).

В другом варианте осуществления изменено гликозилирование антитела. Например, может быть создано агликозилированное антитело (т.е. антитело не имеет гликозилирования). Гликозилирование может быть изменено, например, с целью увеличения аффинности антитела к "антигену". Такие углеводные модификации могут быть получены, например, при изменении одного или более участков гликозилирования в последовательности антитела. Например, могут быть сделаны одна или более аминокислотных

замен, которые приводят к устранению одного или более участков гликозилирования каркаса варибельной области с устранением гликозилирования на данном участке. Такое агликозилирование может увеличивать аффинность антитела к антигену. Подобный подход более подробно описан в патентах США 5714350 и 6350861 (Co et al.).

Дополнительно или альтернативно может быть создано антитело, которое имеет измененный тип гликозилирования, такое как гипофукозилированное антитело с уменьшенным количеством фукозильных остатков или антитело с увеличенными разветвляющимися структурами GlcNAc. Было продемонстрировано, что такие измененные профили гликозилирования увеличивают ADCC способность антител. Такие углеводные модификации могут быть получены, например, при экспрессии антитела в клетке-хозяине с измененным аппаратом гликозилирования. Клетки с измененным аппаратом гликозилирования были описаны в уровне техники и могут применяться в качестве клеток-хозяев, в которых можно экспрессировать рекомбинантные антитела согласно изобретению, с получением в результате антитела с измененным гликозилированием. Например, в EP 1176195, за авторством Hang et al., описана клеточная линия с функционально прерванным геном FUT8, который кодирует фукозилтрансферазу, при этом антитела, экспрессируемые в такой клеточной линии, демонстрируют гипофукозилирование. В публикации PCT WO 03/035835, за авторством Presta, описана другая линия клеток CHO, клетки LecI3, с пониженной способностью присоединять фукозу к Asn (297)-связанным углеводам, что также приводит к гипофукозилированию антител, экспрессируемых в такой клетке-хозяине (см. также Shields, R.L. et al., 2002 J. Biol. Chem. 277:26733-26740). В публикации PCT WO 99/54342 (Umana et al.) описаны клеточные линии, сконструированные для экспрессии гликопротеин-модифицирующих гликозилтрансфераз (например, бета (1,4)-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III (GnTIII)), в результате чего антитела, экспрессируемые сконструированными клеточными линиями, демонстрируют увеличенные разветвляющиеся структуры GlcNAc, что приводит к увеличенной ADCC активности антител (см. также Umana et al., 1999 Nat. Biotech. 17:176-180).

Способы конструирования измененных антител

Как обсуждалось выше, BMP6-связывающие антитела, имеющие последовательности VH и VL или полноразмерные последовательности тяжелой и легкой цепи, показанные в настоящем описании, могут применяться для создания новых BMP6-связывающих антител путем модификации полноразмерных последовательностей тяжелой цепи и/или легкой цепи, последовательностей VH и/или VL или константной области(ей), присоединенных к ним. Таким образом, в другом аспекте изобретения структурные признаки BMP6-связывающего антитела согласно изобретению применяются для создания структурно родственных BMP6-связывающих антител, которые сохраняют по меньшей мере одно функциональное свойство антител и их антигенсвязывающих фрагментов согласно изобретению, такое как связывание с человеческим BMP6, а также ингибирование одного или более функциональных свойств BMP6 (например, ингибирование лизиса эритроцитов в гемолитическом тесте).

Например, одна или более CDR-областей антител и их антигенсвязывающих фрагментов настоящего изобретения или их мутации, могут быть комбинированы рекомбинантно с известными каркасными областями и/или другими CDR-областями с получением дополнительных, рекомбинантно сконструированных BMP6-связывающих антител и их антигенсвязывающих фрагментов согласно изобретению, как обсуждается выше. Другие типы модификаций включают модификации, описанные в предыдущем разделе. Исходным материалом для способа конструирования является одна или более последовательностей VH и/или VL, представленных в настоящем описании, или одна или более их CDR-областей. Для создания сконструированного антитела не нужно фактически получать (т.е. экспрессировать в виде белка) антитело, имеющее одну или более последовательностей VH и/или VL, представленных в настоящем описании, или одну или более их CDR-областей. Скорее информация, содержащаяся в последовательности(ях), используется в качестве исходного материала для создания последовательности(ей) "второго поколения", полученной из исходной последовательности(ей), и затем последовательность(и) "второго поколения" получают и экспрессируют в виде белка.

Измененная последовательность антитела также может быть получена при скрининге библиотек антител, имеющих фиксированные последовательности CDR3 или минимальные существенные связывающие детерминанты, как описано в US20050255552, и различные последовательности CDR1 и CDR2. Скрининг может быть выполнен согласно любой технологии скрининга, подходящей для скрининга антител в библиотеках антител, такой как технология фагового дисплея.

Стандартные методы молекулярной биологии могут использоваться для получения и экспрессии измененной последовательности антитела. Антитело, кодируемое измененной последовательностью(ями) антитела, является антителом, которое сохраняет одно, некоторые или все функциональные свойства BMP6-связывающих антител, описанных в настоящем изобретении, где функциональные свойства включают, без ограничения перечисленным, специфичное связывание с человеческим белком BMP6; при этом антитело ингибирует лизис эритроцитов в гемолитическом тесте.

Функциональные свойства измененных антител могут быть исследованы при использовании стандартных анализов, доступных в уровне техники и/или описанных в настоящем изобретении, таких как анализы, представленные в примерах (например, анализы ELISA).

В одном варианте осуществления способов конструирования антител и их антигенсвязывающих фрагментов согласно изобретению мутации могут быть введены случайно или селективно по всей или части кодирующей последовательности ВМР6-связывающих антител, при этом полученные модифицированные ВМР6-связывающие антитела можно подвергнуть скринингу на связывающую активность и/или другие функциональные свойства, как описано в настоящем изобретении. Мутационные методы были описаны в уровне техники. Например, в публикации РСТ WO 02/092780 за авторством Short описаны способы создания и скрининга мутаций антител с применением насыщающего мутагенеза, сборки лигируемых синтетических фрагментов или их комбинации. В альтернативе в публикации РСТ WO 03/074679 (Lazar et al.) описаны способы применения компьютерных методов скрининга с целью оптимизации физикохимических свойств антител.

Анализ антител согласно изобретению

Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты согласно изобретению могут быть исследованы с помощью различных функциональных анализов. Например, их можно исследовать на способность ингибировать ВМР6.

Способность антитела связываться с ВМР6 может быть обнаружена путем непосредственного мечення представляющего интерес антитела, или антитело может не быть меченым, при этом связывание обнаруживают опосредованно с использованием различных форматов сэндвич-анализа, известных в уровне техники.

В одном варианте осуществления ВМР6-связывающие антитела и их антигенсвязывающие фрагменты согласно изобретению блокируют связывание референсного ВМР6-связывающего антитела с полипептидом ВМР6 или конкурируют с ним. Они могут быть полностью человеческими ВМР6-связывающими антителами, описанными выше. Они также могут быть другими мышинными, химерными или гуманизированными ВМР6-связывающими антителами, которые связываются с тем же эпитопом, что и референсное антитело. Возможность блокировать связывание референсного антитела или конкурировать с ним указывает, что ВМР6-связывающее антитело при анализе связывается с тем же или подобным эпитопом, что и определенное референсное антитело, или с эпитопом, который расположен достаточно близко к эпитопу, связываемому референсным ВМР6-связывающим антителом. Такие антитела с особенной вероятностью будут обладать общими выгодными свойствами, определенными у референсного антитела. Возможность блокировать или конкурировать с референсным антителом может быть определена, например, с помощью анализа конкурентного связывания. С помощью анализа конкурентного связывания тестируемое антитело исследуют на способность ингибировать специфическое связывание референсного антитела с общим антигеном, таким как полипептид ВМР6. Тестируемое антитело конкурирует с референсным антителом за специфическое связывание с антигеном, если избыток тестируемого антитела существенно ингибирует связывание референсного антитела. Существенное ингибирование означает, что тестируемое антитело уменьшает специфическое связывание референсного антитела обычно по меньшей мере на 10, 25, 50, 75 или 90%.

Существует ряд известных анализов конкурентного связывания, которые могут использоваться для оценки конкуренции антитела с референсным антителом за связывание с конкретным белком, в данном случае с ВМР6. Они включают, например, твердофазный прямой или непрямой радиоиммуноанализ (РИА), твердофазный прямой или непрямой иммуноферментный анализ (ИФА), конкурентный сэндвич-анализ (см. Stahl et al., *Methods in Enzymology* 9:242-253, 1983); твердофазный прямой биотин-авидин ИФА (см. Kirkland et al., *J. Immunol.* 137:3614-3619, 1986); твердофазный прямой анализ с использованием метки, твердофазный прямой сэндвич-анализ с использованием метки (см. Harlow & Lane, выше); твердофазный прямой РИА с использованием ^{125}I в качестве метки (см. Morel et al., *Molec. Immunol.* 25:7-15, 1988); твердофазный прямой авидин-биотин ИФА (Cheung et al., *Virology* 176:546-552, 1990); и прямой РИА с использованием метки (Moldenhauer et al., *Scand. J. Immunol.* 32:77-82, 1990). Как правило, такой анализ включает использование очищенного антигена, связанного с твердой поверхностью, или клеток, несущих любой из них, немеченое тестируемое ВМР6-связывающее антитело и меченое референсное антитело. Конкурентное ингибирование измеряют путем определения количества метки, связавшейся с твердой поверхностью или клетками в присутствии тестируемого антитела. Обычно тестируемое антитело присутствует в избытке. Антитела, идентифицированные с помощью конкурентного анализа (конкурирующие антитела), включают связывание антител с тем же эпитопом, с каким связывается референсное антитело, и связывание антител со смежным эпитопом, достаточно близко расположенным к эпитопу, связываемому референсным антителом, чтобы происходило стерическое затруднение.

Для определения, связываются ли выбранные ВМР6-связывающие моноклональные антитела с уникальными эпитопами, каждое антитело может быть биотинилировано при использовании коммерчески доступных реактивов (например, реактивов Pierce, Rockford, III.). Исследования конкуренции с применением немеченых моноклональных антител и биотинилированных моноклональных антител могут быть выполнены при использовании планшетов для ELISA, покрытых полипептидом ВМР6. Связывание биотинилированного мАт может быть обнаружено с помощью теста с использованием конъюгата стрептококкового авидина и щелочной фосфатазы. Для определения изотипа очищенного ВМР6-

связывающего антитела могут быть выполнены изотип-специфические ELISA. Например, лунки микротитровального планшета могут быть покрыты 1 мкг/мл IgG против антител человека в течение ночи при 4°C. После блокирования 1% BSA планшеты реагируют с 1 мкг/мл или меньше моноклонального BMP6-связывающего антитела или очищенных изотипических контролей при окружающей температуре в течение одного - двух часов. Затем лунки могут реагировать с конъюгированными со щелочной фосфатазой зондами, специфичными либо к IgG1 человека, либо к IgM человека. Затем планшеты проявляют и анализируют так, чтобы можно было определить изотип очищенного антитела.

Чтобы продемонстрировать связывание моноклональных BMP6-связывающих антител с живыми клетками, экспрессирующими полипептид BMP6, может использоваться проточная цитометрия. Коротко, линии клеток, экспрессирующие BMP6 (выращенные при стандартных условиях роста), могут смешивать с различными концентрациями BMP6-связывающего антитела в PBS, содержащем 0,1% BSA и 10% фетальной телячьей сыворотки, и инкубировать при 37°C в течение 1 часа. После промывки клетки реагируют с флуоресцеин-меченным IgG антителом против антител человека при тех же условиях, что и при окрашивании первичного антитела. Образцы могут быть проанализированы на цитометре FACSscan при использовании параметров прямого и бокового светорассеяния для сортировки одиночных клеток. Может использоваться альтернативный анализ с использованием флуоресцентной микроскопии (в дополнение или вместо проточного цитометрического анализа). Клетки могут быть окрашены точно так же, как описано выше, и исследованы с помощью флуоресцентной микроскопии. Данный метод позволяет выполнять визуализацию отдельных клеток, но может обладать пониженной чувствительностью в зависимости от плотности антигена.

BMP6-связывающие антитела и их антигенсвязывающие фрагменты согласно изобретению могут быть также протестированы на реактивность с полипептидом или антигенным фрагментом BMP6 с помощью Вестерн-блоттинга. Коротко, очищенные полипептиды BMP6 или слитые белки, или клеточные экстракты из клеток, экспрессирующих BMP6, могут быть получены и подвергнуты электрофорезу в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия. После электрофореза разделенные антигены переносят на нитроцеллюлозные мембраны, блокированные 10% фетальной телячьей сывороткой, и обрабатывают тестируемыми моноклональными антителами. Связывание человеческого IgG может быть обнаружено при использовании конъюгата антитела против IgG человека со щелочной фосфатазой и проявлено таблетками субстрата BCIP/NBT (Sigma Chem. Co., St. Louis, Mo.).

Примеры функциональных анализов также описаны в разделе примеры, ниже.

Профилактические и терапевтические применения

Настоящее изобретение относится к способам лечения заболевания или нарушения, связанного с увеличенной активностью BMP6, посредством введения пациенту эффективного количества антител и их антигенсвязывающих фрагментов согласно изобретению. В частном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения анемии посредством введения пациенту эффективного количества антител и их антигенсвязывающих фрагментов согласно изобретению.

Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты согласно изобретению могут использоваться, помимо прочего, для предотвращения прогрессирования анемии. Они также могут использоваться в комбинации с другими способами лечения для лечения больных анемией.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способам лечения связанного с BMP6 заболевания или нарушения посредством введения пациенту эффективного количества антител и их антигенсвязывающих фрагментов согласно изобретению. Примеры известных связанных с BMP6 заболеваний или нарушений включают: анемию, в том числе, в качестве неограничивающих примеров: анемию при хроническом заболевании (АХЗ), анемию при (например, связанную с) хронической болезни почек (ХБП), анемию при раке, анемию при воспалении, резистентную к эритропоэз-стимулирующим препаратам (ЭСП) анемию (например, эритропоэтин (ЕРО) резистентную анемию, ЭСП-гипореактивную анемию (например, ЕРО-гипореактивную анемию), функциональную железодефицитную анемию и/или железодефицитную анемию.

В частном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способам лечения связанного с BMP6 заболевания или нарушения посредством введения пациенту эффективного количества антител и их антигенсвязывающих фрагментов согласно изобретению, где указанным заболеванием или нарушением является анемия. В варианте осуществления анемия является анемией при хроническом заболевании. В варианте осуществления хроническим заболеванием является хроническая болезнь почек. В варианте осуществления хроническим заболеванием является рак. В варианте осуществления хроническим заболеванием является воспаление. В варианте осуществления анемией (например, анемией при хроническом заболевании) является ЭСП (например, ЕРО) резистентная анемия. В варианте осуществления анемией (например, анемией при хроническом заболевании) является ЭСП (например, ЕРО) гипореактивная анемия. В варианте осуществления анемией (например, анемией при хроническом заболевании) является железодефицитная анемия. В вариантах осуществления, в том числе в любом из вышеуказанных вариантах осуществления, пациент является пациентом на хроническом гемодиализе (HD). В вариантах осуществления, в том числе в любом из вышеуказанных вариантов осуществления, пациент имеет заболевание почек, например, терминальную стадию почечной недостаточности.

вании) является ЭСП (например, ЕРО) гипореактивная анемия. В варианте осуществления анемия (например, анемия при хроническом заболевании) является железодефицитной анемией. В вариантах осуществления, в том числе в любом из вышеуказанных вариантов осуществления, пациент является пациентом на хроническом гемодиализе (HD). В вариантах осуществления, в том числе в любом из вышеуказанных вариантов осуществления, пациент имеет заболевание почек, например, терминальную стадию почечной недостаточности.

В варианте осуществления настоящее изобретение относится к способам мобилизации секвестированного железа посредством введения пациенту эффективного количества антител и их антигенсвязывающих фрагментов согласно изобретению.

В варианте осуществления настоящее изобретение относится к способам мобилизации секвестированного железа посредством введения пациенту эффективного количества композиции, включающей антитело согласно настоящему изобретению.

В варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу улучшения (например, повышения) уровня гемоглобина у пациента с анемией, при одновременном уменьшении потребности во введении доз эритропоэтина и/или препарата железа (например, в/в препарата железа), включающему введение пациенту антитела или его антигенсвязывающего фрагмента согласно изобретению. В варианте осуществления анемия является анемией, связанной с хроническим заболеванием. В варианте осуществления улучшение уровня гемоглобина включает улучшение уровня до уровня, установленного в руководстве по клинической практике, например, Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Anemia Work Group. KDIGO Clinical Practice Guideline for Anemia in Chronic Kidney Disease. Kidney inter., Suppl. 2012; 2: 279-335, содержание которого настоящим полностью включено посредством отсылки. В варианте осуществления улучшение уровня гемоглобина включает улучшение уровня гемоглобина по меньшей мере до приблизительно 11,0 г/дл, например, до уровня от приблизительно 11,0 до приблизительно 12,5 г/дл. В варианте осуществления улучшение уровня гемоглобина включает улучшение уровня гемоглобина по меньшей мере до 11,0 г/дл, например, до уровня от 11,0 до 12,5 г/дл.

В варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу улучшения (например, повышения) уровня гемоглобина у пациента с анемией, при одновременном снижении потребности во введении доз эритропоэтина и/или препарата железа (например, в/в препарата железа), включающему введение пациенту композиции, включающей антитело согласно изобретению. В варианте осуществления анемия является анемией, связанной с хроническим заболеванием. В варианте осуществления улучшение уровня гемоглобина включает улучшение уровня до уровня, установленного в руководстве по клинической практике, например, Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Anemia Work Group. KDIGO Clinical Practice Guideline for Anemia in Chronic Kidney Disease. Kidney inter., Suppl. 2012; 2:279-335, содержание которого настоящим полностью включено посредством отсылки. В варианте осуществления улучшение уровня гемоглобина включает улучшение уровня гемоглобина по меньшей мере до приблизительно 11,0 г/дл, например, до уровня приблизительно от 11,0 до приблизительно 12,5 г/дл. В варианте осуществления улучшение уровня гемоглобина включает улучшение уровня гемоглобина по меньшей мере до 11,0 г/дл, например, до уровня от 11,0 до 12,5 г/дл.

В варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу поддержания уровня гемоглобина у пациента с анемией посредством снижения потребности во введении доз эритропоэтина и/или препарата железа (например, в/в препарата железа), включающему введение пациенту антитела или его антигенсвязывающего фрагмента согласно изобретению. В варианте осуществления анемия является анемией, связанной с хроническим заболеванием. В варианте осуществления улучшение уровня гемоглобина включает улучшение уровня до уровня, установленного в руководстве по клинической практике, например, Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Anemia Work Group. KDIGO Clinical Practice Guideline for Anemia in Chronic Kidney Disease. Kidney inter., Suppl. 2012; 2:279-335, содержание которого настоящим полностью включено посредством отсылки. В варианте осуществления улучшение уровня гемоглобина включает улучшение уровня гемоглобина по меньшей мере до приблизительно 11,0 г/дл, например, до уровня приблизительно от 11,0 до приблизительно 12,5 г/дл. В варианте осуществления улучшение уровня гемоглобина включает улучшение уровня гемоглобина по меньшей мере до 11,0 г/дл, например, до уровня от 11,0 до 12,5 г/дл.

В варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу поддержания уровня гемоглобина у пациента с анемией посредством снижения потребности во введении доз эритропоэтина и/или препарата железа (например, в/в препарата железа), включающему введение пациенту композиции, включающей антитело согласно изобретению. В варианте осуществления анемия является анемией, связанной с хроническим заболеванием. В варианте осуществления улучшение уровня гемоглобина включает улучшение уровня до уровня, установленного в руководстве по клинической практике, например, Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Anemia Work Group. KDIGO Clinical Practice Guideline for Anemia in Chronic Kidney Disease. Kidney inter., Suppl. 2012; 2:279-335, содержание которого настоящим полностью включено посредством отсылки. В варианте осуществления улучшение уровня гемоглобина включает улучшение уровня гемоглобина по меньшей мере до приблизительно 11,0 г/дл, например, до уровня приблизительно от 11,0 до приблизительно 12,5 г/дл. В варианте осуществления улучшение

уровня гемоглобина включает улучшение уровня гемоглобина по меньшей мере до 11,0 г/дл, например до уровня от 11,0 до 12,5 г/дл.

В одном варианте осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в табл. 1, могут быть введены пациенту в сочетании с терапевтическим способом или процедурой, такими как описанные в настоящем изобретении или известные в уровне техники. Такой способ или процедура включают, в качестве неограничивающих примеров: введение терапевтически эффективного количества ЭСП (например, ЕРО), эритропоэтина или препарата железа и переливание крови. Лечение, как правило, продолжается с перерывами в течение недели, месяца, трех месяцев, шести месяцев или года. У некоторых больных лечение назначают в течение оставшейся жизни пациента.

В случае введения терапевтических средств настоящего изобретения вместе с другим средством, эти два средства можно вводить последовательно в любом порядке или одновременно. В некоторых аспектах антитело согласно настоящему изобретению вводят пациенту, который также получает терапию вторым средством или способом (например, ЭСП, эритропоэтин, препарат железа, переливание крови). В других аспектах связывающую молекулу вводят в сочетании с оперативным лечением.

Подходящие средства для комбинированного лечения ВМР6-связывающими антителами включают средства, известные в уровне техники, которые ингибируют или уменьшают экспрессию, уровень, стабильность и/или активность ВМР6. Такие средства включают антитела, миРНК и малые молекулы к ВМР6.

