



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.06.17

(21) Номер заявки
201792298

(22) Дата подачи заявки
2016.04.15

(51) Int. Cl. **C07K 16/22** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(54) СПОСОБЫ УВЕЛИЧЕНИЯ БЕЗЖИРОВОЙ МАССЫ ТЕЛА С ПОМОЩЬЮ АНТИТЕЛА К GDF8 ИЛИ ЕГО АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩЕГО ФРАГМЕНТА И ТРЕНИРОВОК С СОПРОТИВЛЕНИЕМ

(31) 62/147,853; 62/234,899; 62/261,528

(32) 2015.04.15; 2015.09.30; 2015.12.01

(33) US

(43) 2018.04.30

(86) PCT/US2016/027774

(87) WO 2016/168613 2016.10.20

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

(72) Изобретатель:
**Порди Роберт К., Цянь Сяобин,
Донахью Стивен (US)**

(74) Представитель:
**Угрюмов В.М., Карпенко О.Ю., Лыу
Т.Н., Дементьев В.Н., Глухарёва А.О.,
Строкова О.В., Христофоров А.А.
(RU)**

(56) WO-A1-2011150008
WO-A2-2004037861
WAGNER KATHRYN R. ET AL.: "A phase I/II trial of MYO-029 in adult subjects with muscular dystrophy", ANNALS OF NEUROLOGY, JOHN WILEY AND SONS, BOSTON, US, vol. 63, no. 5, 1 May 2008 (2008-05-01), pages 561-571, XP002514515, ISSN: 0364-5134, DOI: 10.1002/ANA.21338 abstract page 565, right-hand column, paragraph 3 page 569, left-hand column, paragraph 2
WO-A1-2010070094

LEBRASSEUR N.K. ET AL.: "Myostatin Inhibition Enhances the Effects of Exercise on Performance and Metabolic Outcomes in Aged Mice", JOURNALS OF GERONTOLOGY, SERIES A, BIOLOGICAL SCIENCES

ANDMEDICAL SCIENCES, vol. 64A, no. 9, 1 September 2009 (2009-09-01), pages 940-948, XP055280753, US ISSN: 1079-5006, DOI: 10.1093/gerona/glp068 abstract page 941, left-hand column, paragraph 2 - paragraph 3 page 942, right-hand column, paragraph 3 figure 1

WO-A2-2007047112

US-A1-2013336982

DESMOND PADHI ET AL.: "Pharmacological Inhibition of Myostatin and Changes in Lean Body Mass and Lower Extremity Muscle Size in Patients Receiving Androgen Deprivation Therapy for Prostate Cancer", JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM, vol. 99, no. 10, 1 October 2014 (2014-10-01), pages E1967-E1975, XP055281299, US ISSN: 0021-972X, DOI: 10.1210/jc.2014-1271 abstract page E1969, left-hand column, paragraph 3

MATTHEW SHARP ET AL.: "The effects of a myostatin inhibitor on lean body mass, strength, and power in resistance trained males", JOURNAL OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF SPORTS NUTRITION, BIOMED CENTRAL LTD, LO, vol. 11, no. Suppl 1, 1 December 2014 (2014-12-01), page P42, XP021205096, ISSN: 1550-2783, DOI: 10.1186/1550-2783-11-S1-P42 left-hand column, paragraph 3 - right-hand column, paragraph 2

ROSAMUND C. SMITH ET AL.: "Myostatin inhibitors as therapies for muscle wasting associated with cancer and other disorders", CURRENT OPINION IN SUPPORTIVE AND PALLIATIVE CARE, vol. 7, no. 4, 1 November 2013 (2013-11-01), pages 352-360, XP055254846, ISSN: 1751-4258, DOI: 10.1097/SPC.0000000000000013 the whole document

DAVID L. ALLEN ET AL.: "Expression and Function of Myostatin in Obesity, Diabetes, and Exercise Adaptation", MEDICINE AND SCIENCE IN SPORTS AND EXERCISE, vol. 43, no. 10, 1 October 2011 (2011-10-01), pages 1828-1835, XP055281304, US ISSN: 0195-9131, DOI: 10.1249/MSS.0b013e3182178bb4 the whole document

(57) Согласно раскрытию предусмотрены композиции, наборы и способы применения ингибитора GDF8 для увеличения безжировой массы тела, причем ингибитор GDF8 представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связывают GDF8. Согласно вариантам осуществления способ предусматривает обеспечение режима физических упражнений, включающий в себя тренировку с сопротивлением для субъекта и введение композиции, содержащей эффективное количество ингибитора GDF8.

Ссылка на родственные заявки

Настоящая заявка подана 15 апреля 2016 г. в виде международной патентной заявки согласно РСТ, и согласно настоящей заявке испрашивается приоритет в соответствии с предварительной заявкой на выдачу патента США № 62/147853, поданной 15 апреля 2015 г., предварительной заявкой на выдачу патента США № 62/234899, поданной 30 сентября 2015 г., и предварительной заявкой на выдачу патента США № 62/261528, поданной 1 декабря 2015 г., раскрытия которых полностью включены в настоящий документ.

Перечень последовательностей

Настоящая заявка включает в себя Перечень последовательностей в электронном формате в виде текстового файла с названием "40848-0055WOU1_SeqList-text", который создан 15 апреля 2016 г., и размер которого составляет 160 килобайт (KB). Содержание текстового файла "40848-0055WOU1_SeqList-text" включено в настоящий документ посредством ссылки.

Уровень техники

Снижение массы скелетных мышц, по-видимому, играет значительную патологическую роль в развитии широкого спектра нарушений, связанных со старением, слабостью и определенными метаболическими состояниями. У пожилых людей такие состояния, как саркопения, и такие конкретные явления, как перелом бедра, могут быть напрямую связаны со значительной потерей общей мышечной массы. Как в более пожилых, так и в более молодых группах населения восстановление после иммобилизации и ортопедических операций может быть связано с определенной степенью острой мышечной дистрофии, связанной как с отсутствием функциональной нагрузки на мышцы, так и атрофией, обусловленной процедурой. Кроме того, увеличение или поддержание массы скелетных мышц может привести к предотвращению ожирения, а также улучшениям в метаболизме.