Различные антитела к ВМР6 известны в уровне техники, включая, помимо прочего, описанные в:

Andriopoulos et al. 2009 Nat. Genet. 41: 482-487;
 Arndt et al. 2010 Gastroent. 138: 372-382;
 Bames et al. 1995 World J. Urol. 13: 337-343;
 Camaschella et al. 2009 Nat. Genet. 41: 386-388;
 Celement et al. 1999 Int. J. Cancer 80: 250-256;
 Corradini et al. 2011 Hepatol. 54: 273-284;
 Crews et al. 2010 J. Neuro. 30: 12252-12262;
 Dai et al. 2005 Cancer Res. 65: 8274;
 Darby et al. 2007 J. Pathol. 214: 394-404;
 Hadziahmetovic et al. 2011 179: 335-348;
 Hamdy et al. 1997 Cancer Res. 57: 4427;
 Haudenschild et al. 2004 Cancer Res. 64: 8276;
 Hee et al. 2008 J. Orth. Res. 27: 162-168;
 Herrera et al. 2009 BMC Cell Biol. 10: 20;
 Inagaki et al. 2005 Endocrin. 147: 2681-2689;
 Jung et al. 2008 Stem Cells 26: 2042-2051;
 Kaiser et al. 1998 J. Invest. Derm. 111: 1145-1152;
 Kautz et al. 2011 Haematol. 96: 199-203;
 Khalaf et al. 2012 Eur. J. Endocrin. 168: 437-444;
 Kochanowska et al. 2002 Exp. Biol. Med. 227: 57-62;
 Li et al. 2006 Int. J. Med. Sci. 3: 97-105;
 Meynard et al. 2011 Blood 118: 747-756;
 Pederson et al. 2008 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105: 20764-69;
 Plant et al. 2002 J. Bone Min. Res. 17: 782-790;
 Schluesener et al. 1994 Atheroscl. 113: 153-156;
 Schluesener et al. 2004 GLIA 12: 161-164;
 Shi et al. 2009 Fert. Steril. 92: 1794-1798;
 Varley et al. 1996 Exp. Neur. 140: 84-94;
 Wang et al. 2007 Mol. Cell. Neurosci. 34: 653-661;
 Zhang et al. 2006 Neurosci. 138: 47-53;
 Патенте США 8,795,665; и
 WO 2010/056981;

Дополнительные антитела к ВМР6 известны в уровне техники; многие коммерчески доступны.

Различные миРНК к ВМР6 известны в уровне техники, включая, среди прочего, описанные в:

He et al. 2003 Cell. Signal. 25: 1372-1378;
 Ikeda et al. 2012 PLoS 0040465;
 Kautz et al. 2008 Blood 112: 1503;
 Mi et al. 2011 J. Cancer Res. Clin. Oncol. 137:245;
 Xia et al. 2007 J. Biol. Chem. 282: 18129-18140;
 Xia et al. 2008 Blood 111: 5195; и
 Yang et al. 2009 Int. J. Bioch. Cell Biol. 41: 853-861.

Известны дополнительные ингибиторы BMP6. Любой из них может применяться в комбинации с любым антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, раскрытыми в настоящем изобретении.

Режим комбинированной терапии может быть аддитивным, или он может приводить к синергическим результатам (например, к большему снижению активности BMP6, чем ожидается при комбинированном применении двух средств). В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к комбинированной терапии для профилактики и/или лечения анемии или другого связанного с BMP6 заболевания, как описано выше, с использованием BMP6-связывающего антитела согласно изобретению и противоанемического средства или способа, такого как ЭСП, эритропоэтин, железо или переливание крови.

Диагностические применения

В одном аспекте изобретение охватывает диагностические анализы для определения BMP6 и/или экспрессии нуклеиновой кислоты, а также функции BMP6, в отношении биологического образца (например, крови, сыворотки, клеток, ткани) либо от лица, страдающего заболеванием или нарушением, либо подвергающегося риску развития нарушения, связанного с анемией.

Диагностические анализы, такие как конкурентные анализы, основаны на способности меченого аналога ("радиоизотопного индикатора") конкурировать с аналитом в тестируемом образце за ограниченное количество связывающих участков на общем партнере связывания. Партнер связывания обычно переводят в нерастворимую форму до или после конкуренции, после чего радиоизотопный индикатор и аналит, связанные с партнером связывания, отделяют от несвязавшегося радиоизотопного индикатора и аналита. Это разделение выполняют посредством слива (где партнер связывания был предварительно переведен в нерастворимую форму) или центрифугирования (где партнер связывания был осажден после конкурентной реакции). Количество аналита в тестируемом образце обратно пропорционально количеству связавшегося радиоактивного индикатора, согласно измерению количества маркерного вещества. Кривые зависимости дозы-эффекта с известными количествами аналита строят и сравнивают с результатами тестов для количественного определения количества аналита, присутствующего в тестируемом образце. Эти анализы называют системами ELISA, когда ферменты используют в качестве детектируемых маркеров. В анализе данного формата конкурентное связывание между антителами и BMP6-связывающими антителами приводит к связыванию BMP6, предпочтительно эпитопов BMP6 согласно изобретению, что соответствует показателю антител в образце сыворотки, более конкретно, нейтрализующих антител в образце сыворотки.

Значительным преимуществом данного анализа является то, что производят непосредственное измерение нейтрализующих антител (т.е. антител, которые препятствуют связыванию BMP6, в частности, его эпитопов). Такой анализ, особенно в форме теста ELISA, находит значимые применения в клинических условиях и в стандартном исследовании крови.

При клинической диагностике или мониторинге больных с нарушениями, связанными с анемией, обнаружение белков BMP6 в сравнении с уровнями в соответствующем биологическом образце здорового пациента указывает пациента с нарушениями, связанными с анемией.

In vivo диагностика или визуализация описана в US2006/0067935. Коротко, указанные способы обычно включают назначение или введение пациенту диагностически эффективного количества BMP6-связывающей молекулы, которая функционально присоединена к маркеру или метке, которые можно детектировать неинвазивными методами. Конъюгату антитела-маркера дают достаточное время для локализации и связывания с BMP6. Затем пациента обследуют с помощью детектирующего устройства с целью определения детектируемого маркера, в результате чего формируется изображение локализации BMP6-связывающих молекул в ткани пациента. Присутствие BMP6-связывающего антитела или его антигенсвязывающего фрагмента обнаруживают в результате определения, связывается ли антитело-маркер с компонентом ткани. Обнаружение повышенного уровня белков BMP6 или комбинации белка по сравнению со здоровым человеком без анемии указывает на предрасположенность к возникновению и/или на возникновение нарушений, связанных с анемией. Данные аспекты изобретения также предназначены для применения в способах визуализации ткани и комбинированных диагностических и терапевтических способах.

Изобретение также относится к области прогностической медицины, в которой диагностические анализы, прогностические анализы, фармакогеномные исследования и мониторинговые клинические исследования используют в прогностических целях (для прогноза), чтобы таким образом проводить профилактическое лечение индивида.

Изобретение также относится к прогностическим (или прогнозирующим) анализам для определения, подвергается ли индивид риску развития нарушения, связанного с дисрегуляцией активности пути BMP6. Например, мутации в гене BMP6 можно анализировать в биологическом образце. Такие анализы могут применяться в прогностических целях, чтобы в результате профилактически лечить индивида до возникновения нарушения, характеризуемого или связанного с BMP6, экспрессией нуклеиновой кислоты или активностью.

В другом аспекте изобретение относится к способам определения экспрессии нуклеиновой кислоты BMP6 или активности BMP6 у индивида, чтобы, таким образом, подобрать подходящие терапевтические

или профилактические средства для индивида (указаны в настоящем описании как "фармакогеномные исследования"). Фармакогеномика позволяет выполнить подбор средств (например, лекарственных препаратов) для терапевтического или профилактического лечения индивида на основе генотипа индивида (например, генотипа индивида, исследуемого с целью определения способности индивида отвечать на конкретное средство).

В еще одном аспекте изобретение относится к способу мониторинга действия средств (например, лекарственных препаратов) на экспрессию или активность ВМР6 в клинических исследованиях.

Фармацевтические композиции

Изобретение относится к фармацевтическим композициям, включающим ВМР6-связывающее анти-тело или его связывающий фрагмент вместе с фармацевтически приемлемым носителем. Композиции могут дополнительно содержать одно или более других терапевтических средств, которые подходят для лечения или предотвращения ВМР6-ассоциированного заболевания (например, анемии). Фармацевтические носители улучшают или стабилизируют композицию, или облегчают изготовление композиции. Фармацевтически приемлемые носители включают растворители, дисперсионные среды, покрытия, противобактериальные и противогрибковые средства, изотонические вещества и вещества, задерживающие абсорбцию, и подобные вещества, которые являются физиологически совместимыми.

Фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может быть введена множеством способов, известных в уровне техники. Путь введения и/или способ введения изменяются в зависимости от требуемых результатов. Введение может быть внутривенным, внутримышечным, внутрибрюшинным или подкожным, или введение производят поблизости к целевому участку.

Фармацевтически приемлемый носитель должен подходить для внутривенного, внутримышечного, подкожного, парентерального, спинального или эпидермального введения (например, путем инъекции или инфузии). В зависимости от пути введения, действующее вещество, т.е. антитело, биспецифическая и мультиспецифическая молекула, может быть покрыто материалом для защиты соединения от воздействия кислот и других внешних факторов, которые могут инактивировать соединение.

Композиция должна быть стерильной и текучей. Нужную текучесть можно поддерживать, например, при помощи покрытия, такого как лецитин, посредством поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсии и при помощи поверхностно-активных веществ. Во многих случаях предпочтительно включать в композицию изотонические вещества, например, сахара, многоатомные спирты, такие как маннит или сорбит, и хлорид натрия. Длительную абсорбцию композиций для инъекций можно обеспечить при включении в композицию вещества, которое задерживает абсорбцию, например, моно-стеарат алюминия или желатин.

Фармацевтические композиции согласно изобретению могут быть изготовлены в соответствии с известными и стандартно применяемыми в данной области техники способами. См., например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Mack Publishing Co., 20th ed., 2000; и Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978. Фармацевтические композиции предпочтительно производят в соответствии с условиями GMP. Как правило, в фармацевтических композициях изобретения применяется терапевтически эффективная доза или эффективная доза ВМР6-связывающего антитела. ВМР6-связывающие антитела включают в фармацевтически приемлемые лекарственные формы стандартными способами, известными специалистам в данной области. Схемы введения доз корректируют, чтобы обеспечить оптимальный требуемый ответ (например, терапевтический ответ). Например, может быть введена разовая доза, несколько разделенных доз могут быть введены в течение некоторого времени, или доза может быть пропорционально уменьшена или увеличена в соответствии с острой необходимостью терапевтической ситуации. Наиболее предпочтительно изготавливать парентеральные композиции в форме единичных доз для простоты введения и однородности дозирования. Лекарственная форма с единичной дозой, при использовании в настоящем описании, относится к физически дискретным единицам, которым подходят для применения в качестве однократных доз для проходящих лечение пациентов; каждая единица содержит заданное количество действующего вещества, вычисленное для получения требуемого терапевтического действия, в сочетании с необходимым фармацевтическим носителем.

Фактические уровни дозы действующих веществ в фармацевтических композициях настоящего изобретения могут изменяться для получения количества действующего вещества, которое является эффективным для достижения требуемого терапевтического ответа у конкретного пациента, состава и способа введения, не являющихся токсичными для пациента. Подобранный уровень дозы зависит от множества фармакокинетических факторов, включающих активность конкретных применяемых композиций настоящего изобретения, или соответствующего сложного эфира, соли или амида, путь введения, время введения, уровень экскреции конкретного применяемого соединения, продолжительность лечения, другие лекарственные средства, соединения и/или материалы, используемые в комбинации с конкретными применяемыми композициями, возраст, пол, вес, состояние, общее состояние здоровья и предшествующую историю болезни пациента, проходящего лечение, и подобные факторы.

Врач или ветеринар могут начать применять дозы антител и их антигенсвязывающих фрагментов согласно изобретению, применяемых в фармацевтической композиции, на более низких уровнях, чем

необходимо для достижения требуемого терапевтического действия, и постепенно увеличивать дозу, пока не будет достигнут требуемый эффект. В целом эффективные дозы композиций настоящего изобретения для лечения аллергического воспалительного заболевания, описанного в настоящем изобретении, изменяются в зависимости от многих различных факторов, включающих способы введения, целевой участок, психологическое состояние пациента, является ли пациент человеком или животным, другие применяемые лекарственные препараты, и является ли лечение профилактическим или терапевтическим. Дозы, применяемые в лечении, необходимо титровать для оптимизации безопасности и эффективности. При системном введении антитела доза изменяется от приблизительно 0,0001 до 100 мг/кг, и обычно 0,01-15 мг/кг, в расчете на массу тела реципиента. Примерная схема лечения включает системное введение один раз в две недели или один раз в месяц, или один раз в 3-6 месяцев. При интравитреальном введении антитела доза изменяется от приблизительно 0,0001 до приблизительно 10 мг. Пример схемы лечения включает системное введение один раз в две недели или один раз в месяц, или один раз в 3-6 месяцев.

Антитело обычно вводят многократно. Интервалы между введением доз могут быть еженедельными, ежемесячными или ежегодными. Интервалы также могут быть нерегулярными, в зависимости от измерения уровней BMR6-связывающего антитела в крови пациента. В некоторых способах системного введения дозу корректируют для получения концентрации антитела в плазме 1-1000 мкг/мл, а в некоторых способах 25-500 мкг/мл. В альтернативе антитело можно вводить в виде лекарственной формы с замедленным высвобождением, в данном случае требуется менее частое введение. Доза и частота введения варьируют в зависимости от полупериода существования антитела в организме пациента. Как правило, гуманизированные антитела демонстрируют более длительный полупериод существования, чем химерные антитела и нечеловеческие антитела. Доза и частота введения могут изменяться в зависимости от того, является ли лечение профилактическим или терапевтическим. При профилактических применениях относительно низкую дозу вводят через относительно длительные интервалы в течение продолжительного периода времени. Некоторые больные продолжают лечение в течение всей своей жизни. При терапевтических применениях иногда требуется относительно высокая дозировка с относительно короткими интервалами, пока прогрессирование заболевания не будет замедлено или остановлено, и предпочтительно пока пациент не продемонстрирует частичное или полное уменьшение тяжести симптомов заболевания. После этого пациенту может быть назначена профилактическая схема.

В частном варианте осуществления композицию, включающую антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению, вводят в дозе (в расчете на антитело или его антигенсвязывающий фрагмент) от 0,001 до 0,1 мг/кг. В определенном варианте осуществления композицию, включающую антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению, вводят в дозе от приблизительно 0,001 до приблизительно 0,1 мг/кг. В определенном варианте осуществления композицию, включающую антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению, вводят в дозе 0,001, 0,0016, 0,0025, 0,0040, 0,0063, 0,01, 0,016, 0,025, 0,040, 0,063 или 0,1 мг/кг. В определенном варианте осуществления композицию, включающую антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению, вводят в дозе приблизительно 0,001 мг/кг, приблизительно 0,0016 мг/кг, приблизительно 0,0025 мг/кг, приблизительно 0,0040 мг/кг, приблизительно 0,0063 мг/кг, приблизительно 0,01 мг/кг, приблизительно 0,016 мг/кг, приблизительно 0,025 мг/кг, приблизительно 0,040 мг/кг, приблизительно 0,063 мг/кг или приблизительно 0,1 мг/кг. В варианте осуществления композицию, включающую антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению, вводят, в том числе, например, в любой из доз, указанных выше, внутривенно. В вариантах осуществления внутривенное введение является внутривенной инфузией. В вариантах осуществления инфузию проводят в течение 30-60 мин. В вариантах осуществления инфузию проводят в течение приблизительно 30-60 мин.

Примеры

Следующие примеры представлены, чтобы дополнительно проиллюстрировать изобретение, но при этом не ограничить его объем. Другие варианты изобретения будут очевидны среднему специалисту в данной области и включены в объем прилагаемой формулы изобретения.

Пример 1.

В примерах описаны, помимо прочего, антитела 3, 5, 6 и 7.

Это описывает отношение между ними и исходными антителами:

Исходныйклон	NOV0442 (VN3_3-15, V11_1e)			
удаление PTM+восстановление FW-LCDR2	NOV0442_VL[Y49,G50,N51Q]			NOV0442_VL [Y49,G50,N51S]
Зрелый клон с новой HCDR2	NOV0787	NOV0798	NOV0806	NOV0800
Сконструированный клон (с последовательностью зародышевого типа)	NOV0951	NOV0954	NOV0958	NOV0961
Номер NVP	Антитело 5	Антитело 6	Антитело 7	Антитело 3

Все клоны являются человеческими IgG1 антителами.

Список сокращений.

Сокращение	Описание
мк	микро
ак	Аминокислота
АХЗ	Анемия при хроническом заболевании
Amp	Ампициллин
AP	Щелочная фосфатаза
BMP	Костный морфогенетический белок
BMPR	Рецептор костного морфогенетического белка
пн	пара нуклеотидных оснований
BRE	BMP-чувствительный элемент
BSA	Бычий сывороточный альбумин
Cam	Хлорамфеникол
CDR	Определяющая комплементарность область
ХБП	Хроническая болезнь почек
Cy	Яванский макак
Да	Дальтон
DMEM	Модифицированная по Дульбекко среда Игла
ДМСО	Диметилсульфоксид
ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота
дНТФ	Дезоксирибонуклеозид трифосфат
DTT	DL-Дитиотреитол
EC ₅₀	Медианная эффективная концентрация
ECL	Усиленная хемилюминесценция
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
ЭДТА	Этилендиаминтетрауксусная кислота
ELISA	Твердофазный иммуноферментный анализ
EPO	Эритропоэтин
ЭСП	Эритропоз-стимулирующий препарат
Fab	Антигенсвязывающий фрагмент антитела
Fc	Кристаллизуемый фрагмент
F-DAS	Конечная оценка целесообразности разработки
Glu	Глюкоза
Клетки HEK	Человеческие эмбриональные клетки почек
HGB	Гемоглобин
HP	Хелперный факт, VCSM13
HRP	Пероксидаза хрена
Hu	Человек
IC ₅₀	Медианная ингибирующая концентрация
IgG	Иммуноглобулин G
IPITG	Изопропил-β-D-тиогалактозид
K _D	Равновесная константа диссоциации
k _{off}	Константа скорости диссоциации
k _{on}	Константа скорости ассоциации
I.B	Лурия-Бертани
LP	Жидкая фаза
Luc	Люцифераза
M	Молярный
мин	минуты
МС	Масс-спектрометрия
MSD	MESOScale discovery
NaCl	Хлорид натрия
Ni-NTA	Никель-нитрилотриуксусная кислота
O/n	на ночь
OD	Оптическая плотность
PBS	Фосфатно-солевой буфер
PBST	Фосфатно-солевой буфер с 0,1% Tween 20
ПЦР	Полимеразная цепная реакция

ПЭГ	Полиэтиленгликоль
ПЭИ	Полиэтиленимин
РЕМ	Среда для экспрессии белка
Pen/Strep	Пенициллин/стрептомицин
PK/PD	Фармакокинетика/фармакодинамика
POD	Пероксидаза
PTM	Участок посттрансляционной модификации
RE	Рестриктаза
RGA	Анализ с репортерным геном
об/мин	Оборотов в минуту
КТ	Комнатная температура
RU	резонансные единицы
с	секунды
S-DAS	Оценка целесообразности разработки при отборе
ДСН-ПААГэ	Электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия
SET	Равновесное титрование раствора
SP	Твердая фаза
SPR	Поверхностный плазмонный резонанс
Тп	Температура плавления
УФ	Ультрафиолет
VH	Фрагменты варибельного домена тяжелой цепи
VL	Фрагменты варибельного домена легкой цепи

Краткий обзор.

В данной работе успешно идентифицировали специфические антитела против человеческого BMP6 с применением фагового дисплея с использованием человеческой библиотеки фагового дисплея.

Введение.

Анемия распространена у больных с хронической болезнью почек (ХБП) и связана с более низким качеством жизни и более высоким риском неблагоприятных исходов, включая сердечно-сосудистое заболевание и смерть.

Цель антител к BMP6 в качестве гепсидин-понижающей терапии состоит в улучшении состояния больных железодефицитной анемией при одновременном повышении гемоглобина, уменьшении потребности в эритропоэз-стимулирующих препаратах, таких как эритропоэтин и внутривенные препараты железа. Гепсидин-понижающие средства могут быть эффективной стратегией уменьшения тяжести ЭСП-гипореактивной анемии в данной группе больных и при других формах анемии при хронических заболеваниях (АХЗ), характеризующихся дефицитом железа.

Общая цель проекта состоит в идентификации и разработке антител против BMP6, которые способны понижать уровень гепсидина и, таким образом, улучшать состояние больных с железодефицитной анемией, уменьшая потребность в эритропоэз-стимулирующих препаратах (ЭСП). В данной работе применяли фаговый дисплей для идентификации BMP6-специфического связывающего вещества.

Предпочтительные антитела к BMP6 удовлетворяют большинству или всем перечисленным ниже критериям.

Константы диссоциации (значения KD) Fab-фрагментов в отношении человеческого BMP6 ниже 1 нМ.

Значения KD в отношении антигена BMP6 яванского макака не более чем в 5 раз слабее, чем в отношении человеческого BMP6.

Значения KD в отношении мышинового антигена BMP6 не более чем в 5 раз слабее, чем в отношении человеческого BMP6.

Селективность в отношении человеческого BMP6 по сравнению с человеческим BMP5 и человеческим BMP7 более чем со 100-кратным различием.

Способность связывать и нейтрализовывать сигнальную активность BMP6 в анализе с репортерным геном HEP3B-BRE-Luc. Клетки HEP3B, стабильно трансфицированные репортерным геном BRE2-luc2, индуцировали белками hBMP (R&D) и обрабатывали антителами против BMP6. Анализ BrightGlo проводили через 24 ч после обработки.

Способность ингибировать BMP6-индуцированную экспрессию гепсидина в линиях клеток печени и первичных человеческих клетках печени.