Миостатин, или фактор роста и дифференцировки 8 (GDF8), представляет собой растворимый лиганд суперсемейства TGF- β . Он представляет собой отрицательный регулятор мышечного роста, экспрессируемый преимущественно в скелетных мышцах, но есть данные о низкой экспрессии в других тканях, таких как сердце и жировая ткань, на уровнях, приблизительно в 100 ниже, чем наблюдаемый в скелетных мышцах (McPherron Nature 387:83, 1997, Sharma J. Cell. Phys. 180:1, 1999, Lee Annrev. Cell Dev. Biol. 20:61, 2004, Allen Pysiol. Rev. 88:257, 2008, Heineke Cir. 121:419, 2010). Зрелый миостатин является высококонсервативным среди различных видов, и инактивирующие мутации гена миостатина приводят к избыточно мышечному фенотипу у многих видов, включая в себя мышей, крупный рогатый скот, собак и людей. Напротив, избыточная экспрессия миостатина у мышей (с помощью инъекции трансфицированных клеток CHO в бедро бестимусных мышей или получения трансгенных в отношении поперечнополосатых мышц мышей) вызывала значительное уменьшение массы тела вследствие снижения размера мышечных волокон (McPherron 1997, процитированная выше, Grobet Nat. Genet. 17:71, 1997, Mosher PLOS Genet. 3:e79, 2007, Schuelke NEJM 350:2682, 2004). Наряду с тем, что у мышей нулевой фенотип в отношении миостатина демонстрирует важность миостатина в контроле размера мышц во время развития, гипертрофию также можно вызывать в мышцах взрослых путем ингибирования миостатина нейтронизирующими антителами, рецепторами-ловушками или другими антагонистами. Тем не менее, эффекты ингибиторов миостатина на функционирующую сердечную ткань могут привести к нежелательному профилю побочных эффектов при использовании указанных ингибиторов для лечения таких состояний, как саркопения и метаболические состояния.

Способы увеличения силы и функциональности с помощью ингибиторов GDF8.

Согласно настоящему раскрытию предусмотрены способы и составы для применения в описанных в настоящем документе способах. Ингибиторы GDF8 являются применимыми для увеличения сухой мышечной массы у субъекта, например, в комбинации с физическими упражнениями. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект представляет собой субъекта, у которого отсутствует заболевание или нарушение, которое значительно ограничивает способность субъекта принимать участие в тренировках с сопротивлением. Согласно вариантам осуществления заболевание или нарушение представляет собой заболевание или нарушение, при котором врач порекомендовал ограничение физической нагрузки для субъекта или при котором физические упражнения противопоказаны, такое как неконтролируемый сахарный диабет, недавний инфаркт миокарда, нестабильные состояния сердца, острая сердечная недостаточность, тяжелый миокардит, неконтролируемая гипертензия, требующее операции заболевание клапанного аппарата сердца и тяжелый аортальный стеноз.

Согласно вариантам осуществления способ увеличения безжировой массы тела у субъекта предусматривает обеспечение режима физических упражнений для субъекта и введение композиции, содержащей эффективное количество ингибитора GDF8, причем эффективное количество составляет по меньшей мере 400 мг. Согласно вариантам осуществления режим физических упражнений включает в себя без ограничения тренировки с сопротивлением, тренировки с отягощениями, йогу, аэробные физические упражнения и пилатес. Согласно вариантам осуществления ингибитор GDF8 представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связывают GDF8. Согласно вариантам осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR тяжелой цепи, содержащиеся в пределах вариабельной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID

NO: 2, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 162, SEQ ID NO: 178, SEQ ID NO: 194, SEQ ID NO: 210, SEQ ID NO: 226, SEQ ID NO: 242, SEQ ID NO: 258, SEQ ID NO: 274, SEQ ID NO: 290, SEQ ID NO: 306, SEQ ID NO: 360 и SEQ ID NO: 376. Согласно вариантам осуществления способ дополнительно предусматривает антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые содержат CDR легкой цепи, содержащиеся в пределах переменных областей легкой цепи, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 154, SEQ ID NO: 170, SEQ ID NO: 186, SEQ ID NO: 202, SEQ ID NO: 218, SEQ ID NO: 234, SEQ ID NO: 250, SEQ ID NO: 266, SEQ ID NO: 282, SEQ ID NO: 298, SEQ ID NO: 314, SEQ ID NO: 322, SEQ ID NO: 368 и SEQ ID NO: 384.

Согласно вариантам осуществления композиции составлены так, чтобы содержать эффективное количество ингибитора GDF8 для увеличения сухой мышечной массы. Согласно вариантам осуществления эффективное количество составляет по меньшей мере 0,1 мг/кг - приблизительно 10 г/кг, 1 мг/кг - приблизительно 1 г/кг или 10-100 мг/кг. Согласно вариантам осуществления композицию вводят по меньшей мере один раз в неделю, два раза в неделю, три раза в неделю, четыре раза в неделю или пять раз в неделю. Согласно вариантам осуществления режим физических упражнений соблюдают в течение по меньшей мере 12 недель. Согласно вариантам осуществления композиции составлены для внутривенного, подкожного или перорального введения.

Краткое описание фигур

На фиг. 1(A) показаны результаты исследования MAD (многократных нарастающих доз), разработанного для оценки безопасности, переносимости, фармакокинетики (ПК), иммуногенности и фармакодинамических (PD) эффектов REGN1033 (антитела к GDF8), введенного подкожно (SC) здоровым волонтерам в возрасте 60 лет и старше. В общем изучали 5 когорт с 12 субъектами, набранными в каждую когорту. Субъекты получали SC дозы REGN1033 (n=9) или плацебо (n=14). Запланированные режимы введения доз REGN1033 представляли собой 100, 200 или 400 мг Q2W всего 6 доз на каждого субъекта и 200 мг или 400 мг Q4W всего 3 дозы на каждого субъекта. % безжировой массы тела определяли с использованием двуэнергетической рентгеновской абсорбциометрии (DEXA).

На фиг. 1(B) показано процентное изменение сухой мышечной массы на предусмотренный исследованием визит на группу у субъектов, получающих плацебо отдельно (третья линия сверху), плацебо вместе с тренировками с сопротивлением (RT) (нижняя линия), 400 мг SC REGN1033 отдельно всего 6 доз в течение периода исследования (вторая линия сверху) и 400 мг SC REGN1033 вместе с RT (верхняя линия) всего 6 доз в течение периода исследования.

На фиг. 2 показано процентное изменение аппендикулярной жировой массы на предусмотренный исследованием визит для каждой группы у субъектов, получающих плацебо отдельно (третья линия сверху), плацебо вместе с тренировками с сопротивлением (RT) (нижняя линия), 400 мг SC REGN1033 отдельно (вторая линия, начиная с верхней линии) всего 6 доз в течение периода исследования и 400 мг SC REGN1033 вместе с RT (верхняя линия) всего 6 доз в течение периода исследования. Линии для плацебо отдельно и 400 мг SC REGN1033 отдельно перекрываются.

На фиг. 3(A) показано процентное изменение массы мышц бедра, включая в себя внутримышечный жир, на предусмотренный исследованием визит на группу у субъектов, получающих плацебо отдельно (третья линия сверху), плацебо вместе с тренировками с сопротивлением (RT) (нижняя линия), 400 мг SC REGN1033 отдельно всего 6 доз в течение периода исследования (вторая линия сверху) и 400 мг SC REGN1033 вместе с RT (верхняя линия) всего 6 доз в течение периода исследования.

На фиг. 3(B) показано процентное изменение массы мышц бедра, исключая внутримышечный жир, на предусмотренный исследованием визит на группу у субъектов, получающих плацебо отдельно (третья линия сверху), плацебо вместе с тренировками с сопротивлением (RT) (нижняя линия), 400 мг SC REGN1033 отдельно всего 6 доз в течение периода исследования (вторая линия сверху) и 400 мг SC REGN1033 вместе с RT (верхняя линия) всего 6 доз в течение периода исследования. Линии для плацебо отдельно и плацебо вместе с RT перекрываются.

На фиг. 4 показано процентное изменение гиноидного жира на предусмотренный исследованием визит на группу у субъектов, получающих плацебо отдельно (верхняя линия), плацебо вместе с тренировками с сопротивлением (RT) (вторая линия сверху), 400 мг SC REGN1033 отдельно всего 6 доз в течение периода исследования (третья линия сверху) и 400 мг SC REGN1033 вместе с RT всего 6 доз в течение периода исследования (нижняя линия). Линии для плацебо вместе с RT и 400 мг SC REGN1033 отдельно перекрываются.

На фиг. 5 показано процентное изменение жима лежа на предусмотренный исследованием визит на группу у субъектов, получающих плацебо отдельно (нижняя линия), плацебо вместе с тренировками с сопротивлением (RT) (третья линия сверху), 400 мг SC REGN1033 отдельно всего 6 доз в течение периода исследования (вторая линия сверху) и 400 мг SC REGN1033 вместе с RT (верхняя линия) всего 6 доз в течение периода исследования.

Подробное раскрытие

Прежде чем описывать настоящие способы, следует понимать, что настоящее раскрытие не ограни-

чено конкретными описанными способами и экспериментальными условиями, поскольку такие способы и условия могут изменяться. Кроме того, следует понимать, что используемая в настоящем документе терминология предусмотрена исключительно с целью описания конкретных вариантов осуществления и не предусмотрено, что она является ограничивающей, поскольку объем настоящего изобретения будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

Используемые в настоящем описании изобретения и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают в себя ссылки на формы множественного числа, если контекст явно не диктует иное. Таким образом, например, ссылка на "способ" включает в себя один или несколько способов и/или стадий типа, описанного в настоящем документе и/или который станет очевидным специалистам в настоящей области техники при прочтении настоящего раскрытия.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют такие же значения, которые, как правило, понятны специалисту в настоящей области техники, к которой принадлежит настоящее изобретение.

Используемый в настоящем документе термин "приблизительно" при использовании со ссылкой на конкретное перечисленное числовое значение означает, что значение может варьировать от перечисленного значения не больше чем на 1%. Например, используемое в настоящем документе выражение "приблизительно 100" включает в себя 99 и 101 и все значения между ними (например, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4 и т.д.).

Несмотря на то, что любые способы и материалы, сходные или эквивалентные описанным в настоящем документе, можно использовать при осуществлении на практике настоящего изобретения или его испытании, ниже будут описаны предпочтительные способы и материалы. Все патенты, заявки и непатентные публикации, упомянутые в настоящем описании изобретения, полностью включены в настоящий документ посредством ссылки.

Определения.

"Фактор роста и дифференцировки - 8 человека", "GDF8" и "миостатин" используют взаимозаменяемо для обозначения белка, кодируемого последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 338, и белка, характеризующегося аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 339 (пропептид) и SEQ ID NO: 340 (зрелый белок).

Подразумевается, что используемый в настоящем документе термин "антитело" относится к молекулам иммуноглобулина, содержащим четыре полипептидные цепи, две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, связанные между собой с помощью дисульфидных связей, а также их мультимерам (например, IgM). Каждая тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи (сокращенно в настоящем документе обозначенную как HCVR, или V_H) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена, C_H1, C_H2 и C_H3. Каждая легкая цепь содержит переменную область легкой цепи (сокращенно в настоящем документе обозначенную как LCVR, или V_L) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один домен (C_L1). Области V_H и V_L можно дополнительно разделить на области гипервариабельности, которые называются определяющие комплементарности области (CDR), чередующиеся с областями, которые являются более консервативными, которые называются каркасные области (FR). Каждая V_H и V_L состоят из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбоксиконцу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Согласно различным вариантам осуществления настоящего изобретения FR антитела к GDF8 (или его антигенсвязывающей части) могут являться идентичными последовательностям зародышевой линии человека или могут являться природным образом или искусственно модифицированными. Аминокислотную консенсусную последовательность можно определить на основании анализа "бок-о-бок" двух или больше CDR.

Используемый в настоящем документе термин "антитело" также включает в себя антигенсвязывающие фрагменты целых молекул антител. Используемые в настоящем документе термины "антигенсвязывающая часть" антитела, "антигенсвязывающий фрагмент" антитела и подобное включают в себя любой встречающийся в природе, получаемый ферментативно, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, который специфически связывает антиген с образованием комплекса. Антигенсвязывающие фрагменты антитела можно получить, например, из целых молекул антител с использованием любых подходящих стандартных техник, таких как протеолитическое расщепление или рекомбинантные техники генной инженерии, включая в себя манипуляции и экспрессию ДНК, кодирующей переменные и необязательно константные домены антитела. Такая ДНК является известной и/или ее легко получить, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК (включая в себя, например, библиотеки фаг-антитела) или ее можно синтезировать. ДНК можно секвенировать и манипулировать химически или посредством использования техник молекулярной биологии, например, чтобы расположить один или несколько переменных и/или константных доменов в подходящей конфигурации или чтобы ввести кодоны, создать остатки цистеина, модифицировать, добавить или удалить аминокислоты и т.д.

Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают в себя: (i) фрагменты Fab; (ii) фрагменты F(ab')₂; (iii) фрагменты Fd; (iv) фрагменты Fv; (v) одноцепочечные молекулы Fv

(scFv); (vi) фрагменты dAb; и (vii) минимальные распознающие единицы, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гипервариабельную область антитела (например, выделенную определяющую комплементарность область (CDR)). Другие сконструированные молекулы, такие как диатела, триатела, тетратела и миниантитела, также включены в выражение "антигенсвязывающий фрагмент", используемый в настоящем документе.

Антигенсвязывающий фрагмент антитела, как правило, будет содержать по меньшей мере один вариабельный домен. Вариабельный домен может характеризоваться любым размером или аминокислотным составом и, как правило, будет содержать по меньшей мере одну CDR, расположенную смежно или в одной рамке считывания с одной или несколькими каркасными последовательностями. В антигенсвязывающих фрагментах, содержащих домен V_H , связанный с доменом V_L , домены V_H и V_L можно расположить друг относительно друга в любом подходящем порядке. Например, вариабельная область может являться димерной и содержать димеры V_H - V_H , V_H - V_L или V_L - V_L . Альтернативно антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный домен V_H или V_L .