Низкие или умеренные риски при разработке. Одним из конечных форматов антитела является человеческий IgG1.

Антитела создавали при использовании коммерчески доступной библиотеки фагового дисплея, как описано ранее (Knappik et al. 2000 J. Mol. Biol. 296:57-86, Prassler et al. 2011 J. Mol. Biol. 413:261-278), в которой используется технология дисплея Fab на поверхности фага (Rothe et al. 2008 J. Mol. Biol. 376:1182-1200). Сортировка и первоначальные скрининги ELISA выполняли на hBMP6 (R&D Systems). Скрининг ELISA белок-связывающих хитов привел к идентификации hBMP6-специфических связывающих веществ. Fab-фрагменты антител затем исследовали на межвидовую перекрестную реактивность с мышинным гомологом BMP6 и определяли их связывающую аффинность с человеческим BMP6. Специ-

фичность Fab-фрагментов также проверяли при использовании белков hBMP2, hBMP5 и hBMP7 в ELISA. BMP6-специфическую активность Fab-фрагментов также оценивали в анализе с репортерным геном.

На основе этой начальной характеристики несколько клонов были преобразованы в формат IgG1 человека и исследованы с использованием таких же анализов связывания, специфичности и активности. Результат этого функционального анализа в сочетании с профилями, полученными при оценке целесообразности разработки, привел к выбору 3 клонов для созревания аффинности (NOV0429, NOV0441 и NOV0442).

Клоны рандомизировали либо в их LCDR3, либо в их HCDR2, с получением 2 новых Fab-библиотек на каждый исходный клон. Выполняли твердофазные сортировки при использовании hBMP6 (Peprotech), а также сортировки в жидкой фазе при использовании случайно биотинилированного hBMP6 (Peprotech). Скрининг MSD-SET лизатов Fab E.coli, в сочетании со специфичным ELISA в отношении белков hBMP5 и hBMP7, привел к идентификации hBMP6-специфических связывающих веществ с улучшенной аффинностью по сравнению с исходными клонами. Эти улучшенные производные затем преобразовывали в формат IgG1 человека и исследовали далее в ELISA и в RGA для оценки их hBMP6-специфической активности.

18 зрелых клонов антител с требуемыми свойствами и хорошими профилями целесообразности разработки были отобраны для конструирования (удаление потенциальных участков РТМ и изменение последовательности в соответствии с зародышевым типом). 28 полученных в результате вариантов были получены в виде hIgG1 при микромасштабной экспрессии и исследованы, как описано ранее.

Результат данного функционального исследования в сочетании с профилями, полученными при оценке целесообразности разработки, привел к отбору основных кандидатов.

Скрининг ELISA на планшетах, напрямую покрытых антигеном.

При использовании скрининга ELISA, отдельные Fab клоны были идентифицированы из результатов сортировки при связывании с антигеном-мишенью. Fab-фрагменты тестировали при использовании Fab-содержащих цельных лизатов E.coli (см. раздел 2.3.3).

Первичный скрининг выполняли при использовании 384-луночных планшетов Maxisorp, которые покрывали о/п при 4°C hBMP6_RD при концентрации 1,5 мкг/мл в 50 мМ цитратном буфере, pH 4,7.

Вторичный скрининг основных хитов выполняли при использовании 96-луночных планшетов Maxisorp, покрытых hBMP6 RD (1,5 мкг/мл в 50 мМ цитратном буфере, pH 4,7), а также 96-луночных планшетов Maxisorb, покрытых hBMP7 (3 мкг/мл в 50 мМ цитратном буфере, pH 4,7) для проверки специфичности.

После промывки планшеты блокировали в течение 2 ч 5% обезжиренным молоком в PBS. Добавляли Fab-содержащие лизаты E.coli и проводили связывание в течение 2 ч при КТ. Для детектирования связавшихся Fab-фрагментов планшеты 5 раз промывали TBST и добавляли AP-конъюгированное антитело против F(ab')₂ человека в разведении 1/5000. После инкубирования в течение 2 ч при КТ планшеты 5 раз промывали TBST и добавляли субстрат AttoPhos согласно инструкции производителя. Планшеты сканировали в спектрофотометре для ELISA через 10 мин после добавления субстрата.

Скрининг SET после созревания аффинности.

Сравнение аффинностей в принципе выполняли, как описано ниже. Для оценки зрелых связывающих веществ с помощью Равновесного Титрования Раствора на основе принципов, описанных Haenel et al., 2005, постоянное количество разведенного экстракта BEL уравнивали в течение ночи с различными концентрациями антигена.

Затем смесь переносили в MSD планшеты, которые были предварительно покрыты антигеном, и после инкубирования и промывки добавляли подходящее меченное MSD-Sulfo меткой детектирующее антитело.

После этого концентрацию несвязанного Fab определяли с помощью ECL детектирования при использовании Sector Imager 6000 (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD, USA).

Результаты обрабатывали при использовании программы XLfit (IDBS), применяя соответствующую приближенную модель (Раздел 2.6.2.2) для оценки аффинностей и, таким образом, идентификации наиболее удачных клонов, улучшенных в результате созревания аффинности.

Анализы in vitro.

Оценка селективности и перекрестной реактивности в ELISA.

Для определения межвидовой перекрестной реактивности антител против BMP6, рекомбинантный человеческий и мышинный белки BMP6 связывали на планшете и определяли способность антител связывать рекомбинантные белки с помощью ELISA. Для оценки селективности также оценивали связывание с ближайшими человеческими гомологами, BMP5 и BMP7.

Антигенные реагенты наносили на планшеты ELISA путем прямой иммобилизации при концентрации 3-5 мкг/мл о/п при 4°C. Для нанесения, hBMP6 (Peprotech) разводили в 50 мМ Трис, pH 8,0. hBMP6, mBMP6 и hBMP5 (R&D Systems) разводили в 50 мМ цитратном буфере, pH 4,7. hBMP7 (Peprotech) разводили в 50 мМ цитратном буфере, pH 4,7. В качестве нерелевантного антигена hDKK1-His наносили в концентрации 5 мкг/мл в PBS.

На следующий день растворы антигенов удаляли и три раза промывали планшеты 100 мкл TBST. Каждую лунку затем блокировали 100 мкл 5% молока в TBST в течение 2 ч при КТ. В последующих экспериментах блокирование выполняли 100 мкл блокирующего буфера Superblock.

После промывки планшетов три раза 100 мкл TBST, каждый антиген инкубировали с 40 мкл образцов очищенного Fab или IgG при концентрации 1 мкМ и 0,2 мМ, соответственно (в буфере PBST).

После инкубирования в течение 2 ч при КТ планшеты снова три раза промывали и детектировали связанные Fab/IgG при добавлении 40 мкл вторичного АР-конъюгированного антитела против человеческого IgG F(ab2) в разведении 1:5000. Через 1 ч при КТ сигнал проявляли путем добавления 40 мкл субстрата AttoPhos согласно методике производителя и сразу анализировали планшеты при использовании длины волны возбуждения 430 нм и длины волны эмиссии 535 нм на спектрофотометре для планшетов ELISA.

Оценка аффинности.

Кривые связывания ELISA.

Антиген hBMP6 (Peprotech) наносили на планшеты ELISA путем прямой иммобилизации при концентрации 1,5 мкг/мл в 50 мМ Трис-буфере, pH 8,0, и инкубировали o/n при 4°C. На следующий день раствор антигена удаляли и три раза промывали планшеты 100 мкл TBST. Каждую лунку затем блокировали 100 мкл 5% молока в TBST в течение 2 ч при КТ. В последующих экспериментах блокирование выполняли 100 мкл блокирующего буфера Superblock.

После промывки планшетов три раза 100 мкл TBST, антиген инкубировали с 30 мкл очищенных образцов Fab или IgG в серии разведений от 1 мкМ до 0,03 нМ в PBST для Fab-фрагментов, от 0,5 мкМ до 0,01 нМ в PBST для IgG.

После инкубирования в течение 2 ч при КТ планшеты снова три раза промывали и детектировали связанные Fab/IgG при добавлении 30 мкл вторичного АР-конъюгированного антитела против человеческого IgG F(ab2) в разведении 1:5000. Через 1 ч при КТ сигнал проявляли путем добавления 30 мкл субстрата AttoPhos согласно методике производителя и сразу анализировали планшеты при использовании длины волны возбуждения 430 нм и длины волны эмиссии 535 нм на спектрофотометре для планшетов ELISA.

Способ равновесного титрования раствора (SET) для определения K_D при использовании Sector Imager 6000 (MSD).

Определение аффинности в растворе в основном выполняли, как описано в литературе (Friquet et al., 1985). Для повышения чувствительности и точности метода SET, его адаптировали из классического ELISA к технологии на основе ECL (Haenel et al., 2005).

1 мг/мл специфического антитела козы против (Fab)₂ фрагмента IgG человека было помечено меткой MSD Sulfo-TAG™ NHS-Ester (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD, USA) согласно инструкции производителя.

Эксперименты проводили в полипропиленовых микротитровальных планшетах и в PBS, содержащем 0,5% (в./об.) BSA и 0,02% (об./об.) Tween20, в качестве аналитического буфера. Немеченый антиген разводили в серии 2n, начиная с концентрации по меньшей мере в 10 раз выше, чем ожидаемая K_D . Лунки без антигена использовали для определения значений B_{max} ; лунки, содержащие только аналитический буфер, использовали для определения фона. После добавления подходящего количества связывающего вещества (концентрации антитела, соответствующей или ниже ожидаемой K_D , в конечном объеме 60 мкл) смесь инкубировали в течение ночи при КТ.

Планшеты MSD покрывали антигеном (30 мкл на лунку). После промывки планшетов PBS, содержащим 0,05% (об./об.) Tween20, уравновешенные образцы переносили в эти планшеты (30 мкл на лунку) и инкубировали в течение 20 мин. После промывки в планшет MSD добавляли 30 мкл на лунку меченного MSD-Sulfo меткой детектирующего антитела (против человеческого (Fab)₂, обычно в конечном разведении 1:2000) и инкубировали в течение 30 мин при КТ на шейкере Eppendorf (700 об/мин).

После промывки планшетов MSD и добавления 30 мкл/лунка буфера MSD Read Buffer T с поверхностно-активным веществом, электрохемилюминесцентные сигналы детектировали при использовании Sector Imager 6000 (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD, USA).

Данные оценивали с помощью программы XLfit (IDBS), применяя подходящие приближенные модели. Для определения K_D молекул Fab использовали следующую приближенную модель (согласно Haenel et al., 2005, с модификацией согласно Abraham et al., 1996):

$$y = B_{\max} - \left(\frac{B_{\max}}{2[Fab]_t} \left([Fab]_t + x + K_D - \sqrt{([Fab]_t + x + K_D)^2 - 4x[Fab]_t} \right) \right)$$

где $[Fab]_t$: применяемая общая концентрация Fab;

x : применяемая общая концентрация растворимого антигена (связывающие участки);

$B_{\max}$: максимальный сигнал Fab без антигена;

K_D : аффинность.

Для определения K_D молекул IgG использовали следующую приближенную модель для IgG (с модификацией согласно Piehler et al., 1997):

$$y = \frac{2B_{\max}}{[IgG]} \left[\frac{[IgG]}{2} - \frac{\left(\frac{x + [IgG] + K_D}{2} - \sqrt{\frac{(x + [IgG] + K_D)^2}{4} - x[IgG]} \right)^2}{2[IgG]} \right]$$

где [IgG]: применяемая общая концентрация IgG;

x: применяемая общая концентрация растворимого антигена (связывающие участки);

$B_{\max}$: максимальный сигнал IgG без антигена;

K_D : аффинность.

Параметры эксперимента.

Определение K_D Fab-фрагментов в основном выполняли следующим образом: планшеты MSD покрывали о/п при 4°C 10 мкл на лунку hBMP6 в концентрации 1-3 мкг/мл в 10 мМ Трис-буфере, pH 8. После этого планшеты блокировали в течение 1 ч PBS, содержащим 5% BSA. Антиген hBMP6 использовали для титрования свободных Fab-фрагментов. Стоковый раствор антигена предварительно разводили 1:40 в 10 мМ Трис-буфера, pH 8,0, до 475 нМ, перед доведением аналитическим буфером до предполагаемой начальной концентрации для титрования.

Измерение кинетики ForteBio Octet.

Оценку аффинности путем определения кинетических параметров выполняли с применением технологии интерферометрии биослоя.

Очищенные образцы Fab измеряли при использовании биосенсоров Streptavidin Dip и Read. Планшет помещали в прибор Octet QK (ForteBio) и оставляли для уравнивания при 25°C в термостатированной камере. Цикл начинали, поместив сенсоры в лунки, содержащие 15 мкг/мл биотинилированного антигена hBMP6, на 600 с. Затем сенсоры помещали в лунки, содержащие 0, 200, 400, 800 или 1600 нМ очищенного образца Fab. Концентрацию Fab 0 нМ использовали для определения фона. Ассоциацию и диссоциацию Fab регистрировали при измерении изменения толщины слоя (в нанометрах, нм) в динамике в течение 800 с каждую, все под контролем компьютера. Данные обрабатывали автоматически при использовании программы Octet User Software версии 3.0.

Измерение кинетики ViaCore.

Измерения выполнены при использовании очищенных образцов Fab и IgG, а также человеческих BMP6 и BMP7 в качестве антигенов.

Сортировка эпитопов с помощью ELISA.

Сортировку эпитопов с помощью конкурентного ELISA выполняли для разделения антител на группы идентичных или значимо перекрывающихся эпитопов, т.е. антител, которые могли ингибировать связывание друг друга.

Антитела IgG против BMP6 наносили на 384-луночный планшет Maxisorp в объеме 20 мкл при концентрации 66 нМ в PBS. Планшет инкубировали о/п при 4°C. После двукратной промывки TBST планшет блокировали 100 мкл на лунку блокирующего буфера Superblock в течение 2,5 ч при КТ, затем два раза промывали TBST.

При блокировании планшета, Reprotech hBMP6 при концентрации 66 нМ в PBST предварительно смешивали с очищенными Fab-фрагментами против BMP6 (мечеными Flag-His) в концентрации 300 нМ в PBST в пробирках типа Эппендорф (указаны конечные концентрации в смеси). После инкубирования в течение 2 ч при КТ в лунки, покрытые блокированным IgG против BMP6, добавляли 20 мкл предварительно смешанных hBMP6/Fab-фрагментов, в соответствии с разметкой планшета, и инкубировали в течение не более 20 мин при КТ.

Планшет четыре раза промывали TBST и добавляли в планшет конъюгат антитела His6-POD ("His6" раскрыт в SEQ ID NO: 96), разведенного 1/1000 в PBST. После инкубирования в течение 1 ч при КТ планшет 5 раз промывали TBST. Раствор хемилюминесцентного субстрата для ELISA добавляли в каждую лунку и считывали люминесценцию без инкубирования при использовании спектрофотометра для планшетов Tecan.

Активность *in vitro* в анализе с репортерным геном (RGA).

Клоны антител тестировали в анализе с репортерным геном (RGA), как очищенные образцы Fab-фрагментов и/или IgG.

Коротко, линию клеток гепатомы HEP3B стабильно трансфицировали лентивирусным вектором pGL4-BRE2-Luc2, который содержал BMP-чувствительный элемент BRE в промоторе, направляющем экспрессию люциферазы светляка. Белки BMP (R&D systems) использовали для индукции передачи сигналов. Анализ BrightGlo проводили через 24 ч после обработки.

Оценка нецелевой активности.

Микроматрица Progen UNChip® AV-VAR EP содержит 384 очищенных внеклеточных или секретируемых белков, экспрессируемых в виде слитого белка с N-концевой His-меткой в E.coli.

После инкубирования с антителами против hBMP6 в концентрации 5 мкг/мл, связанные антитела детектировали при использовании DyLight649 F(ab')₂ конъюгированного специфического антитела козы

против F(ab')₂ фрагмента hIgG.

Сигнал внутреннего контроля hIgG устанавливали на 100%; нецелевую активность нормализовали по hIgG; хит считают положительным, если сигнал равен или выше 4% (пороговое значение соответствует m+3, измеренному относительно фона).

Эффективность in vivo в модели на мышах.

Очищенные антитела антитело 5, антитело 6 и антитело 7 тестировали в модели ЭСП-резистентной анемии на мышах.

Результаты.

Исследование антител против BMP6.

Оценка специфичности сконструированных IgG.

28 сконструированных IgG против hBMP6 (с изменением последовательностей по зародышевому типу и удалением PTM) получали в микромасштабе и тестировали на специфичность с помощью ELISA при концентрации 0,2 мкМ.

Сконструированные варианты, которые сохраняли ограниченную перекрестную реактивность с другими белками BMP и сильную аффинность к hBMP6 по сравнению с несконструированным зрелым клоном, были отобраны для дальнейшего исследования.

Все сконструированные IgG варианты NOV0429 показали сильно увеличившееся неспецифическое связывание с BSA.

Сконструированные IgG варианты NOV04 41 показали немного увеличившуюся перекрестную реактивность с hBMP5 по сравнению с их зрелым исходным клоном.

Сконструированные IgG варианты NOV04 42 сохранили свою ограниченную перекрестную реактивность с hBMP7 и с hBMP5.

Таблица 2

Специфичность в ELISA сконструированных клонов IgG антител;
серым цветом выделены 3 основных антитела

Сконструированные IgG ID	IgG (0,2 мкМ) Специфичность в ELISA: Сигнал в сравнении с фоном				
	hBMP6	mBMP6_RD	hBMP7	hBMP5_RD	BSA
NOV0429	60	20	3	12	2
NOV0939	65	43	41	70	24
NOV0940	63	47	43	71	26
NOV0941	63	45	29	63	15
NOV0942	70	47	24	64	12

NOV0441	70	27	3	5	1
NOV0943	68	26	2	7	1
NOV0944	68	27	3	6	6
NOV0945	68	30	4	10	4
NOV0946	65	31	7	21	1
NOV0947	65	37	17	52	7
NOV0442	46	7	2	2	1
NOV0442_VL[YGS]	42	10	2	4	1
NOV0442_VL[YGQ]	42	8	2	2	1
NOV0959	52	17	5	2	1
NOV0948	55	16	11	1	1
NOV0960	57	16	8	5	1
NOV0949	56	18	15	2	1
NOV0963	56	21	4	1	1
NOV0950	65	19	11	2	1
NOV0951	65	24	8	6	1
NOV0964	61	20	4	2	1
NOV0952	72	25	9	2	1
NOV0965	30	23	2	2	1
NOV0953	39	20	4	3	1
NOV0954	38	29	3	2	1
NOV0961	48	29	2	1	1
NOV0966	55	32	3	1	1
NOV0956	49	38	8	3	1
NOV0962	53	31	2	2	1
NOV0957	48	30	6	2	1
NOV0958	59	32	7	1	1
Контрольный IgG	61	18	14	4	1

Активность в анализе с репортерным геном (RGA).

28 полученных в микромасштабе, сконструированных IgG антител против hBMP6 (с изменением последовательностей по зародышевому типу и удалением PTM) тестировали, как описано выше. Результаты приведены в табл. 3.

Сконструированные IgG варианты NOV0429 показали в 3-5 раз улучшенную BMP6 активность, но при этом приобрели агонистическую активность ко всем остальным белкам BMP.

Сконструированные IgG варианты NOV0441 приобрели некоторую перекрестную реактивность ко всем трем остальным белкам BMP.

Сконструированные IgG варианты NOV0442 показали улучшенную BMP-активность, но при этом также показали некоторое ингибирование BMP7-индуцированной системы при наибольшей концентрации 25 мкг/мл.

Таблица 3

Активность сконструированных клонов IgG антител в RGA; значения IC₅₀ указаны в [мкг/мл].
NOV0951, NOV0954 и NOV0958 были отобраны в качестве основных антител

IgG ID	BMP6			BMP7			BMP5			BMP2		
	min	max	IC50	min	max	IC50	min	max	IC50	min	max	IC50
NOV0429	0,03	1,0	0,9	0,8	1,2	>25	0,9	1,1	>25	0,8	1,1	>25
NOV0939	0,02	0,9	0,3	1,0	1,9	8	1,0	1,5	5	1,0	1,2	>25
NOV0940	0,01	0,9	0,3	1,0	1,9	7	0,9	1,5	5	0,9	1,2	>25
NOV0941	0,02	0,9	0,2	1,0	1,7	6	0,9	1,5	4	1,1	1,3	>25
NOV0942	0,02	1,0	0,2	1,0	1,7	>25	0,2	1,0	20	1,0	1,1	>25
NOV0441	0,02	1,0	0,6	0,9	1,1	>25	1,0	1,1	>25	1,0	0,9	>25
NOV0943	0,02	1,0	0,1	0,4	1,3	25	0,2	1,0	15	0,5	1,0	25
NOV0944	0,01	1,0	0,6	0,5	1,1	25	0,5	1,0	25	0,6	0,9	>25
NOV0945	0,01	1,0	0,2	0,4	1,1	25	0,4	1,0	25	0,5	0,9	22
NOV0946	0,01	1,0	0,2	0,4	1,2	25	0,5	1,0	25	0,7	0,9	>25
NOV0947	0,10	0,9	0,3	0,9	0,9	>25	0,6	1,0	>25	0,9	1,6	>25
NOV0442	0,02	1,0	0,24	0,8	1,0	>25	1,0	1,1	>25	0,8	0,9	>25
NOV0948	0,03	1,0	0,06	0,2	1,0	5	1,0	0,9	>25	1,0	1,1	>25
NOV0949	0,02	0,9	0,05	0,2	0,9	25	1,0	1,0	>25	0,9	0,9	>25
NOV0950	0,03	0,9	0,04	0,2	1,0	9	1,1	1,0	>25	0,9	0,9	>25
NOV0951	0,02	0,9	0,04	0,5	1,0	25	1,1	1,0	>25	0,9	1,0	>25
NOV0952	0,02	1,0	0,05	0,3	1,0	10	1,1	1,0	>25	0,8	0,8	>25
NOV0953	0,02	1,0	0,05	0,5	1,0	15	1,1	1,0	>25	0,9	1,0	>25
NOV0954	0,02	1,0	0,05	0,5	0,9	25	0,9	1,0	>25	1,0	1,0	>25
NOV0955	0,03	0,9	0,04	0,4	0,9	25	1,0	1,1	>25	0,9	0,9	>25
NOV0956	0,02	0,9	0,05	0,5	0,9	25	1,0	1,0	>25	0,9	1,0	>25
NOV0957	0,03	0,9	0,08	0,4	0,9	12	1,0	1,0	>25	0,9	0,9	>25
NOV0958	0,02	0,9	0,04	0,5	0,9	25	1,1	1,1	>25	1,1	0,9	>25
NOV0959	0,02	1,0	0,20	0,5	0,9	25	0,8	0,9	>25	0,9	0,9	>25
NOV0960	0,01	0,9	0,07	0,5	1,0	25	0,8	1,0	>25	0,8	1,2	>25
NOV0961	0,02	0,9	0,08	0,8	1,0	>25	0,8	0,9	>25	0,8	1,0	>25
NOV0962	0,01	0,9	0,26	0,7	1,0	>25	0,9	1,0	>25	0,8	1,0	>25
NOV0963	0,02	0,8	0,11	0,6	0,9	>25	0,8	1,1	>25	0,8	1,0	>25
NOV0964	0,02	1,0	0,09	0,5	1,1	>25	0,7	1,0	>25	0,8	0,9	>25
NOV0965	0,02	1,0	0,11	0,8	1,1	>25	1,0	1,2	>25	0,8	0,9	>25
NOV0966	0,02	0,9	0,10	0,6	1,1	>25	0,9	1,2	>25	0,9	0,9	>25

S-DAS 3 оценка целесообразности разработки.