Согласно определенным вариантам осуществления антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать по меньшей мере один вариабельный домен, ковалентно связанный по меньшей мере с одним константным доменом. Неограничивающие иллюстративные конфигурации вариабельных и константных доменов, которые можно обнаружить в пределах антигенсвязывающего фрагмента антитела согласно настоящему изобретению, включают в себя: (i) V_H - C_H1 ; (ii) V_H - C_H2 ; (iii) V_H - C_H3 ; (iv) V_H - C_H1 - C_H2 ; (v) V_H - C_H1 - C_H2 - C_H3 ; (vi) V_H - C_H2 - C_H3 ; (vii) V_H - C_L ; (viii) V_L - C_H1 ; (ix) V_L - C_H2 ; (x) V_L - C_H3 ; (xi) V_L - C_H1 - C_H2 ; (xii) V_L - C_H1 - C_H2 - C_H3 ; (xiii) V_L - C_H2 - C_H3 и (xiv) V_L - C_L . В любой конфигурации вариабельных и константных доменов, включая в себя любую из иллюстративных конфигураций, перечисленных выше, вариабельные и константные домены могут быть либо напрямую связаны друг с другом, либо могут быть связаны с помощью полноразмерной или частичной шарнирной или линкерной области. Шарнирная область может состоять по меньшей мере из 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или больше) аминокислот, которые дают в результате гибкое или полугибкое соединение между соседними вариабельными и/или константными доменами в отдельной полипептидной молекуле. Более того, антигенсвязывающий фрагмент антитела согласно настоящему изобретению может содержать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) любой из конфигураций вариабельных и константных доменов, перечисленных выше, в нековалентной ассоциации друг с другом и/или с одним или несколькими мономерными доменами V_H или V_L (например, с помощью дисульфидной(ых) связи(ей)).

Как и в случае целевых молекул антител, антигенсвязывающие фрагменты могут являться моноспецифическими или мультиспецифическими (например, биспецифическими). Мультиспецифический антигенсвязывающий фрагмент антитела, как правило, будет содержать по меньшей мере два различных вариабельных домена, причем каждый вариабельный домен способен специфически связываться с отдельным антигеном или с различным эпитопом на одном и том же антигене. Любой мультиспецифический формат антител, включая в себя иллюстративные раскрытые в настоящем документе биспецифические форматы антител, можно адаптировать для применения в контексте антигенсвязывающего фрагмента антитела согласно настоящему изобретению с использованием рутинных техник, доступных в настоящей области техники.

Антитела согласно настоящему изобретению могут функционировать посредством комплементзависимой цитотоксичности (CDC) или антителозависимой клеточно-обусловленной цитотоксичности (ADCC). "Комплементзависимая цитотоксичность" (CDC) относится к лизису экспрессирующих антиген клеток с помощью антитела согласно настоящему изобретению в присутствии комплемента. "Антителозависимая клеточно-обусловленная цитотоксичность" (ADCC) относится к клеточно-опосредованной реакции, при которой неспецифические цитотоксические клетки, которые экспрессируют Fc-рецепторы (FcR) (например, натуральные киллеры (NK-клетки), нейтрофилы и макрофаги), распознают связанное антитело на клетке-мишени и тем самым приводят к лизису клетки-мишени. CDC и ADCC можно измерить с использованием анализов, которые хорошо известны и доступны в настоящей области техники. (См., например, патенты США №№ 5500362 и 5821337 и Clynes et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 95:652-656 (1998)).

Термин "специфически связывает" или подобное означает, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент образует комплекс с антигеном, который является относительно стабильным при физиологических условиях. Специфическое связывание можно охарактеризовать с помощью константы диссоциации, составляющей 1×10^{-6} М или меньше. Способы определения, являются ли два молекулы специфически связанными, хорошо известны в настоящей области техники и включают в себя, например, равновесный диализ, поверхностный плазмонный резонанс и подобное. Например, антитело, которое "специфически связывает" GDF8 человека, как используют в контексте настоящего изобретения, включает в себя антитела, которые связывают GDF8 человека или его часть (например, пептид, содержащий по меньшей мере 6 смежных аминокислот SEQ ID NO: 340) с K_D , составляющей меньше чем приблизительно 1000 нМ, меньше чем приблизительно 500 нМ, меньше чем приблизительно 300 нМ, меньше чем приблизительно 200 нМ, меньше чем приблизительно 100 нМ, меньше чем приблизительно 90 нМ, меньше чем приблизительно 80 нМ, меньше чем приблизительно 70 нМ, меньше чем приблизительно 60 нМ,

меньше чем приблизительно 50 нМ, меньше чем приблизительно 40 нМ, меньше чем приблизительно 30 нМ, меньше чем приблизительно 20 нМ, меньше чем приблизительно 10 нМ, меньше чем приблизительно 5 нМ, меньше чем приблизительно 4 нМ, меньше чем приблизительно 3 нМ, меньше чем приблизительно 2 нМ, меньше чем приблизительно 1 нМ или меньше чем приблизительно 0,5 нМ, как измерено в анализе поверхностного плазмонного резонанса. (См., например, пример 3 в настоящем документе). Выделенное антитело, которое специфически связывает GDF8 человека, может, тем не менее, характеризоваться перекрестной реактивностью с другими антигенами, такими как молекулы GDF8 от других видов. Термин "высокоаффинное" антитело относится к тем антителам, которые способны связываться с GDF8 с константой диссоциации (K_D), составляющей приблизительно 10^{-8} М или меньше, приблизительно 10^{-9} М или меньше, приблизительно 10^{-10} М или меньше, приблизительно 10^{-11} М или меньше или приблизительно 10^{-12} М или меньше, как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например BIACORE™ или ELISA, для определения аффинности в растворе.

Под термином "медленная скорость диссоциации" или "Koff" подразумевают антитело, которое диссоциирует от GDF8 с константой скорости, составляющей $1 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$ или меньше, предпочтительно $1 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ или меньше согласно определению с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например BIACORE™.

Подразумевается, что "нейтрализующее" или "блокирующее" антитело относится к антителу, чье связывание с GDF8 приводит к ингибированию биологической активности GDF8. Это ингибирование биологической активности GDF8 можно оценить путем измерения одного или нескольких показателей биологической активности GDF8. Указанные показатели биологической активности GDF8 можно оценить с помощью одного или нескольких из определенных стандартных *in vitro* или *in vivo* анализов, известных в настоящей области техники.

Используемое в настоящем документе выражение "антитело к GDF8" также включает в себя мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы (например, биспецифические антитела), причем по меньшей мере один связывающий домен (например, "связывающее плечо") мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы специфически связывает GDF8.

Иллюстративные антитела к GDF8, которые можно использовать в контексте настоящего изобретения, включают в себя, например, полностью человеческое антитело к GDF8 H4H1657N2 (Regenon/Sanofi) (например, антитело к GDF8, содержащее вариabельные области тяжелой и легкой цепи с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 360 и SEQ ID NO: 368, соответственно, как представлено в патенте США № 8840894). Другие антагонисты GDF8, которые можно использовать в контексте способов согласно настоящему изобретению, включают в себя антитела к GDF8 (например, антитело, обозначенное 2_112_1 (обозначение в депозитарии ATCC PTA-6574)), как представлено в патенте США № 7807159, антитела к GDF8 (например, 12A5-5), как представлено в патенте США № 8999343 и патентной публикации США № 2013/0209489, антитела к GDF8 (например, 10B3H8L5 и 10B3H8L5-Fc-деактивированное), как представлено в патентной публикации США № 2013/0142788, антитело к GDF8 стабулумаб/MYO-29, как представлено, например, в патенте США № 8940874, антитела к GDF8 (например, RK22/PF-0625616), как представлено в патенте США № 8415459, антитела к GDF8 (например, JA-16), как представлено в патенте США № 7731961, антитела к GDF8 (например, RK35), как представлено в патенте США № 8496934, антитела к GDF8 (например, OGD1.0.0), как представлено в патенте США № 8992913, молекулы к Fab GDF8, как представлено в европейском патенте № 1773041 B1, антитела к GDF8 (например, 41C1E4), как представлено в патенте США № 7632499, и антитела к GDF8 (например, C12, C12-N93H и/или 510C2), как представлено, например, в патентах США №№ 7635760 и 8063188. Раскрытия всех вышеупомянутых патентов и публикаций патентных заявок полностью включены в настоящий документ посредством ссылки.

Раскрытые в настоящем документе полностью человеческие антитела к GDF8 могут содержать одну или несколько аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасных и/или CDR областях вариabельных доменов тяжелой и легкой цепей по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии. Такие мутации можно легко установить путем сравнения аминокислотных последовательностей, раскрытых в настоящем документе, с последовательностями зародышевой линии, доступными, например, из общедоступных баз данных последовательностей антител. Согласно настоящему изобретению предусмотрены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые происходят из любой из аминокислотных последовательностей, раскрытых в настоящем документе, причем одна или несколько аминокислот в пределах одной или нескольких каркасных и/или CDR областей подвергнуты обратной мутации до соответствующего(их) остатка(ов) зародышевой линии или до консервативной аминокислотной замены (встречающейся или не встречающейся в природе) соответствующего(их) остатка(ов) зародышевой линии (такие изменения в последовательности в настоящем документе называются "обратные мутации зародышевой линии"). Специалист в настоящей области техники, начиная с последовательностей вариabельной области тяжелой и легкой цепей, раскрытых в настоящем документе, может легко получить многочисленные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или несколько отдельных обратных мутаций зародышевой линии или их комбинации. Согласно

определенным вариантам осуществления все каркасные остатки и/или остатки CDR в пределах доменов V_H и/или V_L являются подвергнутыми обратной мутации до последовательности зародышевой линии. Согласно другим вариантам осуществления только определенные остатки являются подвергнутыми обратной мутации до последовательности зародышевой линии, например только мутированные остатки, встречающиеся в пределах первых 8 аминокислот FR1 или в пределах последних 8 аминокислот FR4, или только мутированные остатки, встречающиеся в пределах CDR1, CDR2 или CDR3. Более того, анти-тела согласно настоящему изобретению могут содержать любую комбинацию двух или больше обратных мутаций зародышевой линии в пределах каркасных и/или CDR областей, т.е. при этом определенные отдельные остатки являются подвергнутыми обратной мутации до последовательности зародышевой линии при сохранении определенных других остатков, которые отличаются от последовательности зародышевой линии. Получив антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или несколько обратных мутаций зародышевой линии, их можно легко проанализировать в отношении одного или нескольких требуемых свойств, таких как улучшенная специфичность связывания, увеличенная аффинность связывания, улучшенные или усиленные антагонистические или агонистические биологические свойства (в зависимости от конкретного случая), сниженная иммуногенность и т.д. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, полученные этим общим способом, предусмотрены настоящим изобретением.

Согласно настоящему изобретению также предусмотрены антитела к GDF8, содержащие варианты любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR, и/или CDR, раскрытых в настоящем документе, характеризующиеся одной или несколькими консервативными заменами. Например, согласно настоящему изобретению предусмотрены антитела к GDF8, содержащие аминокислотные последовательности HCVR, LCVR и/или CDR, например, с 10 или меньше, 8 или меньше, 6 или меньше, 4 или меньше и т.д. консервативных аминокислотных замен по отношению к любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, раскрытых в настоящем документе. Согласно одному варианту осуществления антитело содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 360 и 376 с 8 или меньше консервативными аминокислотными заменами. Согласно другому варианту осуществления антитело содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 360 и 376 с 6 или меньше консервативными аминокислотными заменами. Согласно другому варианту осуществления антитело содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 360 и 376 с 4 или меньше консервативными аминокислотными заменами. Согласно другому варианту осуществления антитело содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 360 и 376 с 2 или меньше консервативными аминокислотными заменами. Согласно одному варианту осуществления антитело содержит LCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 368 и 384 с 8 или меньше консервативными аминокислотными заменами. Согласно другому варианту осуществления антитело содержит LCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 368 и 384 с 6 или меньше консервативными аминокислотными заменами. Согласно другому варианту осуществления антитело содержит LCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 368 и 384 с 4 или меньше консервативными аминокислотными заменами. Согласно другому варианту осуществления антитело содержит LCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 368 и 384 с 2 или меньше консервативными аминокислотными заменами.

Согласно определенным вариантам осуществления антитело или фрагмент антитела согласно настоящему изобретению можно конъюгировать с терапевтическим фрагментом ("иммуноконъюгат"), таким как цитотоксин, химиотерапевтическое лекарственное средство и иммунодепрессант или радиоактивный изотоп.

Используемый в настоящем документе термин "выделенное антитело" означает антитело, которое было идентифицировано и отделено и/или извлечено по меньшей мере из одного компонента его природного окружения. Например, антитело, которое было отделено или удалено по меньшей мере из одного компонента организма, ткани или клетки, в котором антитело существует в природе или естественно производится, представляет собой "выделенное антитело" для целей настоящего изобретения. Выделенное антитело также включает в себя антитело *in situ* в пределах рекомбинантной клетки, а также антитело, которое было подвергнуто по меньшей мере одной стадии очистки или выделения. Согласно определенным вариантам осуществления выделенное антитело может, по существу, не содержать другой клеточный материал и/или химические соединения.

Используемый в настоящем документе термин "поверхностный плазмонный резонанс" относится к оптическому явлению, которое позволяет провести анализ биоспецифических взаимодействий в режиме реального времени путем обнаружения изменений в концентрациях белка в пределах биосенсорной матрицы, например, с использованием системы BIACORE™ (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden и Piscataway, N.J.).

Подразумевается, что используемый в настоящем документе термин " K_D " относится к равновесной константе диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген.

Термин "эпитоп" включает в себя любую детерминанту, предпочтительно полипептидную детерминанту, способную к специфическому связыванию с иммуноглобулином или Т-клеточным рецептором. Согласно определенным вариантам осуществления детерминанты эпитопа включают в себя химически активные поверхностные группировки молекул, такие как аминокислоты, боковые цепи сахаров, фосфорильные группы или сульфонильные группы, и согласно определенным вариантам осуществления могут характеризоваться конкретными трехмерными структурными характеристиками и/или конкретными характеристиками заряда. Эпитоп представляет собой область антигена, которая связывается антителом. Согласно определенным вариантам осуществления можно говорить, что антитело специфически связывает антиген, если оно преимущественно распознает свой целевой антиген в сложной смеси белков и/или макромолекул. Например, можно говорить, что антитело специфически связывает антиген, если K_D составляет меньше чем или равно 10^{-8} М, меньше чем или равно 10^{-9} М или меньше чем или равно 10^{-10} М.