После изменения последовательностей по зародышевому типу и удаления PTM, 23 сконструированных варианта антител против hBMP6 из 18 зрелых клонов подвергали третьей оценке целесообразности разработки.

Антитела, как обнаружили, имели благоприятные профили рисков при разработке, за исключением 2 клонов, которые показали высокий риск из-за высокого уровня агрегации (NOV0942, HCDR2-производное NOV0429; NOV0944, LCDR3-производное NOV0441).

2 других клон были отмечены со средним профилем риска из-за их низкого титра продуктивности (NOV0957 и NOV0960, HCDR2-производные исходного антитела NOV0442).

Таблица 4

Обзор результатов S-DAS 3 антител против BMP6 (23 сконструированных hIgG1); NOV951, NOV954 и NOV958 были отобраны в качестве основных антител

NOV ID	Особая рекомендация группы S-DAS	Участки РТМ, которые рекомендуются удалить	Общий риск	Агрегаты	Продуктивность	Накопление факторов риска	pI (прогнозирование in silico)	Tp (°C, pH 7,4, данные IgG)	Гидрофобность (M (NH ₄) ₂ SO ₄ , His pH 6,0)	Окончательные замечания
NOV936	-	нет	низкий	низкий	низкий	низкий	9,4	77,0	0,87	
NOV937	-	нет	низкий	низкий	низкий	низкий	9,4	76,8	0,82	
NOV938	-	нет	низкий	низкий	низкий	низкий	9,4	77,0	0,86	
NOV942	!	нет	высокий	высокий	низкий	низкий	9,5	78,8	0,88	Высокая тенденция к агрегации
NOV943 (резервное)	-	нет	низкий	низкий	низкий	низкий	9,3	71,0	0,97	
NOV944	!	нет	высокий	высокий	низкий	низкий	9,2	69,0	0,78	Высокая тенденция к агрегации
NOV945 (резервное)	-	нет	низкий	низкий	низкий	низкий	9,3	69,3	0,78	
NOV946 (резервное)	-	нет	низкий	низкий	низкий	низкий	9,2	66,5	0,97	
NOV951 (основное)	-	нет	низкий	низкий	низкий	низкий	9,4	65,0	1,03	
NOV953	-	нет	низкий	низкий	низкий	низкий	9,4	61,5	1,00	
NOV954 (основное)	-	нет	низкий	низкий	низкий	низкий	9,3	62,8	1,01	
NOV955	-	нет	низкий	низкий	низкий	низкий	9,4	66,8	1,05	
NOV956	-	нет	низкий	низкий	низкий	низкий	9,4	65,0	1,03	
NOV957	!	нет	средний	низкий	средний	низкий	9,4	64,5	0,88	Титр может не быть релевантным, при необходимости можно сделать повтор
NOV958 (конечное основное)	-	нет	низкий	низкий	низкий	низкий	9,2	66,0	1,03	
NOV959	-	нет	низкий	низкий	низкий	низкий	9,4	66,5	0,80	
NOV960	!	нет	средний	низкий	средний	низкий	9,5	64,3	1,06	Титр может не быть релевантным, при необходимости можно сделать повтор
NOV961 (резервное)	-	нет	низкий	низкий	низкий	низкий	9,4	68,5	1,05	
NOV962	-	нет	низкий	низкий	низкий	низкий	9,4	65,0	0,90	
NOV963	-	нет	низкий	низкий	низкий	низкий	9,4	65,5	0,92	
NOV964	-	нет	низкий	низкий	низкий	низкий	9,4	64,5	0,96	
NOV965	-	нет	низкий	низкий	низкий	низкий	9,4	64,0	1,01	
NOV966	-	нет	низкий	низкий	низкий	низкий	9,4	65,8	1,04	
				важные параметры		факторы риска				

Критические РТМ мотивы

да РТМ мотивы, которые рекомендуется удалить (NG, NS, DG, N-Glyc, Cys, H-N30X)

общий риск

низкий низкий риск
 средний средний риск
 высокий высокий риск: рекомендация – не продолжать работу с таким кандидатом; данный кандидат не соответствует общим критериям DAS

агрегаты

низкий содержание мономера IgG составляет по меньшей мере 95%
 средний содержание мономера IgG составляет 90-95%
 высокий содержание мономера IgG ниже 90%; данный кандидат не соответствует общим критериям DAS (≥90%)

продуктивность

низкий продуктивность IgG в системах транзientной экспрессии составляет по меньшей мере 10 мг/л
 средний продуктивность IgG в системах транзientной экспрессии составляет 5-10 мг/л
 высокий продуктивность IgG в системах транзientной экспрессии ниже 5 мг/л; данный кандидат не соответствует общим критериям DAS (≥5 мг/л)

pI

≥8,2

<8,2; указывает на некоторый риск; может возникать агрегация/сложности при изготовлении лекарственных форм

Тп (рН 7,4)

≥68°C

<68°C; указывает на некоторый риск для стабильности; может возникать агрегация/сложности при изготовлении лекарственных форм

гидрофобность

≥0,8M (NH₄)₂SO₄

<0,8M (NH₄)₂SO₄; указывает на некоторый риск агрегации/ могут возникать сложности при изготовлении лекарственных форм, высокая вязкость, преципитация

Оценка нецелевой активности.

3 основных кандидата NOV0951, NOV0954 и NOV0958 тестировали в виде очищенных hIgG1 на нецелевое связывание на микроматрице Protogen UN1chip, покрытой 384 очищенными внеклеточными или секретирруемыми белками, как описано выше. Все они показали низкую нецелевую активность (≤10 хитов), что можно считать некритичным.

Таблица 5

Обзор результатов, полученных на белковых чипах для 3 основных антител

		Штрихкод	1006	1007	1013
		Антитело	Ab 5	Ab 6	Ab 7
Белок	номер gi				
Белок LARP	gi 21707496		4	4	3
Коллаген XVIII	gi 17226298		4	5	2
Белок 2810468K05Rik*	gi 16741397		3	4	3
Rab40c; член семейства онкогенов RAS; RAR (RAS-подобная ГТФаза) подобный; SOCS-бокс-содержащий белок RAR3*	gi 21040231		5	5	3
Хромосома 4 открытая рамка считывания 14	gi 13436155		3	4	1
Белок, взаимодействующий с доменом гомологии плекстрина	gi 34996489		3	5	2
Белок PTPRM	gi 30353785		5	6	3
Рибосомальная протеин-киназа B (RSK-B)	gi 3452409		5	5	4
Белок, ассоциируемый с рецептором тиреоидного гормона 5; компонент комплекса белка, ассоциируемого с рецептором тиреоидного гормона; белок, ассоциируемый с рецептором тиреоидного гормона; субъединица 95 кДа	gi 38146094		5	7	4
BM-017	gi 7582306		4	4	2
IGM человека	gi 186200		8	3	6
Нецелевая активность (пороговое значение ≥4%) (*)			8	10	3

(*): Нецелевая активность, нормализованная по hIgG (=100%).

Положительные хиты выделены оранжевым.

Выбор основных и резервных антител.

На основе данных связывания белков, данных по активности и специфичности в RGA, а также оценки целесообразности разработки было решено выбрать сконструированные кандидаты NOV0951, NOV0954, NOV0958 в качестве основных антител. Кроме того, все они показали превосходное окно специфичности к hBMP6 по сравнению с антителом 676. Сконструированных кандидатов NOV0961, NOV0943, NOV0945 рассматривали в качестве резервных антител. В табл. 6 представлено родовое дерево конечных кандидатов.

Таблица 6

Родовое дерево выбранных основных и резервных антител против hBMP6

Исходный клон, ID (каркас)	Удаление РТМ и замена каркаса	Зрелый клон, ID (зрелая CDR)	ID клона с изменением по зародышевому типу	Номер
NOV0442	NOV0442_	NOV0787 (HCDR2)	NOV0951	Антитело 5
(VH3, VL1)	VL[Y49, G50, N51Q]	NOV0798 (HCDR2)	NOV0954	Антитело 6
		NOV0806 (HCDR2)	NOV0958	Антитело 7
	NOV0442_ VL [Y49, G50, N51S]	NOV0800 (HCDR2)	NOV0961	Антитело 3
NOV0441 (VH3, VL3)	Неприменимо	NOV0766 (LCDR3)	NOV0943	LSR434
		NOV0770 (LCDR3)	NOV0945	LSR435
		NOV0763 (HCDR2)	NOV0946	LSR439

Выводы и обсуждение.

Цель данного проекта состояла в том, чтобы получить антитела, ингибирующие сигнализацию BMP6 и, таким образом, подходящие для лечения анемии при хронических заболеваниях.

Таким образом, были применены 3 разных стратегии сортировки на основе белков. Первичные хиты ELISA, главным образом, были обнаружены в пулах твердофазной сортировки, при этом после анализа активности в RGA 12 антител, как было показано, ингибировали hBMP6 сигнализацию. 3 клон антитела (NOV0429, NOV0441 и NOV0442), полученные при сортировке с подкодом 2023.5, показали BMP6-специфическую активность и хорошие показатели целесообразности разработки и поэтому были выбраны для созревания аффинности.

Для каждого клон антитела были получены 2 библиотеки, либо с LCDR3, либо с рандомизированной HCDR2. Были применены 3 разные стратегии сортировки созревания. После SET скрининга, анализа специфичности ELISA и секвенирования, 18 зрелых клонов антител, как было установлено, специфично ингибировали BMP6 сигнализацию в RGA и были выбраны для конструирования.

Зрелые клоны, полученные из семейства NOV0442, были подвергнуты удалению потенциального участка деамидирования в LCDR2, замене каркаса и изменению последовательностей по зародышевому типу. Это привело к получению антител NOV0951, NOV0954, NOV0958 и NOV0961, которые, как было показано, обладали аналогичными связывающими свойствами, как их соответствующие немутантные зрелые предшественники.

Зрелые клоны, полученные из семейства NOV0441, были подвергнуты изменению последовательностей по зародышевому типу, что привело к получению антител NOV0943, NOV0945 и NOV0946, которые, как было показано, обладали увеличенной перекрестной реактивностью с BMP5 по сравнению с их соответствующими немутантными зрелыми предшественниками.

С учетом их способности ингибировать сигнализацию BMP6 с ограниченной перекрестной реактивностью по отношению к другим белкам BMP и их благоприятного профиля целесообразности разработки, NOV0951, NOV0954 и NOV0958 были получены в более высоких количествах и направлены для последующей оценки их применимости в качестве терапевтического лекарственного средства для лечения ЕРО-резистентной (железодефицитной) анемии. Модель ЭСП-резистентной анемии на мышах использовали для определения их эффективности *in vivo*.

3 основных антитела NOV0951, NOV0954 и NOV0958 были подвергнуты конечной оценке целесообразности разработки. Пригодность *in vivo* 3 основных антител оценивали при определении их ФК профилей на крысах.

В табл. 7 представлены свойства конечных основных кандидатов, которые удовлетворяли требованиям к антителам, определенным на начальном этапе проекта.

Таблица 7

Свойства выбранных основных антител против hBMP6

Свойство	Критерии CSP	Основные антитела
Аффинность связывания	$K_D < 1$ нМ к hBMP6 согласно Biacore	Антитело 5, Антитело 6, Антитело 7- $\approx 0,1$ нМ
Специфичность	>30 -кратная селективность при ингибировании активности hBMP6 в сравнении с hBMP7 в клеточном анализе (RGA).	Критериям удовлетворяют - все Ат $\approx 1000\times$ RGA селективность Неразличимая (недетектируемая) активность против BMP2 или 5
Активность in vitro	Нейтрализует hBMP6 в BRE-Luc RGA с $IC_{50} < 10$ нМ.	Антитело 5-0,26 нМ Антитело 6-0,30 нМ Антитело 7-0,26 нМ
Активность in vivo	При модели ЕРО-резистентной анемии при воспалении, терапевтическое лечение: -восстанавливает ответ на ЕРО. -значительно ускоряет восстановление гемоглобина (HGB) или гематокрита (HCT).	Для Антитела 5, Антитела 6, Антитела 7, однократное введение 2 мг/кг восстанавливает ответ на ЕРО и увеличивает HGB на $\geq 2,0$ г/дл в 1 неделю.
Оценка целесообразности разработки	Конечная оценка DAS успешно пройдена	Антитело 5 и Антитело 7 удовлетворяют критерию возможности разработки Антитело 6 не целесообразно разрабатывать из-за нестабильности в сыворотке яванского макака

Пример 2. Активность in vitro и in vivo и ФК/ФД антител против BMP6.

Материалы.

Тестируемыми соединениями являлись антитела 5, 6 и 7 (табл. 8) при концентрации ~ 8 мг/мл в 50 мМ цитратном буфере, pH 7,0, 150 мМ NaCl, которые разводили в PBS перед введением животным. Использовали самцов мышей C56BL/6 или крыс линии Спрег-Доули (табл. 9).

Таблица 8

Свойства антагонистических антител к BMP6

ID антитела	Каркас	KD (нМ) BMP6	IC50 (мкг/мл) BMP6 репортер
АНТИТЕЛО 5	VN3_15, V11	0,1	0,06
АНТИТЕЛО 6	VN3_15, V11	$< 0,1$	0,08
АНТИТЕЛО 7	VN3_15, V11	0,1	0,07

Таблица 9

Характеристики животных

Вид	Линия	Категория	Поставщик	Пол	Возраст
Мышь (<i>Mus musculus</i>)	C57BL/6	дикий тип	Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME	Самец	8-9 недель
Крыса (<i>Rattus norvegicus</i>)	Спрег-Доули	дикий тип	Charles River Laboratory, Wilmington, MA	Самец	8-12 недель

Для анализов с репортерным геном BMP сконструировали лентивирусный вектор, содержащий в промоторе BMP-чувствительный элемент BRE [Korchynskyi et al. 2002. J. Biol. Chem. 277:4882-91], направляющий люциферазу светляка из pGL4-BRE2-Luc2. Лентивирусный вектор использовали для стабильной трансфекции клеточной линии гепатомы HEP3В. Клеточную линию поддерживали в ЕМЕМ с 10% эмбриональной бычьей сывороткой, 1% пенициллина/стрептомицина и 5 мкг/мл бластицидина.

Рекомбинантные человеческие белки BMP были приобретены у R&D Systems.

Антиген Brucella abortus для кольцевого теста (штамм 1119-3) во флаконах 60 мл был приобретен в Министерстве сельского хозяйства США, Службе инспекции здоровья животных и растений США, National Veterinary Services Laboratories, Ames, Iowa. Антиген бруцеллеза для кольцевого теста содержит суспензию убитых окрашенных клеток штамма B. abortus 1119-3 в обработанном фенолом буфере. Концентрация в каждом флаконе объемом 60 мл составляет приблизительно 10^9 частиц/мл. Сток 5×10^9 промывали и подготавливали следующим образом. Сначала флаконы объемом 60 мл извлекали из холодильника и тщательно перемешивали. Затем 500 мл ВА переносили в центрифужную колбу объемом 500 мл. Затем колбы центрифугировали при 10000 об/мин в течение 15 мин на ультрацентрифуге. Супернатант удаляли и ресуспендировали в PBS на 100 мл с получением стока 5×10^9 частиц/мл, который делили на аликвоты и замораживали при -80°C .

Условия содержания животных.

Животных содержали в общих клетках с твердым дном Micro-Isolator в периоды акклиматизации и исследования. Животные находились в следующем стандартном световом цикле: 12 часов темноты, 12 часов света (освещение включали: 6:30, освещение выключали: 18:30) при комнатной температуре 21-23°C и влажности 30-70%. В течение периодов акклиматизации и исследования животным давали доступ

к корму для грызунов и воде без ограничения (ad libitum).

Условия эксперимента.

Определение активности антител в анализе с репортерным геном BMP.

В типовом анализе $0,6 \times 10^4$ клеток BRE-Luc2 HEP3В сеяли в 384-луночные планшеты в 25 мкл минимальной культуральной среды за исключением того, что содержание сыворотки уменьшали до 2%. На следующий день добавляли антитела, разведенные в PBS, после чего добавляли BMP6 до конечной концентрации 10 нг/мл. Объем доводили до 50 мкл средой ЕМЕМ без сыворотки с получением конечной концентрации сыворотки 1%. В качестве промежуточных анализов параллельно проводили активацию BMP2/4/7. Анализ BrighGlo (Promega) выполняли через 24 часа после добавления антитела согласно инструкции производителя при использовании спектрофотометра для планшетов Envision (PerkinElmer). Данные вычисляли как процент ингибирования для каждого антитела в сравнении с полной активацией репортера контрольным антителом.

Исследование фармакокинетики при введении разовой дозы у крыс.

Первичное исследование ФК на крысах не предназначено для определения классических ФК параметров с определенной статистической значимостью, а скорее для получения оценки полупериода существования тестируемого антитела в сыворотке. 3 животным вводили разовую в/в дозу антитела.

Для исследования зависимости ФК/ФД от дозы на мышах животных поровну делили на 2 отдельных когорты. Каждая когорта включала мышей, получавших и растворитель, и соединение. Одну когорту подвергали анализам в день 2, 4, тогда как вторую когорту обследовали в день 6, 8 после инъекции антитела. Причина разделения когорт заключалась в уменьшении потребности в периодическом заборе крови, чтобы воздействие на показатели железа в сыворотке сохранялось на минимальном уровне. Группы животных показаны в табл. 10.

Таблица 10

Схема исследования, распределение животных и дозы тестируемого препарата

Эксперимент	Группа	Кол-во	Доза (мг/кг, в/в)	Частота
Мышь ФК/ФД	Контроль hIgG	5	0,5	Однократно
	0,05 мг/кг АНТИТЕЛО 6	5	0,05	Однократно
	0,1 мг/кг АНТИТЕЛО 6	5	0,1	Однократно
	0,5 мг/кг АНТИТЕЛО 6	5	0,5	Однократно
Мышь ВА анемия	Ложная (без ВА)	6	0	0
	ВА, ЕРО+ контроль hIgG	6	2	Однократно
	ВА, ЕРО+ АНТИТЕЛО 5	6	2	Однократно
	ВА, ЕРО+ АНТИТЕЛО 6	7	2	Однократно
	ВА, ЕРО+ АНТИТЕЛО 7	6	2	Однократно

Индукция анемии при воспалении у мышей и терапевтическое лечение 5×10^8 частиц ВА для инъекции подготавливали следующим образом (пример для 10 мышей). Начальная концентрация должна быть $2,5 \times 10^9$ частиц/мл, так как вводят 200 мкл/мышь. Сток разводят в 2 раза при использовании PBS. Например, 10 мышей на 0,200 мл = 2 мл + 20%, требуется всего = 2,2 мл $2,5 \times 10^9$ частиц/мл. Сток 1,1 мл ВА + 1,1 мл PBS. Введение ВА за 1-8 дней до лечения ЭСП, как было показано, приводило к ослаблению ответа HGB через 6-7 дней.

Мышам C57BL/6 вводили ВА (3×10^8 частиц/мышь) и измеряли уровни IL6 в сыворотке через 5 часов с помощью ELISA (KMC0061, Life Technologies) для определения воспалительного ответа. Животных с концентрацией IL6 ниже 95% доверительного интервала среднего показателя для всех ВА-обработанных животных исключали из исследования, в результате чего в некоторых группах осталось меньше 5-6 мышей. Этот процесс исключения выполняли, чтобы уменьшить возможность получения ложноположительных результатов при включении животных, которые не имели достаточного воспаления с ослаблением ответа на ЭСП. После процесса исключения мышам в/в вводили антитела, как указано в день 6, и вводили ЕРО (подкожная инъекция 100 г/кг дарбэпоэтина альфа, Amgen) в дозе 100 мг/кг в день 7 относительно обработки ВА. Ответ на ЭСП и терапию антителами измеряли через 6 дней.

Исследования фармакокинетики, фармакодинамики и конечные критерии эффективности.