Белок или полипептид является "по существу, чистым", "по существу, гомогенным" или "по существу, очищенным", если по меньшей мере приблизительно 60-75% образца проявляет один вид полипептида. Полипептид или белок может являться мономерным или мультимерным. По существу, чистый полипептид или белок будет, как правило, содержать приблизительно 50, 60, 70, 80 или 90% мас./мас. образца белка, как правило, будет являться приблизительно на 95% и предпочтительно свыше 99% чистым. Чистоту и гомогенность белка можно установить с помощью ряда способов, хорошо известных в настоящей области техники, таких как электрофорез образца белка в полиакриламидном геле с последующей визуализацией отдельной полосы полипептида при окрашивании геля с помощью красителя, хорошо известного в настоящей области техники. Для определенных целей более высокое разрешение можно обеспечить с использованием ВЭЖХ или других средств, хорошо известных в настоящей области техники для очистки.

Используемый в настоящем документе термин "полипептидный аналог или вариант" относится к полипептиду, который состоит из сегмента, составляющего по меньшей мере 25 аминокислот, который характеризуется значительной идентичностью относительно части аминокислотной последовательности и который характеризуется по меньшей мере одним из следующих свойств: (1) специфическое связывание с GDF8 при подходящих условиях связывания или (2) способность блокировать биологическую активность GDF8. Как правило, полипептидные аналоги или варианты содержат консервативную аминокислотную замену (или вставку, или делецию) по отношению к встречающейся в природе последовательности. Аналоги, как правило, составляют в длину по меньшей мере 20 аминокислот, по меньшей мере 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150 или 200 аминокислот или длиннее, и зачастую могут быть такой же длины, как и полноразмерный встречающийся в природе полипептид.

Предпочтительные аминокислотные замены представляют собой те, которые: (1) снижают подверженность протеолизу, (2) снижают подверженность окислению, (3) изменяют аффинность связывания для формирующихся белковых комплексов, (4) изменяют аффинности связывания и (4) придают или модифицируют другие физико-химические или функциональные свойства таких аналогов. Аналоги могут включать в себя различные мутации последовательности, отличные от встречающейся в природе пептидной последовательности. Например, одиночные или многочисленные аминокислотные замены (предпочтительно консервативные аминокислотные замены) можно произвести во встречающейся в природе последовательности (предпочтительно в части полипептида за пределами домена(ов), формирующего(их) межмолекулярные контакты). Консервативная аминокислотная замена не должна существенно изменять структурные характеристики исходной последовательности (например, замещающая аминокислота не должна стремиться разрушать спираль, которая возникает в исходной последовательности, или нарушать другие типы вторичной структуры, которая характеризует исходную последовательность). Примеры принятых в данной области техники вторичных и третичных структур полипептидов описаны в *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton 1984 W.H. Freeman and Company, New York; *Introduction to Protein Structure* (Branden & Tooze, eds., 1991, Garland Publishing, NY); и Thornton et al. 1991 *Nature* 354:105, которые включены в настоящий документ посредством ссылки.

Непептидные аналоги широко используют в фармацевтической промышленности в качестве лекарственных средств со свойствами, аналогичными свойствам матричного пептида. Указанные типы непептидного соединения называются "миметики пептидов" или "пептидомиметики" (см., например, Fauchere (1986) *J. Adv. Drug Res.* 15:29; и Evans et al. (1987) *J. Med. Chem.* 30:1229, которые включены в настоящий документ посредством ссылки. Систематическую замену одной или нескольких аминокислот консенсусной последовательности с помощью D-аминокислоты того же типа (например, D-лизин вместо L-лизина) также можно использовать для создания более стабильных пептидов. Кроме того, пептиды с ограниченной конформационной свободой, содержащие консенсусную последовательность или, по существу, идентичный вариант консенсусной последовательности, можно получить с помощью способов, известных в настоящей области техники (Rizo et al. (1992) *Ann. Rev. Biochem.* 61:387, включенная в настоящий документ посредством ссылки), например, путем добавления внутренних цистеиновых остатков, способных формировать внутримолекулярные дисульфидные мостики, которые циклизируют пептид.

Применительно к полипептидам термин "значительная идентичность" или "по существу, идентич-

ные" означает, что две пептидные последовательности при оптимальном выравнивании, например, с помощью программ GAP или BESTFIT с использованием штрафов за открытие делеции по умолчанию, характеризуются по меньшей мере приблизительно 80% идентичностью последовательности, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 98% или по меньшей мере приблизительно 99% идентичностью последовательности. Предпочтительно положения остатков, которые не являются идентичными, отличаются консервативными аминокислотными заменами. "Консервативная аминокислотная замена" представляет собой такую, в которой аминокислотный остаток замещен другим аминокислотным остатком, содержащим боковую цепь (группу R) со сходными химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). В общем, консервативная аминокислотная замена не будет существенно изменять функциональные свойства белка. В случае, когда две или больше аминокислотные последовательности отличаются друг от друга консервативными заменами, идентичность последовательности в процентах или степень сходства можно отрегулировать в сторону повышения, чтобы сделать поправку на консервативную природу замены. Способы осуществления указанного регулирования хорошо известны специалистам в настоящей области техники. См., например, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24:307-331, включенную в настоящий документ посредством ссылки. Примеры групп аминокислот, которые содержат боковые цепи со сходными химическими свойствами, включают в себя 1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; 2) алифатическигидроксильные боковые цепи: серин и треонин; 3) амидсодержащие боковые цепи: аспарагин и глутамин; 4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; 5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; и 6) серосодержащие боковые цепи представляют собой цистеин и метионин. Предпочтительные группы консервативных аминокислотных замен представляют собой валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин. Альтернативно, консервативное замещение представляет собой любое изменение, характеризующееся положительным значением в матрице логарифмического правдоподобия PAM250, раскрытой в Gonnet et al. (1992) *Science* 256:1443-45, включенной в настоящий документ посредством ссылки. "Умеренно консервативное" замещение представляет собой любое изменение, характеризующееся неотрицательным значением в матрице логарифмического правдоподобия PAM250.

Сходство последовательностей для полипептидов, которое также имеет название "идентичность последовательностей", как правило, измеряют с использованием программного обеспечения для анализа последовательностей. Программное обеспечение для анализа белков определяет совпадение сходных последовательностей с использованием мер сходства, присвоенных различным заменам, делециям и другим модификациям, включая в себя консервативные аминокислотные замены. Например, GCG содержит такие программы, как "Gap" и "Bestfit", которые можно использовать с параметрами по умолчанию для определения гомологии последовательностей или идентичности последовательностей между близкородственными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды от различных видов организмов или между белком дикого типа и его мутантом. См., например, GCG версию 6.1. Полипептидные последовательности также можно сравнить с использованием FASTA с использованием параметров по умолчанию или рекомендуемых параметров, программы в GCG версии 6.1. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) обеспечивает выравнивание и процентную идентичность последовательностей областей лучшего совпадения между последовательностями запроса и поиска (Pearson (2000), ранее). Другой предпочтительный алгоритм при сравнении последовательности согласно настоящему изобретению с базой данных, содержащей большое количество последовательностей от различных организмов, представляет собой компьютерную программу BLAST, особенно blastp или tblastn, с использованием параметров по умолчанию. См., например, Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410 и Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402, каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылки.