Для исследований ФК/ФД на мышах и крысах образцы сыворотки забирали в указанные точки времени после инъекции антитела. Аликвоты сыворотки использовали для определения концентрации циркулирующего антитела с помощью автоматизированной системы высокопроизводительного иммуоанализа (Gygos) с биотинилированным антителом против человеческого IgG в качестве первичного захватывающего антитела. Вторую аликвоту сыворотки каждого образца использовали для количественного колориметрического анализа железа (Quntichrom, DIFE-250, Bioassay Systems). Третью аликвоту обрабатывали для количественного анализа с помощью ЖХ-МС гепсидин-25 пептида крысы или мыши согласно модифицированной методике, описанной ранее (Li et al. 2009. J. Pharm. Tox. Meth. 59: 171-80).

Для исследования ВА-индуцированной анемии и лечения антителами последний забор крови производили в покрытые ЭДТА пробирки BD Microtainer при завершении посредством кардиальной пунк-

ции. Цельную кровь использовали для общего анализа крови ХТ-на гематологическом анализаторе ХТ-2000iV. Результаты эффективности включают HGB, HCT, RETa и RET-HE.

Статистические анализы.

Однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим апостериорным критерием Бонферрони выполняли с целью анализа различия между группами (значимым считали значение $p < 0,05$) по гематологическим показателям. Данные представлены как средние $\pm$ SEM.

Результаты.

Биологическая активность антагонистических антител к BMP6 в клеточных анализах BMP-зависимой транскрипции.

Все три антагонистических антитела к BMP6-5, 6 и 7, полностью ингибируют биоактивность индуцированной рекомбинантным человеческим BMP6 BMP репортерной (BRE-luc) активности в линии клеток гепатомы человека Hep3B ($IC_{50}=0,4$ нМ в сравнении с $0,3$ нМ rhBMP6) и, таким образом, являются активными при молярном отношении Аг/мАт 1:1 или лучше. Антитела продемонстрировали хорошую селективность в отношении родственных белков из семейства BMP, в том числе BMP 2, 5 и 7, с 500-кратным или более окном. См. фиг. 1.

Мгновенные фармакокинетические и фармакодинамические профили антагонистических антител к BMP6 у крыс.

Первичное исследование фармакокинетики при введении однократной дозы на крысах линии Спрег-Дули выполняли для антител BMP6 5, 6 и 7 путем в/в инъекции через катетер в яремной вене при величине дозы 10 мг/кг массы тела. Сравнение зависимости полной концентрации антитела в сыворотке от времени (в частности, $t_{1/2}$, СВУ) для этих трех антител со стандартным профилем указывало на особенности, согласующиеся с типичным человеческим IgG (см. фиг. 2 и табл. 11). Не было никаких подтверждений мишень-опосредованного распределения лекарственного средства. При указанной дозе все антитела к BMP6 подавляли гепсидин в сыворотке до уровней ниже предела обнаружения в день 1 после инъекции. Длительную сильную супрессию экспрессии гепсидина все еще наблюдали в день 16, что указывало на длительное сохранение активности. Соответственно, транзитное пиковое повышение концентрации циркулирующего железа наблюдали в день 2 после инъекции антитела, при этом уровни оставались повышенными в день 16.

Концентрацию антитела в сыворотке измеряли во времени после однократной инъекции антитела. Образцы собирали через 1, 6 ч, 1, 2, 4, 8, 16, 28 дней после введения дозы (10 мг/кг, в/в).

Таблица 11

Основные параметры в первичном исследовании ФК с однократным введением дозы крысам

Параметры	АНТИТЕЛО 5	АНТИТЕЛО 6	АНТИТЕЛО 7
$T_{1/2}$ (дни)	9,1	7,8	9,2
C_{max} (мкг/мл)	140,7	189,0	146,2
Среднее время удержания (дни)	8,6	7,0	6,9

Также измеряли полную концентрацию антитела 7 (свободного и BMP6-связанного) в сыворотке крыс и яванских макаков после однократной в/в инъекции Антитела 7 (у крыс в дозах 10, 3, 1, 0,3, 0,1 и 0,03 мг/кг; у обезьян в дозе 3 мг/кг) в указанные моменты времени с помощью ELISA с НПКО 46 нг/мл (пунктирная линия) у крыс и НПКО 0,2 мкг/мл (пунктирная линия) у обезьян. Результаты показаны на фиг. 9 (крысы) и 12 (обезьяны).

Дозозависимый ответ показателей железа в сыворотке после лечения антителами к BMP6 у мышей и яванского макака.

Для дополнительного определения дозозависимого ответа метаболизма железа на лечение антителами к BMP6, наивным мышам C57BL/6 вводили возрастающие дозы антитела 6, в пределах от 0,02 до 0,5 мг/кг, как указано. Антитело 6 было выбрано в качестве репрезентативного из 3 антител, поскольку они имеют общий аналогичный каркас, профиль ФК у грызунов и активности *in vitro*. Однократная доза 0,5 или 0,1 мг/кг значительно подавляла гепсидин в сыворотке и соответственно увеличивала концентрацию железа в сыворотке через 2 дня после лечения. Однако только при дозе 0,5 мг/кг присутствовало сильное долговременное воздействие на метаболизм железа, наблюдаемое до 8 дней после инъекции. См. фиг. 3. Данные результаты дают основание предположить, что дозозависимая насыщаемая нейтрализация мишени может быть с легкостью достигнута при использовании мощных антагонистических антител к BMP6.

См. фиг. 3, дозозависимое действие антитела к BMP6 на сывороточные биомаркеры метаболизма железа; сверху: концентрация hIgG в сыворотке в динамике после однократной в/в инъекции антитела 6 в указанных дозах. Снизу: Левая панель представляет собой количественный анализ концентрации гепсидина в сыворотке после однократной инъекции антитела 6 или контрольного IgG человека, тогда как правая панель представляет собой концентрацию железа в сыворотке.

Подобные эксперименты проводили с антителом 7. Дозо- и времязависимую супрессию циркулирующего гепсидина в сыворотке под действием антитела 7 исследовали у самцов крыс линии Спрег-Дули. Образцы сыворотки собирали через 0,25, 1, 2, 6 ч и 1, 2, 4, 7 и 14 дней после введения однократ-

ной дозы антитела 7 в/в инъекцией в дозе от 0,03 до 10 мг/кг. Уровни гепсидина в сыворотке измеряли с помощью ЖХ/МС при НПКО=9 нг/мл. У тех же животных также измеряли уровни железа в сыворотке. Результаты представлены на фиг. 11.

Эти результаты указывают, что антитела против BMP6 согласно настоящему изобретению способны вызывать дозозависимое увеличение железа в сыворотке. Действие являлось стойким и сохранялись в течение по меньшей мере 2 недель после введения антитела.

Влияние на показатели железа в сыворотке в ответ на антитело против BMP6 также исследовали у яванского макака. Самцам яванского макака делали однократную внутривенную инъекцию антитела 7 в дозе 3 мг/кг. В указанные дни после инъекции образцы сыворотки собирали и исследовали на общее железо сыворотки (Fe) и концентрацию гепсидина. Результаты представлены на фиг. 13. Представлены данные 3 отдельных животных (нанесены на кривую в зависимости от исходных уровней до введения дозы). Средние значения указаны "х" линией. Увеличение железа сыворотки и супрессию гепсидина сыворотки наблюдали через 24 часа после введения антитела, при этом действие сохранялось (относительно уровней до введения дозы) до конца 28-дневного исследования. Эти результаты указывают, что антитела к BMP6 согласно изобретению мощно индуцируют экспрессию гепсидина и уменьшают концентрацию циркулирующего железа у не относящихся к человеку приматов.

Действие антител к BMP6 на показатели эритроцитов при вызванной воспалением ЭСП-резистентной анемии у мышей.

Эксперименты проводили с целью оценки терапевтической применимости антител против BMP6 в модели анемии при воспалении на мышах. См. фиг. 4. У мышей, обработанных антигеном *Brucella abortus* (BA), анемия развивалась через 6 дней. Анемичных животных обрабатывали антителом против BMP6 плюс рекомбинантным эритропоэтином (ЕРО), начатым через один день, и действие терапии антителом на развитие анемии отслеживали в день 13 относительно BA. Значения HGB и HCT уменьшались от начала лечения до дня 13, с резистентностью при лечении только ЕРО. Комбинированное лечение антителом BMP6 и ЕРО эффективно восстанавливало ответ на ЕРО и значительно повышало уровни HGB и HCT. Данное действие было связано с параллельной стимуляцией активности эритропоэтина, что отражалось в постоянном увеличении RETA, а также восстановлением содержания гемоглобина в ретикулоцитах, что предполагает коррекцию синтеза гемоглобина вследствие дефицита функционального железа в компартменте эритропоэза.

См. фиг. 4, терапевтическое лечение антителом к BMP6 в модели ЭСП-резистентной анемии при воспалении на мышах. Сверху: Экспериментальная схема модели BA-индуцированной ЭСП-резистентной анемии при воспалении. Снизу: показатели эритропоэза через 13 дней после обработки BA. HGB: гемоглобин; HCT: гематокрит; RETA: количество ретикулоцитов; RET-HE: эквивалентный гемоглобин ретикулоцитов.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ в сравнении с BA+EPO+hlgG1.

Пример 3. Клинический план тестирования антител к BMP6 на людях.

План клинического исследования: оценка терапии с применением антител или их антигенсвязывающих фрагментов, которые связывают человеческий BMP6.

У больных с терминальной стадией почечной недостаточности (ТСПН) вырабатывается малое, если вырабатывается вообще, количество эритропоэтина (ЕРО), при этом они обычно нуждаются в периодическом введении экзогенного ЕРО и внутривенных (в/в) инфузиях препаратов железа для обеспечения.

ЕРО-индуцированного синтеза Hgb. До одной трети больных на хроническом гемодиализе (HD) не отвечают в достаточной мере на ЕРО, что связано, прежде всего, с внутриклеточной секвестрацией железа. Гепсидин изначально выводится почками, однако его удаление при диализе недостаточно. Поэтому больные на хроническом HD имеют склонность к значимому повышению уровней гепсидина, которые блокируют мобилизацию железа для эритропоэза. Терапия в/в препаратами железа больше не эффективна или не рекомендуется, как только депо железа в организме достигает критического уровня (на который указывают высокие уровни ферритина в сыворотке). В текущих руководствах не рекомендуют давать препараты в/в железа анемичным пациентам на диализе с высокими уровнями ферритина, и поэтому такие больные могут получать еще более высокие дозы ЕРО со связанным потенциальным риском развития ЕРО-гипореактивной анемии (Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) Anemia Work Group 2012). ЕРО-гипореактивная анемия характеризуется значительно повышенным риском общей смертности, которая относится как к пациентам с анемией, так и с более высокой дозой ЕРО при гемодиализе (Kilpatrick et al. 2008, Lopez-Gomez et al. 2008, Fukuma et al. 2012), а также к пациентам на перитонеальном диализе (Suttorp et al. 2013). Выделенные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают человеческий BMP6 согласно настоящему описанию, могут быть эффективными у больных хронической болезнью почек с железодефицитной анемией, повышая уровни гемоглобина (Hgb) и одновременно уменьшая потребности во введении доз ЕРО и в/в препаратов железа. Более низкий индекс резистентности к ЕРО (отношение дозы ЕРО к уровню Hgb) коррелирует с более низким риском смертности.

Подводя итог вышесказанному, цель терапии с применением выделенных антител или их антигенсвязывающих фрагментов, которые связывают человеческий BMP6 согласно настоящему описанию, со-

стоит в том, чтобы мобилизовать секвестрированное железо, что может затем уменьшить потребности во введении доз ЕРО и препаратов железа и повысить уровни Hgb, что в сочетании, как ожидают, улучшит эффективность лечения пациента. Это - первое, проводимое у человека исследование с однократным введением дозы терапии с применением выделенных антител или их антигенсвязывающих фрагментов, которые связывают человеческий BMP6. Данное исследование позволит оценить безопасность, переносимость, фармакокинетику, фармакодинамику и эффективность в совокупности больных на хроническом гемодиализе. Цель данного исследования состоит в оценке, будет ли терапия с применением выделенных антител или их антигенсвязывающих фрагментов, которые связывают человеческий BMP6, гарантировать дальнейшее клиническое исследование при анемии, связанной с хронической болезнью почек.

Исследовательский план.

Схема исследования.

Это первое, проводимое у человека, двухстадийное, с однократным введением дозы, неподтверждающее исследование выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связывают человеческий BMP6, предназначенное для оценки безопасности, переносимости, ФК, ФД и эффективности в совокупности больных на хроническом гемодиализе. Часть 1 является впервые проводимым у человека, с однократным введением дозы, открытым исследованием с подбором дозы. Часть 2 является рандомизированным, двойным слепым, с контролем плацебо, исследованием с однократным введением дозы, в котором сравнивают два уровня дозы выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связывают человеческий BMP6.

Оценки безопасности будут включать объективные обследования, ЭКГ, основные показатели жизнедеятельности, стандартные клинические лабораторные анализы (гематологию, биохимию, индексы железа сыворотки), мониторинг нежелательных явлений и серьезных нежелательных явлений.

Часть 1.

Целями части 1 являются: (а) оценка безопасности однократного введения дозы, ФК, ФД и переносимости и (b) определение минимальной ФАД выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связывают человеческий BMP6, определяемой как самая низкая доза, тестируемая в части 1, которая приводит к увеличению Hgb (среднее изменение относительно исходного уровня ~0,5 г/дл) через 29 дней после введения дозы.

В течение части 1 будет произведено скрининговое посещение, где определяют соответствие пациента критериям включения в исследование (фиг. 6). Подходящих больных допускают в исследовательский центр и подвергают повторной оценке на соответствие критериям включения во время первого посещения до начала исследования. Все результаты оценки безопасности до начала исследования должны быть получены и рассмотрены до введения дозы.

На фиг. 6 представлен обзор схемы части 1 исследования. Больных просят прибыть в исследовательский центр в день 1, непосредственно после их обычного посещения с целью проведения диализа. Затем больные получают инфузию антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связывают человеческий BMP6 (точная доза будет зависеть от когорты). Если возможно, введение дозы предпочтительно должно происходить в день диализа, за два дня до следующего диализа (например, в пятницу или в субботу) и будет происходить после процедуры диализа в этот день. Однако, если это не возможно, то введение дозы может происходить в день диализа, не предшествующий двум дням до следующего диализа. После введения дозы, первых двух больных в части 1 переводят в стационар по меньшей мере на 48 часов для оценки безопасности и ФК/ФД. Больные возвратятся в исследовательский центр в дни 4 и 6 для оценки ФК/ФД, и затем еженедельно, в течение в общей сложности 29 дней для оценок ФК и в общей сложности 12 недель для оценки безопасности, с посещением в конце исследования приблизительно в день 85. Посещения в исследовании, включая все лабораторные исследования за исключением оценки ФК после диализа, должны происходить перед запланированным посещением пациента для проведения диализа.

Часть 1 будет начата с дозой, которая согласно прогнозу не должна быть фармакологически активной. Дозу будут корректировать для каждой последующей когорты в части 1 на основе медианного изменения Hgb в каждой когорте после введения однократной дозы выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связывают человеческий BMP6, а также уровня насыщения трансферрина (TSAT), как обсуждается в разделе статистических оценок и показано на фиг. 7. Цель данного дерева решений состоит в определении минимальной возможной дозы, которая вызывает мобилизацию железа (на что указывают уровни насыщения трансферрина (TSAT) >50%, наблюдаемые по меньшей мере у 4 больных в когорте из 6 больных через одну неделю после введения дозы) и повышение Hgb. Если железо мобилизуется, но Hgb не увеличивается по меньшей мере на 0,5 г/дл через 29 дней после введения дозы, то клинические данные будут проанализированы с целью оценки потенциальных искажающих факторов (например, потери крови вследствие избыточной веномии вне исследования). Применимые Исследователи и представитель(и) от Спонсора рассмотрят нежелательные явления в каждой когорте и оценят эти явления в контексте: (а) известных медицинских проблем, связанных с хронической почечной недостаточностью, и (b) результатов доклинического исследования токсикологии. Последующие когорты не будут получать дозы, пока Исследователи и Спонсор не укажут, что исследование мож-

но безопасно продолжить.

На фиг. 7 представлен алгоритм коррекции доз в части 1. Анализ крови, включая измерения Hgb, будет выполнен перед диализом. Начальная доза составит 0,01 мг/кг. В части 1 больных распределяют в одну максимум из 6 немаскированных когорт дозы, до 6 больных в каждой. Минимальная ФАД выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связывают человеческий ВМР6, как определено выше, будет группой наименьшей дозы, выбранной для части 2. Доза для каждой последующей когорты может быть увеличена или уменьшена, как показано на фиг. 7. Если наименьшая возможная доза (0,001 мг/кг) приведет к медианному увеличению $Hgb \geq 0,5$ г/дл, это будет минимальной ФАД, и более низкая доза, подобранная для части 2, и следующая наибольшая доза, оцениваемая в части 1, будет группой наибольшей дозы для части 2. Если наибольшая доза (0,1 мг/кг), оцениваемая в части 1, будет минимальной ФАД, в части 2 продолжат исследование только в 2 группах: плацебо и минимальная ФАД. Если дополнительные когорты дозы потребуются в части 1, эти когорты будут добавлены, как описано в настоящем изобретении.

Каждая когорта части 1 будет включать 6 больных. Первые 2 больных в первой когорте части 1 будут получать дозу с интервалом по меньшей мере 7 дней. Выбор времени введения последующих доз больных в когорте части 1 будет зависеть от возможностей с учетом графика работы соответствующего центра и обслуживающих ресурсов. Все больные части 1 будут наблюдаться в течение 12 недель после введения дозы.

Часть 2.

Целями части 2 являются: (а) оценка безопасности, ФК, ФД и переносимости и (б) определение эффективности на основе изменений Hgb в ответ на однократную дозу антитела, которое связывает человеческий ВМР6, в сравнении с плацебо. Часть 2 будет включать до трех групп: до двух групп дозы Ат и группу плацебо (фиг. 8). Две группы дозы Ат будут определены на основе данных, полученных в части 1. Часть 2 будет включать приблизительно 60 больных с рандомизацией 1:1:1 в три группы. Если в части 1 минимальная ФАД будет также наибольшей оцениваемой дозой (0,1 мг/кг), то часть 2 будет содержать только две группы: минимальная ФАД и плацебо. В данном случае 40 больных будут рандомизированы в две группы с отношением рандомизации 1:1. Объем выборки в части 2 может быть скорректирован на основе вариабельности изменения относительно уровня Hgb до начала исследования в части 1.

На фиг. 8 представлена схема исследования для части 2. В течение части 2 производят скрининговое посещение, где определяют соответствие больных критериям включения в исследование. Подходящие больные будут проходить повторную оценку согласно критериям включения во время первого посещения до начала исследования. Все результаты оценки безопасности до начала исследования должны быть получены и рассмотрены до введения дозы.

Больных просят прибыть в исследовательский центр в день 1, непосредственно после их обычного посещения с целью проведения диализа. Затем больные получают инфузию Ат или плацебо, как определено при рандомизации в группы. Если возможно, введение дозы предпочтительно должно происходить в день диализа за два дня до следующего диализа (например, в пятницу или в субботу) и будет происходить после процедуры диализа в этот день. Однако, если это не возможно, то введение дозы может происходить в день диализа, не предшествующий двум дням до следующего диализа. Больные возвратятся в исследовательский центр в дни 4 и 6, затем еженедельно для последующих обследований. Во время последующих посещений больные проходят стандартные оценки безопасности, и данные ФК также будут собирать 85 дней. Посещения в исследовании могут производиться после запланированного посещения больных с целью проведения диализа, чтобы соблюдать график диализа больных. Все больные, зарегистрированные в части 2, будут наблюдаться в течение 12 недель после введения дозы Ат (или плацебо).

Подбор дозы ЕРО (обе части).

Индивидуальные коррекции дозы ЕРО в ходе обеих частей будут осуществляться согласно протоколу стандартного лечения каждого диализного центра. Протоколы центра будут рассматриваться, как часть оценки центра и будут проверены на соответствие рекомендациям стандарта лечения (KDIGO Clinical Practice Guideline for Anemia in Chronic Kidney Disease Anemia Work Group 2012). Больные, которые достигают уровня $Hgb \geq 13$ г/дл в любое время в ходе исследования, могут получать терапевтическую венохимию, на усмотрение исследователя, в дополнение к рекомендациям центра по контролю значений Hgb выше целевых уровней.

Подбор доз внутривенных препаратов железа (обе части).

Больные, получающие насыщающие дозы в/в препаратов железа (100 мг/неделя), будут исключены из исследования. Больные, получающие еженедельные поддерживающие дозы в/в препаратов железа (<100 мг/неделя), могут быть включены в данное исследование. Еженедельная поддерживающая доза в/в препаратов железа будет сохранена в начале 1 недели введения дозы Ат.

Индексы железа будут проверять в течение первой недели после введения дозы Ат, при этом вынужденная терапия препаратами железа и поддерживающая терапия в/в препаратами железа будет соответствовать рекомендациям стандарта лечения согласно рабочему протоколу установки гемодиализа. Протоколы центра будут рассматриваться, как часть оценки центра и будут проверены на соответствие ре-

комендациям стандарта лечения (KDIGO Clinical Practice Guideline for Anemia in Chronic Kidney Disease Anemia Work Group 2012).

Обоснование схемы исследования.

Обоснование двухстадийной схемы исследования.

Обоснованием для присутствия двух частей в одной совокупности больных является необходимость определить минимальную ФАД безопасно и эффективно, с минимизацией числа больных и когорт, подвергнутых потенциально субтерапевтическим дозам. В части 2 оценивают эффективность минимальной ФАД и один уровень дозы выше минимальной ФАД (как определено в части 1), по сравнению с группой плацебо.