Длина полипептидных последовательностей, сравниваемых в отношении гомологии, как правило, будет составлять по меньшей мере приблизительно 16 аминокислотных остатков, по меньшей мере приблизительно 20 остатков, по меньшей мере приблизительно 24 остатка, по меньшей мере приблизительно 28 остатков или по меньшей мере приблизительно 35 остатков. При поиске в базе данных, содержащей последовательности от большого количества различных организмов, предпочтительно сравнивать аминокислотные последовательности.

Термин "эффективное количество" представляет собой концентрацию или количество антитела или антигенсвязывающего фрагмента антитела, которые приводят к достижению конкретной заявленной цели. "Эффективное количество" антитела к GDF8 или его антигенсвязывающего фрагмента антитела можно определить эмпирически. Более того, "терапевтически эффективное количество" представляет собой концентрацию или количество антитела к GDF8 или его антигенсвязывающего фрагмента, которое является эффективным для достижения заявленного терапевтического эффекта. Указанное количество также можно определить эмпирически.

Используемый в настоящем документе термин "здоровый субъект" относится к субъекту, который не характеризуется наличием заболевания или нарушения, которое значительно ограничивает способность субъекта участвовать в тренировках с сопротивлением. Согласно вариантам осуществления заболевания или нарушения представляет собой заболевание или нарушение, при котором врач порекомен-

довал ограничение физической нагрузки для субъекта или при котором физические упражнения противопоказаны, такое как неконтролируемый сахарный диабет, недавний инфаркт миокарда, нестабильные состояния сердца, острая сердечная недостаточность, тяжелый миокардит, неконтролируемая гипертензия, требующее операции заболевание клапанного аппарата сердца и тяжелый аортальный стеноз.

Используемый в настоящем документе термин "тренировки с сопротивлением" относится к комплексу физических упражнений, который заставляет мышцу сжиматься против внешнего сопротивления. Внешнее сопротивление включает в себя, например, вес, эспандер, гирию или собственный вес тела субъекта.

Используемый в настоящем документе термин "режим физических упражнений" относится к плану физических упражнений. Согласно вариантам осуществления режим физических упражнений включает в себя такие физические упражнения, как тренировки с сопротивлением, тренировки с отягощениями, аэробные тренировки, прогулка, интервальные тренировки, йога и их комбинации.

Аспекты раскрытия.

Согласно раскрытию предусмотрены композиции, наборы и способы применения ингибиторов GDF8 для увеличения безжировой массы тела. Согласно вариантам осуществления ингибитор GDF8 представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связывают GDF8.

Получение антител человека.

Способы получения моноклональных антител, включая в себя полностью человеческие моноклональные антитела, известны в настоящей области техники. Любые такие известные способы можно использовать в контексте настоящего изобретения для получения антител человека, которые специфически связываются с GDF8.

С использованием технологии VELOCIMMUNE™ или любого другого известного способа получения моноклональных антител вначале выделяют высокоаффинные химерные антитела к GDF8, характеризующиеся вариабельной областью человека и константной областью мыши. Как в экспериментальном разделе ниже, определяют характеристики антител и выбирают антитела в отношении требуемых характеристик, включая в себя аффинность, селективность, эпитоп и т.д. Мышинные константные области замещают требуемой константной областью человека для создания полностью человеческого антитела согласно настоящему изобретению, например, относящегося к дикому типу или модифицированного IgG1 или IgG4. Наряду с тем, что выбранная константная область может варьировать в соответствии с конкретным применением, характеристики высокоаффинной антигенсвязывающей и целевой специфичности свойственны вариабельной области.

В общем, антитела согласно настоящему изобретению обладают очень высокими аффинностями, как правило, обладая K_D , составляющей от приблизительно 10^{-12} до приблизительно 10^{-9} М, при измерении с помощью связывания с антигеном, либо иммобилизованным на твердой фазе или в жидкой фазе. Мышинные константные области замещают требуемыми константными областями человека для создания полностью человеческих антител согласно настоящему изобретению, например, IgG1 дикого типа (SEQ ID NO: 335) или IgG4 дикого типа (SEQ ID NO: 336), или модифицированного IgG1 или IgG4 (например, SEQ ID NO: 337). Наряду с тем, что выбранная константная область может варьировать в соответствии с конкретным применением, характеристики высокоаффинной антигенсвязывающей и целевой специфичности свойственны вариабельной области.

Антитела или антигенсвязывающие фрагменты, специфические в отношении GDF8.

Согласно настоящему изобретению предусмотрены антитела к GDF8 и антигенсвязывающие фрагменты антител, которые связывают специфические эпитопы GDF8 человека (SEQ ID NO: 340) и способны блокировать биологическую активность GDF8. Согласно одному варианту осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются в пределах эпитопа, содержащего аминокислотные остатки 1-109; 1-54; 1-44; 1-34; 1-24 и 1-14. Согласно другому варианту осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются в пределах эпитопа, содержащего аминокислотные остатки 65-72; 35-109; 45-109; 55-109; 65-109; 75-109; 85-109; 92-109 или 95-109. Согласно другому варианту осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются в пределах эпитопа, содержащего аминокислотный остаток 48-72; 48-69; 48-65; 52-72; 52-65 или 56-65. Согласно конкретным вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут связываться в пределах 2 или больше эпитопов.

Кроме того, согласно настоящему изобретению предусмотрены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают зрелый GDF8 дикого типа (SEQ ID NO: 340), но не связывают выделенные пептиды, характеризующиеся меньше чем полной аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 340. Например, согласно настоящему изобретению предусмотрены антитела к GDF8, которые связывают зрелый GDF8 дикого типа (SEQ ID NO: 340), но не связывают выделенные пептиды, состоящие из 10-40 смежных аминокислот SEQ ID NO: 340. Согласно настоящему изобретению также предусмотрены антитела к GDF8, которые не связывают какие-либо линейные эпитопы в пределах зрелого GDF8 дикого типа. Согласно определенным вариантам осуществления настоящего изобретения антитела к GDF8 связывают зрелый GDF8 дикого типа человека, содержащий SEQ ID NO: 340, но не связывают

один или несколько выделенных пептидов GDF8, характеризующихся аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из аминокислот 1-14, 1-18, 17-42, 48-65, 48-69, 48-72, 52-65, 52-72, 56-65, 56-72, 65-72, 73-90, 75-105 и 91-105 в SEQ ID NO: 340. Согласно определенным вариантам осуществления антитела к GDF8 не связывают любой из вышеупомянутых пептидов GDF8. Способы определения, способно ли данное антитело связывать конкретный пептид GDF8, известны специалистам в настоящей области техники.