Часть 1 разработана для оценки безопасности однократной дозы, переносимости, ФК/ФД, а также минимальной ФАД Ат в открытом исследовании. Минимальная ФАД будет определяться на основе каждого медианного изменения Hgb в когорте дозы в течение 29 дней после введения дозы Ат. Обоснованием для определения критериев ФАД является то, что проявление клинически значимых ответов на ЕРО может потребовать до 4 недель после изменения дозы ЕРО. Если Ат мобилизует железо в целевой совокупности, то это может позволить текущей дозе ЕРО у больных оказывать более выраженный эритропоэтический эффект. 29 дней границы Hgb, перечисленные в критериях определения ФАД, основаны на клинически значимых и безопасных показателях увеличения Hgb в ответ на дозу ЕРО (~0,5 г/дл в течение 29 дней). Обоснованием для поиска минимальной ФАД, а не максимального эффекта является то, что чрезмерно выраженный ответ Hgb представляет риск для безопасности в данной совокупности больных, что отражается целевыми границами Hgb в текущих рекомендациях стандарта лечения (Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) Anemia Work Group 2012). Целями оценок безопасности и переносимости в части 1 являются: (а) определение сигналов по безопасности и (б) сообщение о решении произвести коррекцию дозы, что гарантирует то, что дозы, подобранные для части 2 (минимальная ФАД+1 более высокая доза), подходят для дальнейшей оценки безопасности и эффективности в сравнении с плацебо. Тогда как часть 1 имеет избыточную мощность для получения объективной оценки безопасности, группа плацебо и более крупные выборки в части 2 обеспечат объективную оценку безопасности при минимальной ФАД и одной более высокой дозе. В дополнение к безопасности, переносимости и ФК/ФД, часть 2 разработана для оценки эффективности в сравнении с плацебо в двойном слепом исследовании. Оценка эффективности будет основана, прежде всего, на Hgb с индексом резистентности к ЕРО ($ERI = \text{еженедельная скорректированная по весу доза ЕРО, деленная на Hgb}$) в качестве ключевого вторичного конечного показателя. Индекс ERI обеспечивает количественный показатель количества ЕРО, требуемого для достижения данного значения Hgb, и поэтому представляет клинически важную информацию в дополнение к одному Hgb.

Обоснование FIIH у больных на диализе.

Данное исследование, впервые проводимое у человека (FIIH) будет проводиться у больных на хроническом гемодиализе (HD), а не на здоровых добровольцах (HV). Оценку безопасности, переносимости и ответа ФК/ФД на Ат против человеческого BMP6 у HV вероятно не удастся перевести для больных на хроническом HD по нескольким причинам:

В отличие от HV, больные на хроническом HD с анемией, высоким ферритином сыворотки и низким TSAT хронически накапливают внутриклеточные депо железа. Поэтому безопасность, переносимость и фармакологическое действие, связанные с мобилизацией железа в ответ на низкие дозы Ат, наиболее правильно оценивать у больных на хроническом HD. У HV с нормальной почечной функцией, гепсидин (главным регулятором которого является BMP6) фильтруется почками и эффективно экскретируется с мочой, что приводит к низким циркулирующим уровням. Напротив, гепсидин при диализе фильтруется менее эффективно и временно, что приведет к более высоким циркулирующим уровням у больных на хроническом HD (Zaritsky et al. 2010). Кроме того, нормальные почки регулируют эндогенные уровни ЕРО в динамике, и изменение Hgb в ответ на Ат может не быть очевидным. Поэтому безопасность и переносимость, связанная с модуляцией гепсидина посредством пути BMP6 и действием Ат на Hgb, наиболее правильно оценивать у больных на хроническом HD.

Обоснование целевой совокупности больных.

Данное исследование разработано для оценки Ат против человеческого BMP6 в условиях ЕРО-гипореактивной железодефицитной анемии. Установленные клинические рекомендации (KDIGO Clinical Practice Guideline for Anemia in Chronic Kidney Disease Anemia Work Group 2012) определяют гипочувствительность к ЕРО как потребность в двух повышении дозы ЕРО, на 50% выше стабильной дозы, чтобы поддерживать стабильную концентрацию Hgb. Предложенные критерии включения разработаны для отбора стабильных больных на хроническом HD с анемией и клиническими индикаторами ограничения железа: увеличенный ферритин и низкий TSAT ($TSAT = \text{железо сыворотки/общая железосвязывающая способность}$; TSAT плотно согласуется с железом сыворотки). Кроме того, при коррекции доз ЕРО и в/в железа будут придерживаться строгого стандарта лечения, направленного на Hgb, TSAT и ферритин. Данная схема снижает риск превышения по требуемым мишеням Hgb, поскольку изменения показателей железа и гематологических показателей продолжат регулировать согласно стандарту лечения. Кроме того, больные, получающие насыщающие дозы в/в препаратов железа в течение 1 недели до начала ис-

следования, будут исключены. Больные, получающие поддерживающие в/в препараты железа, может быть включены (если соответствуют всем остальным критериям включения). Обоснованием для включения этих больных служит то, что текущий стандарт лечения в США предписывает, что Hgb и TSAT требуется поддерживать в узких границах, и поэтому полная отмена поддерживающей терапии препаратами железа в целях соответствия критериям включения по нижней границе TSAT привела бы к включению больных с риском TSAT ниже 25%, которые нуждаются в курсе в/в препаратов железа в насыщающих дозах согласно стандарту лечения. Однако больные, соответствующие критериям включения, на поддерживающих в/в препаратах железа, сохраняют свою еженедельную дозу в/в препаратов железа в начале недели введения дозы Ат и возобновят поддерживающую терапию в/в препаратами железа только тогда, когда это будет определено протоколом центра согласно стандарту лечения, на основе контролируемых индексов железа.

Обоснование дозы/схемы применения, продолжительности лечения.

Обоснование начальной дозы.

Максимальная рекомендуемая начальная доза (МРНД) была вычислена на основе уровня дозы, не приводящей к развитию явных нежелательных эффектов (NOAEL) в 13-недельных исследованиях токсикологии GLP (с 14 дозами), проводимых на крысах и яванских макаках. Животные получали еженедельно в/в болюсные дозы 0,1, 1, 10 и 100 мг/кг. Группы дозы 1 и 100 мг/кг (только) впоследствии наблюдали в течение 16 недель у крыс или 24 недели у яванских макаков после введения последней дозы выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связывают человеческий BMP6. МРНД оценивали сначала путем вычисления эквивалентной дозы для человека (HED) для NOAEL из этих исследований (0,1 мг/кг) - метод считается подходящим для лекарственных средств с молекулярной массой >100 кДа - и затем применяли фактор безопасности 10, чтобы учитывать различия между неклиническими видами и пациентами, такие как количество накопленного железа и потребность в эритропоэзе. Параметры ФК для неклинических видов были выведены из токсикокинетических (ТК) данных, собранных в ходе исследований токсикологии для регистрации статуса IND. Соответствующие параметры ФК у больных затем оценивали, используя аллометрическое масштабирование, и эти параметры использовали для прогнозирования концентрации свободного выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связывают человеческий BMP6, в зависимости от времени у больных для данной дозы. При сравнении данных ТК из исследований токсикологии с основанными на модели, ФК Ат у больных указывала, что доза в 10 раз ниже, чем NOAEL/HED, как прогнозировали, должна давать (минимум) 10-кратное превышение на основе концентрации Ат.

Максимальные уровни железа сыворотки, наблюдаемые в ответ на Ат в исследованиях на животных, могут приводить к недооценке прогнозируемого ответа уровней железа на Ат человека, поскольку больные на HD, которым назначили терапию в/в препаратами железа, вероятно, имеют более емкие депо железа в ткани, чем здоровые животные. Однако в отличие от здоровых, неанемичных животных, больные на HD, как ожидают, используют высвобождаемое железо сыворотки для эритропоэза; поэтому модели на животных могут приводить к переоценке длительности повышения уровней железа. Патология печени, наблюдаемая в 13-недельных исследованиях, не наблюдалась в 4-недельных исследованиях, что позволяет предположить, что токсичность была обусловлена кумулятивным воздействием железа в сыворотке, а не ответом на резкое высвобождение железа.

Чтобы учесть ожидаемые различия в накопленном железе между неклиническими видами и пациентами, МРНД также прогнозировали на основе анализа, основанного на моделировании концентраций железа сыворотки. Кумулятивное воздействие железа в сыворотке, которое приводило к токсическим явлениям, было представлено как площадь под кривой для железа (Fe AUC). В этом методе Fe AUC, вычисленную для дозы NOAEL (0,1 мг/кг), рассматривали как достаточно безопасную. Fe AUC при предполагаемой МРНД у больных затем вычисляли и сравнивали с Fe AUC в неклинических видах при NOAEL. Поскольку расчетное на основе модели воздействие железа сыворотки при МРНД у больных было в >10 раз меньше, чем при NOAEL в неклинических видах, уменьшение NOAEL/HED с фактором безопасности 10 считали достаточным для оценки МРНД. Предполагаемая МРНД, таким образом, составила 0,01 мг/кг.

Обоснование коррекции дозы.

Для данного исследования максимальная тестируемая доза (x_{max}) будет являться HED, соответствующей NOAEL в каждом из 2 исследований токсикологии для регистрации статуса IND: 0,1 мг/кг. Минимальная возможная тестируемая доза (x_{min}) является наименьшей технически возможной дозой на основе исследований совместимости: 0,001 мг/кг. МРНД (x₀) будет оцениваться согласно безопасности, TSAT и критериям Hgb (фиг. 7). Если доза x₀ приводит к медианному изменению Hgb <0,5 г/дл относительно уровня до введения дозы, выбор x₊ (фиг. 7) будет направлен линейной экстраполяцией по натуральной логарифмической шкале (в ожидании сигмоидального отношения дозы-эффекта) между x₀ и x_{max}. Предварительные дозы для данной эскалации дозы приведены выше. Такие предварительные дозы могут быть скорректированы на основе обзора данных при неформальном промежуточном анализе в каждой когорте. Данный подход применяют либо до определения минимальной ФАД, либо до достижения x_{max}. Если x_{max} приводит к медианному изменению Hgb <0,5 г/дл, будет оценена безопасность этой

дозы, и будет принято решение, следует ли уточнить протокол с включением дополнительных когорт с дозами, которые превышают x_{max} , согласно данным по безопасности, ФК и ФД. Если наибольшая доза, протестированная в части 1 приводит к медианному увеличению $Hgb < 0,5$ г/дл, не увеличивает TSAT выше 50%, и при этом данная доза ниже x_{max} , протокол может быть уточнен с включением дополнительных когорт.

Если x_0 вместо этого приводит к медианному изменению $Hgb \geq 0,5$ г/дл относительно уровня до введения дозы, доза для следующей когорты будет скорректирована до x_{min} . Если x_{min} также приводит к медианному изменению $Hgb \geq 0,5$ г/дл, то x_{min} будут считать минимальной ФАД, а x_{min} и x_0 будут оцениваться в части 2. Если x_{min} приводит к медианному изменению $Hgb < 0,5$ г/дл и $TSAT \leq 50\%$ (фиг. 7), дозы будут увеличены путем линейной экстраполяции в интервале (x_{min} , x_0) по натуральной логарифмической шкале, пока не будет определена минимальная ФАД или пока не будут оценены 6 доз (когорт). Предварительные дозы в интервале (x_{min} , x_0) приведены выше. Такие предварительные дозы могут быть скорректированы на основе обзора данных во время неформального промежуточного анализа в каждой когорте. Минимальная ФАД будет определена как наименьшая протестированная доза, который приводит к медианному изменению $Hgb \geq 0,5$ г/дл относительно уровня до введения дозы.

Ат будут вводить в виде в/в инфузии однократной дозы, чтобы гарантировать воздействие железа сыворотки (Fe AUC) ниже уровня, связанного с нежелательными явлениями в доклинических исследованиях токсикологии. Раствор Ат вливают сразу после процедуры гемодиализа в день 1, чтобы минимизировать потенциальное влияние диализа на ФК или биодоступность железа непосредственно после введения дозы. Дополнительные приблизительно 30 мин инфузии дозы после диализа (только в день введения дозы), как ожидают, не будет представлять значимого риска или дискомфорта для больных.

Обоснование выбора препарата сравнения.

Плацебо используется в качестве препарата сравнения в части 2, чтобы обеспечить объективную оценку клинических результатов.

Цель и выбор времени промежуточных анализов/адаптации схемы.

В части 1, после завершения оценки после введения дозы в неделю 4 в каждой когорте из 6 больных, неформальный промежуточный анализ будет проведен, чтобы принять решение о коррекции дозы для следующей когорты. Маркеры безопасности и ФД будут рассмотрены всеми членами группы коррекции дозы, включающей применимых Исследователей и представителя(ей) от Спонсора. Новые когорты будут включены, только если безопасность и переносимость подтверждены, и если условия ФД соблюдены, как описано на фиг. 7. В части 1 будет до 5 неформальных промежуточных анализов. Формальный промежуточный анализ запланирован после того, как все больные из последней когорты части 1 завершат оценку после введения дозы в неделю 4, чтобы оценить клинические эффекты исследуемых доз и потенциально инициировать дополнительные доклинические исследования, и могут сообщать в последующих клинических исследованиях данные по температуре тела, артериальном давлении, частоте пульса, результатам ЭКГ, биохимии крови, гематологическим индексам железа, индексу ЕРО резистентности, при этом будут включены нежелательные явления, зарегистрированные по день 29 в последней когорте, прошедшей часть 1.

Для части 2 будут выбраны минимальная ФАД и доза на один уровень выше, чем минимальная ФАД. Если наименьшая протестированная доза вызовет увеличение $Hgb \geq 0,5$ г/дл, для части 2 будут выбраны две наименьших протестированных дозы.

Риск и польза.

Предполагаемая польза для больных, участвующих в данном исследовании, может включать уменьшение потребности в ЕРО и в/в железе и повышение уровней Hgb во время лечения и в течение некоторого времени после лечения.

Риск для больных в данном исследовании будет минимизирован при соблюдении критериев включения и тщательном клиническом мониторинге всех больных (а также помещении в стационар первых двух больных в части 1) в течение первых 48 ч после введения Ат.

Потенциальные риски, связанные с мобилизацией железа, включают: (а) перераспределение железа в ткани и органы, такие как селезенку, печень, сердце, поджелудочную железу и гипофиз, и (б) немного увеличенную восприимчивость к бактериальной инфекции, особенно у больных с вживленными сосудистыми катетерами. Некоторые из критериев включения снижают риск осложнений. Увеличенные уровни функции печени в анализах могут быть отмечены в связи с перераспределением железа. Функцию печени будут отслеживать параллельно с показателями железа и гематологическими показателями. Превышение целевых показателей Hgb , соответствующих стандарту лечения, может привести к полицитемии. Может быть предпринят контроль Hgb , терапия ЕРО и терапия препаратами железа.

Больные на HD, которые получали терапию в/в препаратами железа, могут иметь более емкие депо железа в тканях, чем здоровые животные; поэтому максимальные уровни железа сыворотки, наблюдаемые у больных, получавших выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связывают человеческий ВМР6, могут превышать уровни, наблюдаемые в исследованиях на животных. Однако в отличие от здоровых животных, больные на HD, как ожидают, будут утилизировать высвобож-

даемое железо сыворотки для эритропоэза; поэтому модели на животных могут переоценивать длительность повышения уровней железа. Прогнозируемое на основе модели воздействие Ат (например, Стах, AUC) при МРНД, как ожидают, в 10 раз меньше, чем наблюдаемое при NOAEL в доклинических исследованиях. Это воздействие, как ожидают, не приведет к уровням воздействия железа сыворотки (AUC), связанным с повышенными трансаминазами печени и некрозом отдельных клеток в печени, наблюдаемыми в доклинических исследованиях. Эскалация дозы Ат до NOAEL произойдет после описанных оценок безопасности. Клинический опыт с пациентами, имеющими хроническое превышение железа, а также пациентами, которые получают парентеральное железо, вероятно не позволит прогнозировать эффекты, которые могут произойти в результате резких повышений внутриклеточного железа, вызванных Ат. Поэтому потенциальный риск Ат-индуцированной острой токсичности железа, вероятно, является низким. Острая токсичность железа может поражать сердце, печень и/или поджелудочную железу. Клинические проявления острой токсичности железа могут включать нарушения сердечной проводимости, повышение уровня трансаминаз печени и нарушение толерантности к глюкозе/гипергликемию. Тяжелая острая токсичность железа может также включать метаболический ацидоз, нарушения баланса электролитов и неврологические проявления. При развитии острой токсичности железа, больные могут быть подвергнуты экстренной железохелатирующей терапии, такой как дефероксамин в сочетании с гемодиализом. Максимум 134 мл (часть 1) и 172 мл (часть 2) крови планируется забирать в течение 115 дней у каждого пациента в исследовании. Дополнительные образцы для мониторинга каких-либо данных по безопасности могут быть забраны дополнительно к этому. Это не считается опасным для данной совокупности.

На настоящий момент никаких исследований репродуктивной токсичности с антителами к человеческому BMP6 не проводили. Потенциальное воздействие на мужские или женские репродуктивные органы оценивали при тщательном стандартном гистопатологическом исследовании яичников и яичек, а также вспомогательных репродуктивных органов в 13-недельном исследовании токсичности на яванских макаках. Никаких связанных с лечением эффектов не наблюдали. Мыши с нокаутом BMP6 демонстрировали задержку окостенения грудной кости и превышение железа (Meunard et al. 2009).

С хроническим гемодиализом связана значительная эмбриональная и материнская патология и смертность. В ретроспективном когортном исследовании, в котором сравнивали женщин на хроническом гемодиализе (267 рождений) с женщинами, которые подверглись пересадке почки (264 рождения), женщины на гемодиализе продемонстрировали более высокий процент случаев отслоения плаценты, переливания крови, гипотрофии новорожденных, внутриутробной гибели плода и смерти матерей (Saliem et al. 2015). Поэтому женщины с детородным потенциалом должны использовать очень эффективную контрацепцию, чтобы предотвратить беременность во время введения выделенного антитела или его антиген-связывающего фрагмента, которые связывают человеческий BMP6, и в течение 125 дней после введения последней дозы.

Выборка.

Выборка будет состоять из больных с терминальной стадией почечной недостаточности, которые требуют хронической гемодиализной терапии по меньшей мере два раза в неделю, и которые имеют клинический симптом функциональной железодефицитной анемии, определенной как анемия, в присутствии клинически достаточных депо железа, определяемых уровнями ферритина и насыщенности трансферрина. Часть 1 включает план оценки до 36 больных, первоначально в 6 когортах (6 больных/когорта). Если после 6 когорт не отмечены никакие воздействия на TSAT и Hgb, и нет никаких угроз безопасности (как определено применимыми Исследователями и представителем(ями) от Спонсора), могут быть включены до 2 дополнительных когорт по 6 больных (всего 48 больных в части 1). Часть 2 состоит максимум из 3 групп (2 уровня дозы, подобранные для дальнейшей оценки из части 1, и группа плацебо), с приблизительно до 20 больных в группе (всего 60 больных в части 2). Таким образом, запланировано включение в общей сложности приблизительно 96 больных (максимум до 108), из которых приблизительно 60 больных будут рандомизированы в части 2. Приблизительно 60 больных (12 в части 1, 48 в части 2), как ожидают, пройдут исследование полностью. Исследователь должен гарантировать, чтобы все больные, рассматриваемые для исследования, соответствовали следующим критериям включения. Никакие дополнительные критерии не должны применяться исследователем, чтобы выборка была репрезентативной для всех больных, соответствующих критериям включения.

Отбор больных должен быть выполнен с проверкой всех критериев включения при скрининге и первом посещении до начала лечения. Соответствующая запись (например, контрольная форма) о проверке критериев включения должна храниться с исходной документацией в исследовательском центре. Отклонение по какому-либо критерию отбора приводит к исключению больных из регистрации в исследовании.

Критерии включения (обе части).

Больные, имеющие право на включение в данное исследование, должны соответствовать всем следующим критериям.

1. Письменное информированное согласие должно быть получено до выполнения какой-либо оценки. Если согласие не может быть выражено в письменной форме, оно должно быть официально зарегистри-

рировано и засвидетельствовано, в идеальном случае при посредстве независимого доверенного свидетеля.

2. Возраст ≥ 18 лет на момент скрининга.
3. Зависимость от гемодиализа в течение по меньшей мере 2 месяцев до скрининга.
4. Проведение соответствующего гемодиализа по меньшей мере 2 раза в неделю при терминальной стадии почечной недостаточности; соответствующий определяется как $Kt/V \geq 1,2$ при последней ежесекундной оценке до скрининга.
5. Получение хронической терапии эритропоэтином (ЕРО), согласно протоколу лечения анемии диализного центра. Дозу ЕРО не повышали на 50% или более в течение 14 дней до начала исследования. Терапия ЕРО должна включать только препараты кратковременного действия (не дарбэпоэтин) и вводимые в/в (не п/к).
6. $Hgb \geq 8,5$, включая $Hgb \geq 8,5$ и $< 11,5$ г/дл, и не повышавшийся на $\geq 0,5$ г/дл относительно уровня до начала исследования в течение предшествующих 14 дней.
7. Ферритин 200-2000 нг/мл (включительно) в течение по меньшей мере 28 дней до начала исследования (может включать скрининг).
8. $TSAT \leq 30\%$, минимум однократно, в течение 90 дней до начала исследования, и $TSAT \leq 30\%$ на момент начала исследования.

Критерии исключения (обе части).

Больные, соответствующие любому из следующих критериев, не имеют права на включение в данное исследование. Исследователь не может делать никаких дополнительных исключений, чтобы гарантировать, что выборка будет репрезентативной для всех подходящих больных.

1. Применение других исследуемых препаратов в пределах 5 полупериодов выведения до включения в исследование, или пока ожидаемый фармакодинамический эффект не возвратится на исходный уровень, в зависимости от того, что дольше.

2. Случай гиперчувствительности к исследуемому лекарственному средству или к терапевтическим антителам.

3. Известный диагноз гемохроматоза.

4. Известное злокачественное новообразование костного мозга, лимфатическое злокачественное новообразование или миелодиспластический синдром.

5. Наличие в анамнезе диализа с тромбозом АВ-фистулы в течение 2 месяцев до скрининга или 2 или более случаев тромбоза АВ-фистулы в течение 6 месяцев до скрининга.

6. Тяжелое сопутствующее заболевание/дисфункция печени (балл по шкале Чайлда-Пью ≥ 6) или предыдущая пересадка печени 7.

Сердечная недостаточность (функционального класса III или IV Нью-Йоркской ассоциации кардиологов (NYHA)).

8. Желудочно-кишечное кровотечение, потребовавшее вмешательства, в течение 2 месяцев, прошедших после скрининга. Больные с инфекцией вируса гепатита С (HCV) могут быть включены, если удовлетворены все остальные критерии включения, связанные с функцией печени.

9. АЛТ, АСТ или билирубин $\geq 1,5 \times$ ВГН в течение 4 недель до начала исследования.

10. Неконтролируемая почечная остеодистрофия, определенная как интактный ПТГ ≥ 750 пг/мл на момент скрининга.

11. Факторы, предрасполагающие к повышенному риску серьезной инфекции, такой как вживленный сосудистый катетер (центральный венозный катетер или гемодиализный катетер), или активная инфекция, требующая антибиотикотерапии в любое время в течение 2 недель до скрининга.

12. Переливание крови в течение 4 недель до начала исследования.

13. Получение насыщающей дозы (100 мг/неделя) в/в препарата железа в течение 1 недели до начала исследования.

14. Наличие в анамнезе наркотической или алкогольной зависимости в течение 12 месяцев до введения дозы или подтверждения такой зависимости по результатам лабораторных исследований, проводимых во время скрининга.

15. Положительный результат теста на поверхностный антиген гепатита В.

16. Наличие в анамнезе иммунодефицитных заболеваний, включая положительный результат теста на ВИЧ (ELISA и Вестерн-блот).

17. Женщины с детородным потенциалом могут быть зарегистрированы в данном исследовании в случае использования высокоэффективной контрацепции в течение минимум 125 дней после введения дозы антитела или антигенсвязывающего фрагмента, которые связывают человеческий BMP6. Высокоэффективную контрацепцию определяют как одно из следующего: а. полное воздержание (если это соответствует предпочтительному и обычному образу жизни пациента; периодическое воздержание (например, календарный, овуляционный, симптотермальный, постовуляционный методы) и прерванный половой акт не являются приемлемыми методами контрацепции), б. Стерилизация мужчины/женщины, с. Применение оральных, инъекционных или имплантируемых гормональных методов контрацепции или

установка внутриматочной спирали (IUD) или внутриматочной системы (IUS), или другие формы гормональной контрацепции, которые обладают сопоставимой эффективностью (показатель неэффективности <1%), например, содержащее гормоны вагинальное кольцо или трансдермальная гормональная контрацепция.

Лечение.

Лечение в исследовании.

Исследуемой терапией в данном исследовании является антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые связывают человеческий ВМР6, например, полностью человеческое IgG1 антитело против ВМР6. Антитело предоставлено в жидком растворе. Стоковая концентрация будет разбавлена в центре в соответствии с вводимой дозой. Время инфузии будут поддерживать в когортах на относительно постоянном уровне, приблизительно 30 мин. Часть 1 будет открытым исследованием с введением однократной дозы, и часть 2 будет двойным слепым, с введением однократной дозы, со сравнением с соответствующим плацебо (контроль растворителем). Действующее вещество, Ат против человеческого ВМР6, и плацебо будут поставляться в виде жидкости во флаконах. Вспомогательные вещества в активном препарате и плацебо идентичны.

Группы лечения.

В части 1 больных распределяют в одну из до 6 когорт дозы, состоящих из 6 больных каждая. Часть 1 является открытым лечением. Начальная доза, максимальная доза и обоснование коррекции доз описаны выше. Предварительные дозы для части 1 приведены в табл. 12 (Hgb <0,5 г/дл при МРНД) и табл. 13 (Hgb ≥ 0,5 г/дл при МРНД).

Таблица 12

Уровни предварительных доз для части 1		
Для Hgb меньше 0,5 г/дл при уровне дозы МРНД	Предварительная доза	Увеличение относительно предыдущей дозы
1 (МРНД)	0,010 мг/кг	начальная доза
2	0,016 мг/кг	60%↑
3	0,025 мг/кг	60%↑
4	0,040 мг/кг	60%↑
5	0,063 мг/кг	60%↑
6 (NOAEL)	0,100 мг/кг	60%↑

Эта таблица предназначена в качестве примера коррекции дозы в части 1 исключительно в ознакомительных целях. Промежуточные или более высокие уровни дозы могут использоваться, при этом некоторые уровни дозы могут быть пропущены на основе оценки данных во время неформальных промежуточных анализов в каждой когорте. Фактические уровни дозы будут подтверждены в письменной форме корпорацией Novartis и представлены во все участвующие исследовательские центры перед лечением больных в новой когорте.

Таблица 13

Уровни предварительных доз для части 1		
Для Hgb больше или равного 0,5 г/дл при уровне дозы МРНД	Предварительная доза	Увеличение относительно предыдущей дозы
1 (МРНД)	0,0100 мг/кг	начальная доза
2	0,0010 мг/кг	90%↓
3	0,0016 мг/кг	60%↑
4	0,0025 мг/кг	60%↑
5	0,0040 мг/кг	60%↑
6	0,0063 мг/кг	60%↑

Эта таблица предназначена в качестве примера коррекции дозы в части 1 исключительно в ознакомительных целях. Промежуточные или более высокие уровни дозы могут использоваться, при этом некоторые уровни дозы могут быть пропущены на основе оценки данных во время неформальных промежуточных анализов в каждой когорте.

Лечения в исследовании определены следующим образом.

А: однократная доза плацебо.

В: однократная доза Ат против человеческого ВМР6 в минимальной ФАД, как определено в части 1.

С: однократная доза Ат против человеческого ВМР6 на один уровень дозы выше минимальной ФАД, как определено в части 1.

Сопутствующее лечение Все рецептурные лекарственные препараты, безрецептурные лекарственные препараты и значимые немедикаментозные терапии (включая физиотерапию и переливания крови), вводимые или принятые в течение периода, определенного в критериях включения, до начала исследова-

ния и во время исследования, должны быть зарегистрированы в разделах ИРК Сопутствующее лечение/Значимые немедикаментозные терапии. Записи о терапии должны содержать сведения относительно торговой марки, однократной дозы и единицы, частоты и пути введения, даты начала и прекращения и причины терапии.

Эффективность/фармакодинамика.

Оценки эффективности определены ниже. Образцы для оценок эффективности будут собраны в различные моменты времени. Гематологические лаборатории будут аттестованы. Индексы Hgb и Fe будут рассмотрены во время каждого межкогортного неформального промежуточного анализа в качестве части оценки коррекции дозы во время части 1 исследования. Если установленный первоначально график забора образцов считают неоптимальным для исследования отношения между железом и ФК, график забора образцов может быть изменен в последующих когортах в части 1.

Набор индексов железа.

Ат против человеческого BMP6, как ожидают, мобилизует Fe из депо тела, что приводит к изменениям показателей Fe сыворотки, включающих: Fe сыворотки, насыщение трансферрина (TSAT), способность связывания несвязанного Fe (UIBC), общая способность связывания Fe (TIBC), ферритин и содержание гемоглобина в ретикулоцитах (CHr). Указанные показатели будут измерены в сыворотке при использовании утвержденных анализов.

Безопасность оценки безопасности определены ниже.

Объективное обследование.

Полное объективное обследование будет включать осмотр общего внешнего вида, кожи, шеи (включая щитовидную железу), глаз, ушей, носа, горла, легких, сердца, живота, спины, лимфатических узлов, конечностей, флебологическое и неврологическое обследование. Если показано на основе сведений о перенесенных заболеваниях и/или симптомах, может быть выполнено обследование прямой кишки, внешних половых органов, груди и/или гинекологическое обследование.

Значимые результаты, которые присутствуют до начала исследования лекарственного средства, должны быть включены в скрининг релевантных сведений о перенесенных заболеваниях/текущих заболеваний в ИРК больных. Значимые результаты, полученные после начала исследования лекарственного средства, которые соответствуют определению нежелательного явления, должны быть зарегистрированы при скрининге нежелательных явлений в ИРК больных.

Основные показатели жизнедеятельности.

Температура тела.

Артериальное давление (АД).

Пульс, рост и вес.

Рост.

Масса тела.

Будет вычислен индекс массы тела (ИМТ) ($\text{масса тела (кг)} / [\text{рост (м)}]^2$).

Лабораторные исследования.

Клинически значимые отклонения результатов лабораторных исследований будут оценивать по критериям, определяющим нежелательное явление, и регистрировать в таком качестве, если критерии будут удовлетворены. Повторные оценки обязательны до нормализации результата(ов) или пока изменение не перестанет быть клинически значимым.

Гематология.

Будет измерен гемоглобин, гематокрит, количество эритроцитов, количество лейкоцитов с лейкоцитарной формулой и количество тромбоцитов. Будут проводить мониторинг индексов железа.

Клиническая химия.

Будут проводить мониторинг натрия, калия, креатинина, мочевины, хлорида, альбумина, кальция, щелочной фосфатазы, общего билирубина, ЛДГ, ГГТ, АСТ и АЛТ. Если концентрация общего билирубина в 1,5 раза превышает верхнюю границу нормы, необходимо дифференцировать прямо и непрямо реагирующий билирубин.

Электрокардиограмма (ЭКГ).

Интервал PR, удлинение QRS, частота сердечных сокращений, RR, QT, QTc. Для принятия клинических решений следует использовать коррекцию по формуле Фредериса (QTcF).

Беременность и оценки фертильности.

Тесты на беременность необходимы для всех больных женщин независимо от сообщаемого репродуктивного/менопаузального статуса.

Для данного исследования будут выполнять тесты сыворотки на беременность. В случае положительного результата пациент должен прекратить участие в исследовании.

В случае выполнения при скрининге и начале исследования, результат данного теста должен быть получен до того, как пациент может получить дозу.

Фармакокинетика.

Будут собраны образцы для анализа ФК. Данные ФК будут рассматривать во время каждого межкогортного неформального промежуточного анализа как часть оценки коррекции дозы во время части 1

исследования. Если график забора образцов первоначально считают неоптимальным или неподходящим для исследования профиля ФК, график забора образцов может быть изменен в последующих когортах. Количество заборов крови и общий собранный объем крови не будет превышать значений, указанных в протоколе.

Образцы для анализа ФК будут собраны и оценены у всех больных на всех уровнях дозы.

Концентрация свободного Ат против человеческого BMR6 будет определена при использовании анализа ELISA. Ожидаемый нижний предел количественного определения (НПКО) составляет 10 пг/мл.

Образцы не получавших лечения больных (в группе плацебо) не будут анализировать.

Концентрации свободного Ат против человеческого.

BMR6 будет выражены в мкг/мл. Все концентрации ниже НПКО или отсутствующие данные будут отмечены в таком качестве в списках данных по концентрации. Концентрации ниже НПКО будут обрабатываться как ноль в сводной статистике только в случае данных по концентрации. Их не будут учитывать при вычислении параметров ФК.

Образцы для анализа ФК, оставшиеся после определения свободного Ат против человеческого BMR6, могут использоваться для исследовательских оценок или других биоаналитических целей (например, перекрестной проверки между различными центрами, оценки стабильности).

Следующие фармакокинетические параметры будут определять (при возможности) с использованием бескомпарментного метода(ов) при помощи Phoenix WinNonlin (версии 6.2 или выше): C_{max}, t_{max}, AUC(0-t), (0-tlast) AUC, C_{max}/D и AUC/D на основе данных зависимости концентрации в сыворотке от времени. Линейное правило трапеций будет использоваться для вычисления AUC. Полупериод выведения в конечной фазе антитела или антигенсвязывающего фрагмента, которые связывают человеческий BMR6 (t_{1/2}), также при возможности будут оценивать на основе данных.

Другие оценки.

Иммуногенность.

Анализ ELISA будет использоваться для обнаружения антител против человеческого BMR6. Образцы ИГ, оставшиеся после анализа иммуногенности, могут использоваться для исследовательской оценки или других биоаналитических целей (например, перекрестной проверки между разными центрами).

Исследовательские оценки.

Биомаркеры объективно измеряют и оценивают индикаторы нормальных биологических процессов, патогенных процессов или фармакологических ответов на терапевтическое вмешательство (Biomarkers Definitions Working Group 2001).

Путь BMR6-гепсидин функционирует следующим образом: сигнализация BMR6 в гепатоцитах требуется для индуцированной экспрессии гепсидина, ингибирования абсорбции железа энтероцитами и экспорта железа макрофагами. BMR6-нейтрализующее антитело в качестве понижающей уровень гепсидина терапии должно быть эффективным у больных с железодефицитной анемией благодаря уменьшению потребности в ЕРО и увеличению числа больных, которые достигают целевого уровня Hgb.

На основе вышеописанного биологического процесса исследовательские оценки биомаркеров включают, без ограничения, гепсидин (измеренный с помощью ЖХ-МС).

Дополнительные исследовательские оценки могут исследовать потенциальные роли маркеров костной абсорбции, а также рассматривать воспаление как фактор, вносящий вклад в механизм действия.

Исследовательские цели являются следующими: оценить отношения между уровнями гепсидина и несколькими ключевыми показателями, такими как индексы железа и ERI; исследовать динамику между первичными и вторичными конечными показателями и исследовательскими биомаркерами параллельно; оценить фармакогенетику; оценить иммуногенность.

Образец(ы) будет собран в разный момент(ы) времени. Дополнительная информация о сборе образцов, нумерации, обработке и транспортировке будет представлена в руководстве центральной лаборатории.

ДНК.

Исследовательские работы по изучению ДНК запланированы как часть данного исследования с целью выявления генетических факторов, которые могут: (1) быть связаны с пациентами на хроническом гемодиализе с функциональной железодефицитной анемией, которые проходили лечение эритропоэтином, (2) прогнозировать ответ на лечение Ат против человеческого BMR6, или (3) прогнозировать генетическую предрасположенность к побочным эффектам.

Кроме того, недавние успехи в технологиях генотипирования сделали возможными полногеномные методы. Полногеномные методы также могут быть применены в ограниченной области настоящих исследований, как описано выше.

Растворимые биомаркеры.

Гепсидин будет определен количественно в плазме как потенциальный ФД/биомаркер.

Подробные описания анализов будут включены в отчеты по биоаналитическим данным.

Другие биомаркеры.

Безгипотезные платформы могут использоваться для исследования гетерогенности заболевания, механизма действия и/или для потенциальной идентификации маркеров стратификации. Образцы для

анализа иммуногенности (ИГ) будут собраны в различные моменты времени. Иммуногенность Ат против человеческого BMP6 будет оценена путем измерения антител, распознающих антитело против человеческого BMP6.

Использованные источники

- Fukuma S, Yamaguchi T, Hashimoto S et al (2012) Erythropoiesis-stimulating agent responsiveness and mortality in hemodialysis patients: results from a cohort study from the dialysis registry in Japan. *Am J Kidney Dis*; 59(1): стр. 108-16.
- Kilpatrick RD, Critchlow CW, Fishbane S et al (2008) Greater epoetin alfa responsiveness is associated with improved survival in hemodialysis patients. *Clin J Am Soc Nephrol*; 2008. 3(4):1077-83.
- Lopez-Gomez JM, Portoles JM, and Aljama P (2008), Factors that condition the response to erythropoietin in patients on hemodialysis and their relation to mortality. *Kidney Int Suppl*; (111):S75-81.
- Meynard D, Kautz L, Darnaud V et al (2009) Lack of the bone morphogenetic protein BMP6 induces massive iron overload. *Nat Genet*; 41(4):478-81.
- Saliem S, Patenaude V, Abenhaim HA (2015) Pregnancy outcomes among renal transplant recipients and patients with end-stage renal disease on dialysis. *J Perinat Med* (электронная публикация до выхода статьи в печать) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25719292>.
- Suttorp MM, Hoekstra T, Rotmans JI et al (2013) Erythropoiesis-stimulating agent resistance and mortality in hemodialysis and peritoneal dialysis patients. *BMC Nephrol*; 14(1):200.
- Zaritsky J, Young B, Gales B, et al (2010) Reduction of serum hepcidin by hemodialysis in pediatric and adult patients. *Clin J Am Soc Nephrol*; 5(6):1010-14.

Если не определено иное, технические и научные термины, используемые в настоящем описании, имеют такое же значение, под которым их обычно понимает специалист, знакомый с областью, к которой относится настоящее описание.

Если не указано иное, все способы, этапы, методики и манипуляции, которые не описаны подробно, могут быть выполнены и были выполнены по сути известным образом, как будет очевидно специалисту. Ссылка, например, снова сделана на стандартные руководства и общий уровень техники, указанный в настоящем документе, и на другие ссылки, цитируемые в них. Если не указано иное, каждая из ссылок, цитируемых в настоящем документе, полностью включена посредством отсылки.

Формула изобретения является неограничивающей и представлена ниже.

Хотя конкретные аспекты и формула изобретения были подробно раскрыты в настоящем документе, это было сделано в качестве примера, исключительно в целях иллюстрации и не должно ограничивать объем прилагаемой формулы изобретения или объем заявленных объектов о какой-либо соответствующей будущей заявке. В частности, авторами настоящего изобретения предусмотрено, что различные замены, изменения и модификации могут быть внесены в настоящее описание без отступления от объема и сущности описания, как определено формулой изобретения. Выбор исходной нуклеиновой кислоты, нужного клона или типа библиотеки, как полагают, является стандартным действием для среднего специалиста в данной области, обладающего знанием аспектов, описанных в настоящем документе. Другие аспекты, преимущества и модификации считаются включенными в объем следующей ниже формулы изобретения. Специалистам в данной области будет известно, или они будут способны установить при использовании не более чем стандартных экспериментов, множество эквивалентов конкретных аспектов изобретения, описанного в настоящем документе. Предполагается, что такие эквиваленты включены в следующую формулу изобретения. Уточнение заявленного объема в поданных позже соответствующих заявках может быть обусловлено ограничениями патентного законодательства в различных странах и не должно быть интерпретировано как отказ от заявленных объектов.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связывают человеческий BMP6 и включают:

- (a) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в SEQ ID NO: 69, 70 и 71 соответственно и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в SEQ ID NO: 79, 80 и 81 соответственно;
- (b) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в SEQ ID NO: 72, 73 и 74 соответственно и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в SEQ ID NO: 82, 83 и 84 соответственно;
- (c) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в SEQ ID NO: 29, 30 и 31 соответственно и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в SEQ ID NO: 39, 40 и 41 соответственно;
- (d) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в SEQ ID NO: 32, 33 и 34 соответственно и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в SEQ ID NO: 42, 43 и 44 соответственно;
- (e) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в SEQ ID NO: 49, 50 и 51 соответственно и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в SEQ ID NO: 59, 60 и 61 соответственно;
- (f) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в SEQ ID NO: 52, 53 и 54 соответственно и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в SEQ ID NO: 62, 63 и 64 соответственно;
- (g) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в SEQ ID NO: 9, 10 и 11 соответственно и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в SEQ ID NO: 19, 20 и 21 соответственно или
- (h) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в SEQ ID NO: 12, 13 и 14 соответственно и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в SEQ ID NO: 22, 23 и 24 соответственно.

2. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, включающие:

- (a) последовательность VH в SEQ ID NO: 75;
- (b) последовательность VH в SEQ ID NO: 35;
- (c) последовательность VH в SEQ ID NO: 55 или
- (d) последовательность VH в SEQ ID NO: 15.

3. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, включающие:

- (a) последовательность VL в SEQ ID NO: 85;
- (b) последовательность VL в SEQ ID NO: 45;
- (c) последовательность VL в SEQ ID NO: 65 или
- (d) последовательность VL в SEQ ID NO: 25.

4. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, включающие:

- (a) последовательность VH в SEQ ID NO: 75 и последовательность VL в SEQ ID NO: 85;
- (b) последовательность VH в SEQ ID NO: 35 и последовательность VL в SEQ ID NO: 45;
- (c) последовательность VH в SEQ ID NO: 55 и последовательность VL в SEQ ID NO: 65 или
- (d) последовательность VH в SEQ ID NO: 15 и последовательность VL в SEQ ID NO: 25.

5. Выделенное антитело по п.1, включающее:

- (a) последовательность тяжелой цепи в SEQ ID NO: 77;
- (b) последовательность тяжелой цепи в SEQ ID NO: 37;
- (c) последовательность тяжелой цепи в SEQ ID NO: 57 или
- (d) последовательность тяжелой цепи в SEQ ID NO: 17.

6. Выделенное антитело по п.1, включающее:

- (a) последовательность легкой цепи в SEQ ID NO: 87;
- (b) последовательность легкой цепи в SEQ ID NO: 47;
- (c) последовательность легкой цепи в SEQ ID NO: 67 или
- (d) последовательность легкой цепи в SEQ ID NO: 27.

7. Выделенное антитело по п.1, включающее:

- (a) последовательность тяжелой цепи в SEQ ID NO: 77 и последовательность легкой цепи в SEQ ID NO: 87;
- (b) последовательность тяжелой цепи в SEQ ID NO: 37 и последовательность легкой цепи в SEQ ID NO: 47;
- (c) последовательность тяжелой цепи в SEQ ID NO: 57 и последовательность легкой цепи в SEQ ID NO: 67 или
- (d) последовательность тяжелой цепи в SEQ ID NO: 17 и последовательность легкой цепи в SEQ ID NO: 27.

8. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-7, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывают человеческий BMP6 с $KD \leq 1$ нМ.

9. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-8, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент обладают по меньшей мере приблизительно в 100 раз большей аффинностью к человеческому BMP6, чем к человеческому BMP2, человеческому BMP5 или человеческому BMP7.

10. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-9, где выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент уменьшают BMP6-индуцированную экспрес-

сию гепсидина в линиях клеток печени или первичных человеческих клетках печени *in vitro*.

11. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-10, где выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент демонстрируют по меньшей мере приблизительно 50% снижение BMP6-индуцированной экспрессии гепсидина в линиях клеток печени или первичных человеческих клетках печени *in vitro*.

12. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-11, где выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент включают скаффолд, выбранный из IgM и IgG.

13. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-12, где выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент являются IgM и IgG, где IgG выбран из IgG1, IgG2 и IgG3 или IgG4.

14. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-13, где выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент выбраны из группы, состоящей из моноклонального антитела, химерного антитела, одноцепочечного антитела, Fab и scFv.

15. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-14, где выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент являются компонентом иммуноконъюгата.

16. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-15, которые обладают эффекторной функцией, измененной в результате мутации Fc-области.

17. Композиция для снижения активности BMP6 в клетке, включающая выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-16 и фармацевтически приемлемый носитель.

18. Композиция по п.17, включающая дополнительное терапевтическое средство, где дополнительное терапевтическое средство уменьшает активность BMP6.

19. Композиция по п.18, где дополнительным терапевтическим средством является миРНК или антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

20. Композиция по п.18, где терапевтическим средством является эритропоэз-стимулирующий препарат (ЭСП) или препарат железа.

21. Композиция по п.20, где терапевтическим средством является эритропоэз-стимулирующий препарат (ЭСП).

22. Выделенный полинуклеотид, включающий последовательность, кодирующую выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связывают человеческий BMP6, по любому из пп.1-16.

23. Выделенный полинуклеотид, включающий последовательность, кодирующую VH последовательность антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связывают человеческий BMP6, по любому из пп.1-16.

24. Выделенный полинуклеотид, включающий последовательность, кодирующую VL последовательность антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связывают человеческий BMP6, по любому из пп.1-16.

25. Выделенный полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь антитела или его антигенсвязывающего фрагмента к BMP6, включающий последовательность любой из:

- (a) последовательности тяжелой цепи в SEQ ID NO: 78;
- (b) последовательности VH в SEQ ID NO: 76;
- (c) последовательности тяжелой цепи в SEQ ID NO: 38;
- (d) последовательности VH в SEQ ID NO: 36;
- (e) последовательности тяжелой цепи в SEQ ID NO: 58;
- (f) последовательности VH в SEQ ID NO: 56;
- (g) последовательности тяжелой цепи в SEQ ID NO: 18;
- (h) последовательности VH в SEQ ID NO: 16.

26. Выделенный полинуклеотид, кодирующий легкую цепь антитела или его антигенсвязывающего фрагмента к BMP6, включающий последовательность любой из:

- (a) последовательности легкой цепи в SEQ ID NO: 88;
- (b) последовательности VL в SEQ ID NO: 86;
- (c) последовательности легкой цепи в SEQ ID NO: 48;
- (d) последовательности VL в SEQ ID NO: 46;
- (e) последовательности легкой цепи в SEQ ID NO: 68;
- (f) последовательности VL в SEQ ID NO: 66;
- (g) последовательности легкой цепи в SEQ ID NO: 28 или
- (h) последовательности VL в SEQ ID NO: 26.

27. Вектор для экспрессии полинуклеотида в клетке, включающий полинуклеотид по пп.22-26.

28. Клетка-хозяин, включающая вектор по п.27 или полинуклеотид по пп.22-26.

29. Клетка-хозяин по п.28, где клетка является клеткой яичника китайского хомячка (CHO).

30. Способ снижения активности BMP6 в клетке, включающий стадию контакта клетки с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп.1-16 или композицией по любому из пп.17-21.

31. Способ ингибирования BMP6 у пациента, включающий стадию введения пациенту терапевтиче-

ски эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-16 или композиции по любому из пп.17-21.

32. Способ по любому из пп.30, 31, где пациент страдает анемией.

33. Способ по п.32, где анемия является анемией при хроническом заболевании (АХЗ), анемией при хронической болезни почек (ХБП), анемией при раке, анемией при воспалении, эритропоэз-стимулирующий препарат (ЭСП) резистентной анемией, железодефицитной анемией или функциональной железодефицитной анемией.

34. Способ по любому из пп.30-33, где пациенту вводили или вводят эритропоэз-стимулирующий препарат (ЭСП).

35. Способ по п.34, где ЭСП является эритропоэтином (ЕРО).

36. Способ увеличения уровней железа в сыворотке, насыщения трансферрина (ТАСТ), содержания гемоглобина в ретикулоцитах (СНг), количества ретикулоцитов, количества эритроцитов, гемоглобина или гематокрита, включающий введение пациенту эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-16 или композиции по любому из пп.17-21.

37. Способ снижения активности или уровня гепсидина у пациента, включающий стадию введения пациенту антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-16 или композиции по любому из пп.17-21.

38. Способ по п.37, где активность или уровень гепсидина уменьшены по меньшей мере на 50%.

39. Способ лечения анемии у пациента, включающий стадию введения пациенту антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-16 или композиции по любому из пп.17-21.

40. Способ увеличения или поддержания уровня гемоглобина у пациента, включающий введение пациенту антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-16 или композиции по любому из пп.17-21.

41. Способ по п.40, где пациент страдает анемией.

42. Способ по п.39 или 41, где анемия является анемией, связанной с хроническим заболеванием.

43. Способ по п.42, где хроническим заболеванием является хроническая болезнь почек, рак или воспаление.

44. Способ по любому из пп.39 и 42, 43, где пациент проходил или проходит лечение эритропоэз-стимулирующим препаратом (ЭСП).

45. Способ по п.44, где ЭСП является эритропоэтином (ЕРО).

46. Способ по любому из пп.39 и 41-45, где анемия является ЕРО-гипореактивной анемией.

47. Способ по любому из пп.39 и 41-46, где анемия является железодефицитной анемией или функциональной железодефицитной анемией.

48. Способ по любому из пп.30-47, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в дозе в пределах от 0,001 до 0,1 мг/кг.

49. Способ по любому из пп.30-48, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят внутривенно или подкожно.

50. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-16 для увеличения или поддержания уровня гемоглобина у пациента.

51. Применение композиции по любому из пп.17-21 для увеличения или поддержания уровня гемоглобина у пациента.

52. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-16 для лечения пациента с анемией.

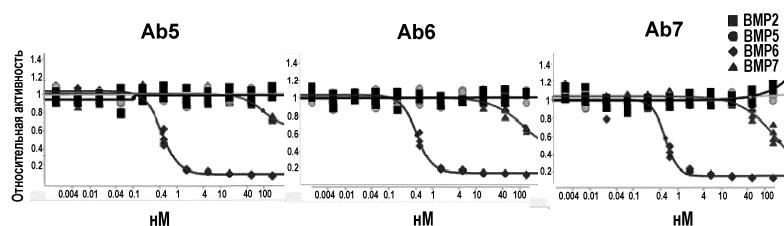
53. Применение композиции по любому из пп.17-21 для лечения пациента с анемией.

54. Применение по любому из пп.50-53, где анемия является анемией при хроническом заболевании или функциональной железодефицитной анемией.

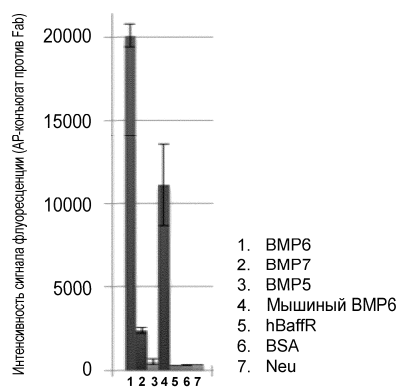
55. Применение по п.54, где хроническим заболеванием является хроническая болезнь почек, рак или воспаление.

56. Применение по любому из пп.50-53, где пациент проходил или проходит лечение эритропоэз-стимулирующим препаратом (ЭСП).

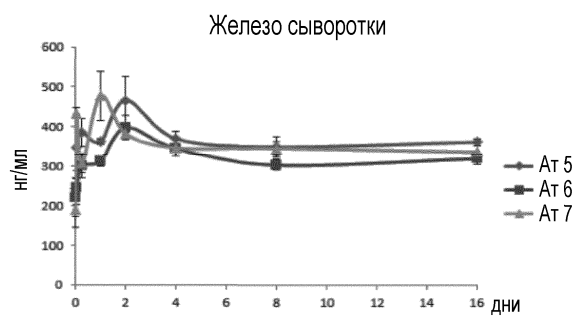
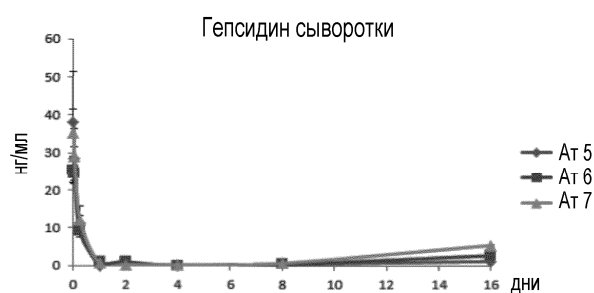
57. Применение по п.56, где ЭСП является эритропоэтином (ЕРО).



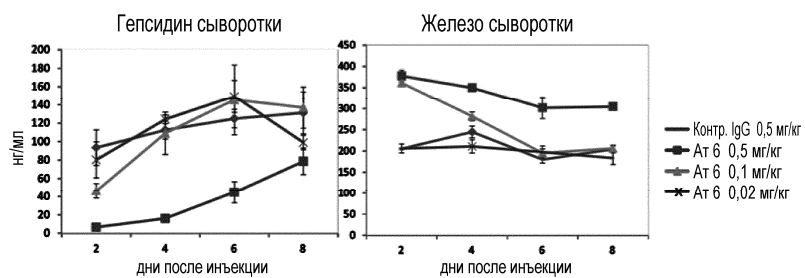
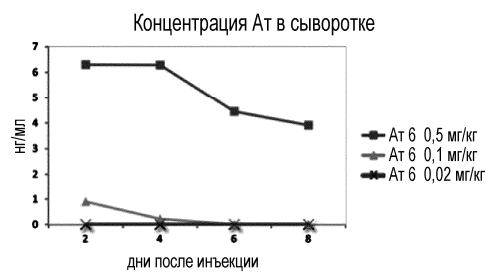
Фиг. 1А



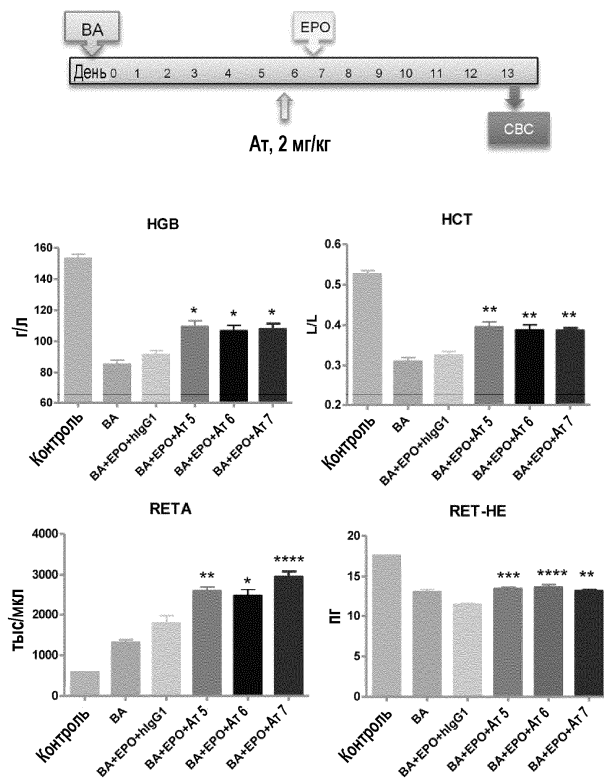
Фиг. 1В



Фиг. 2



Фиг. 3

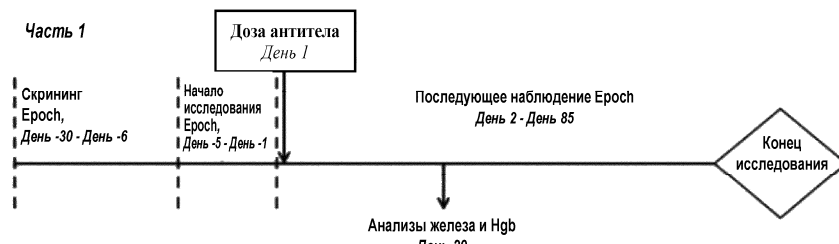


Фиг. 4

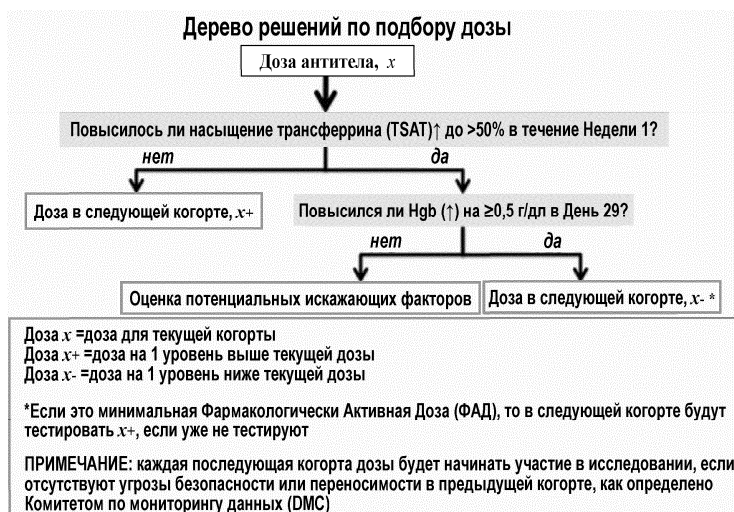
hBMP7-зрелое STGSKQRSSQNRSKTPKNQEARLMANVAENSSDQROACKKHLYVSFRDLGW
hBMP6-зрелое SASRRRQOSRNRSTQSQDVARVSSASDYNSSSEKPAACKKHLYVSFRDLGW
hBMP5-зрелое -AANKRKNQNRNKSSSHODSSRMS SVGDYNTSEQKQACKKHLYVSFRDLGW
1.....10.....20.....30.....40.....50.....
hBMP7-зрелое QDWI IAPEGYAAFYCEGECAFPLNSYMNATNHAI VQTLVHF I NPETVPKPC
hBMP6-зрелое QDWI IAPGYAANYCDGECSPFLNAHMNATNHAI VQTLVHLMNPEYVPKPC
hBMP5-зрелое QDWI IAPEGYAAFYCDGECSPFLNAHMNATNHAI VQTLVHLMFPHVVPKPC
.....60.....70.....80.....90.....100.....
hBMP7-зрелое APTQLNAISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH (SEQ ID NO: 90)
hBMP6-зрелое APTKLNAISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH (SEQ ID NO: 89)
hBMP5-зрелое APTKLNAISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRSCGCH (SEQ ID NO: 91)
.....110.....120.....130.....

Выделенные аминокислоты представляют идентичную последовательность в зрелых BMP5, 6 и 7
--- Выделенная рамкой область обозначает пептид BMP6, распознаваемый NOV0422 (исходный IgG) и Антителом 7

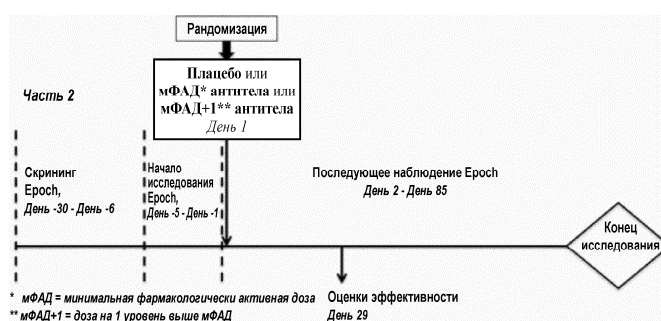
Фиг. 5



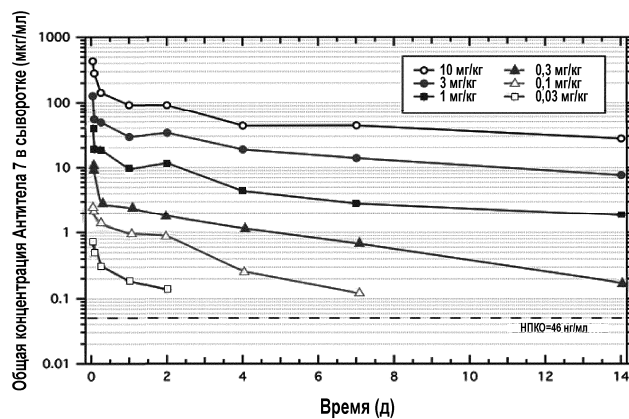
Фиг. 6



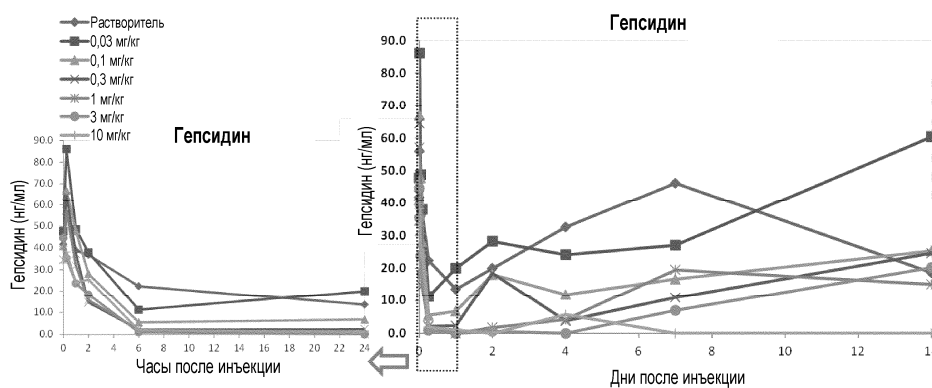
Фиг. 7



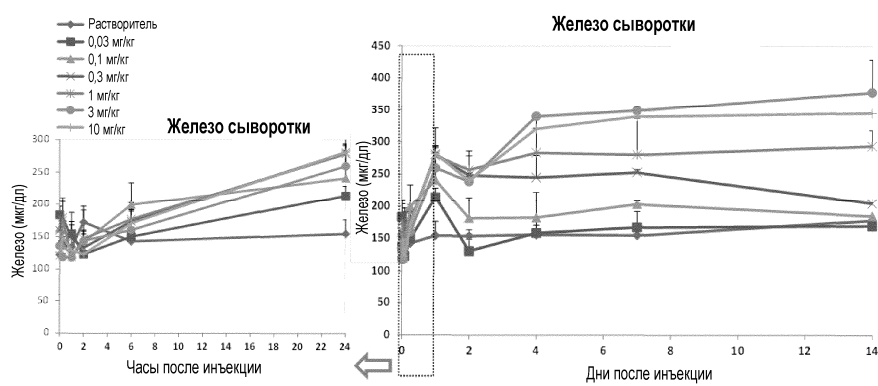
Фиг. 8



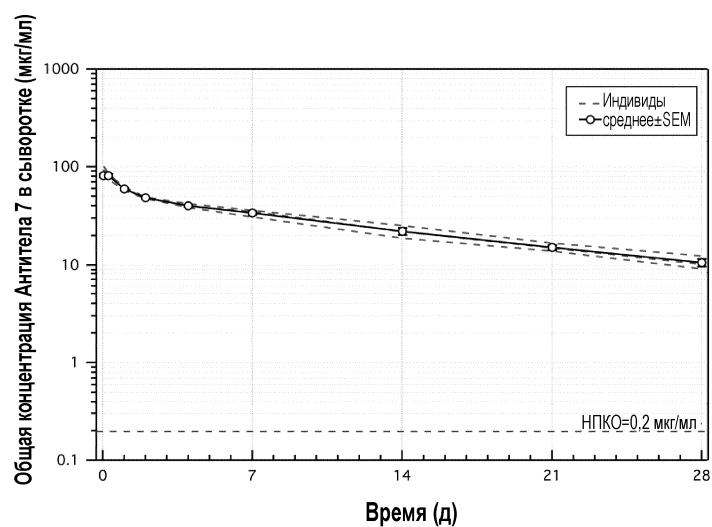
Фиг. 9



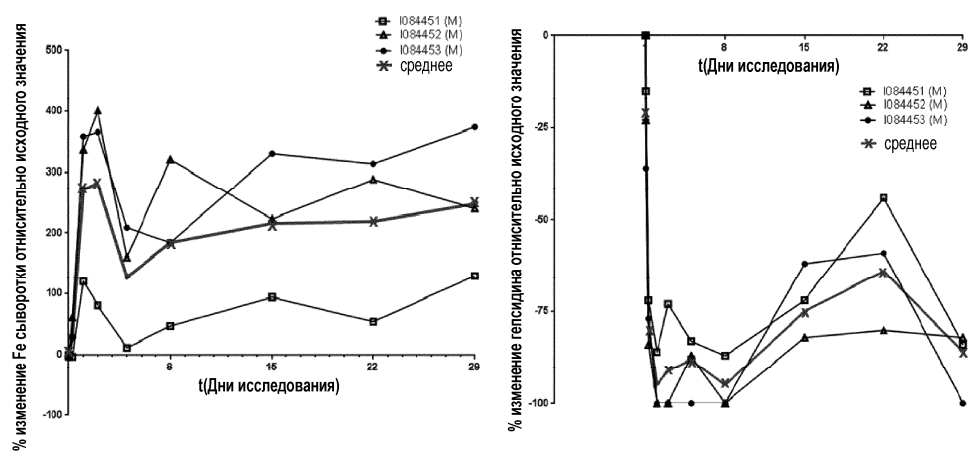
Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12



Фиг. 13