Согласно настоящему изобретению также предусмотрены выделенные антитела человека или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с зрелым GDF8 дикого типа человека (например, белком или полипептидом, содержащим SEQ ID NO: 340), но не связываются с химерным конструктором GDF8, в котором определенные аминокислоты GDF8 замещены соответствующей(ими) аминокислотной(ыми) последовательность(ями) из не идентичного, но родственного белка, такого как TGFP-1. Согласно одному примеру химерный конструктор представляет собой химеру GDF8/TGFP-1, в которой аминокислоты 48-72 зрелого GDF8 замещены соответствующей аминокислотной последовательностью TGFP-1 (например, аминокислоты 49-76 TGFP-1). Пример одной такой химеры представлен SEQ ID NO: 352. Таким образом, согласно определенным вариантам осуществления антитела согласно настоящему изобретению специфически связываются со зрелым GDF8 дикого типа человека (SEQ ID NO: 340), но не связываются с химерным конструктором GDF8/TGFP-1 согласно SEQ ID NO: 352, указывая на то, что эпитоп, с которым связываются такие антитела, включает в себя или охватывает аминокислоты, расположенные в пределах остатков 48-72 согласно SEQ ID NO: 340. Биоанализы блокирования также можно использовать для косвенного выяснения того, что антитело связывает зрелый GDF8 дикого типа человека (SEQ ID NO: 340) и не связывает химерный конструктор GDF8/TGFP-1, например, конструктор согласно SEQ ID NO: 352. Например, считают, что антитело, которое блокирует биоактивность зрелого GDF8 дикого типа человека, но не блокирует биоактивность химерного GDF8/TGFP-1, связывается с частью GDF8, которая замещена соответствующей последовательностью TGFP-1 в химерном конструкторе.

Аналогично согласно настоящему изобретению также предусмотрены выделенные антитела человека или их антигенсвязывающие фрагменты, которые блокируют опосредованную зрелым GDF8 дикого типа активность в биоанализе, но не блокируют активность химерного конструктора GDF8 (например, химеры GDF8/TGFP-1, в которой аминокислоты 48-72 зрелого GDF8 замещены соответствующей аминокислотной последовательностью TGFP-1 (например, аминокислоты 49-76 TGFP-1)).

Согласно настоящему изобретению предусмотрены антитела к GDF8, которые связываются с тем же эпитопом, что и любое из специфических иллюстративных антител, описанных в настоящем документе. Аналогично согласно настоящему изобретению также предусмотрены антитела к GDF8, которые перекрестно конкурируют за связывание с GDF8 или фрагментом GDF8 с любым из специфических иллюстративных антител, описанных в настоящем документе.

Можно легко определить, связывается ли антитело с тем же эпитопом, что и эталонное антитело к GDF8, или конкурирует ли оно за связывание с эталонным антителом к GDF8, используя рутинные способы, известные в настоящей области техники. Например, для определения, связывается ли исследуемое антитело с тем же эпитопом, что и эталонное антитело к GDF8 согласно настоящему изобретению, обеспечивают возможность для эталонного антитела связаться с белком или пептидом GDF8 при насыщающих условиях. Далее оценивают способность исследуемого антитела связываться с молекулой GDF8. Если исследуемое антитело способно связываться с GDF8 после насыщения связывания эталонным антителом к GDF8, можно сделать вывод, что исследуемое антитело связывается эпитопом, отличным от эталонного антитела к GDF8. С другой стороны, если исследуемое антитело не способно связываться с молекулой GDF8 после насыщения связывания эталонным антителом к GDF8, исследуемое антитело может связываться с тем же эпитопом, что и эпитоп, связанный эталонным антителом к GDF8 согласно настоящему изобретению. Дополнительное проведение рутинных экспериментов (например, пептидная мутация и анализы связывания) затем можно провести для подтверждения того, что наблюдаемое отсутствие связывания исследуемого антитела действительно обусловлено связыванием с тем же эпитопом, что и эталонное антитело, или же стерическое блокирование (или другое явление) отвечает за отсутствие наблюдаемого связывания. Эксперименты такого рода можно провести с использованием ELISA, RIA, Biacore, проточной цитометрии или любого другого количественного или качественного анализа связывания антител, доступного в настоящей области техники. Согласно определенным вариантам осуществления настоящего изобретения два антитела связываются с одним и тем же (или перекрывающимся) эпитопом, если, например, 1-, 5-, 10-, 20- или 100-кратный избыток одного антитела ингибирует связывание другого по меньшей мере на 50%, но предпочтительно на 75, 90 или даже на 99%, что измеряют в анализе конкурентного связывания (см., например, Junghans et al., Cancer Res. 1990:50:1495-1502). Альтернативно считают, что два антитела связываются с одним и тем же эпитопом, если, по существу, все аминокислотные мутации в антигене, которые снижают или устраняют связывание одного антитела, снижают или устраняют связывание другого. Считают, что два антитела характеризуются "перекрывающимися эпитопами", если только подгруппа аминокислотных мутаций, которые снижают или устраняют связывание одного антитела, снижает или устраняет связывание другого.

Для определения, конкурирует ли антитело за связывание с эталонным антителом к GDF8, вышеописанную методику связывания проводят в двух ориентациях: в первой ориентации обеспечивают возможность для эталонного антитела связываться с молекулой GDF8 при насыщающих условиях с последующей оценкой связывания исследуемого антитела с молекулой GDF8. Во второй ориентации обеспечивают возможность для исследуемого антитела связываться с молекулой GDF8 при насыщающих условиях с последующей оценкой связывания эталонного антитела с молекулой GDF8. Если в обеих ориентациях только первое (насыщающее) антитело способно связываться с молекулой GDF8, делают вывод, что исследуемое антитело и эталонное антитело конкурируют за связывание с GDF8. Специалисту в настоящей области техники будет понятно, что антитело, которое конкурирует за связывание с эталонным антителом, не обязательно может связываться с тем же эпитопом, что и эталонное антитело, но может стericчески блокировать связывание эталонного антитела путем связывания перекрывающегося или смежного эпитопа.

Согласно настоящему изобретению предусмотрены человеческие или гуманизированные антитела и антигенсвязывающие фрагменты человеческих или гуманизированных антител, которые специфически связывают фактор роста и дифференцировки 8 человека (GDF8). Указанные антитела характеризуются связыванием с GDF8 с высокой аффинностью и способностью нейтрализовать активность GDF8. Антитела могут являться полноразмерными (например, антитело IgG1 или IgG4) или могут содержать только антигенсвязывающую часть (например, фрагмент Fab, F(ab')₂ или scFv) и могут являться модифицированными для воздействия на функциональность, например, для устранения остаточных эффекторных функций (Reddy et al. (2000) J. Immunol. 164:1925-1933).

Согласно одному варианту осуществления антитело согласно настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 162, SEQ ID NO: 178, SEQ ID NO: 194, SEQ ID NO: 210, SEQ ID NO: 226, SEQ ID NO: 242, SEQ ID NO: 258, SEQ ID NO: 274, SEQ ID NO: 290, SEQ ID NO: 306, SEQ ID NO: 360 и SEQ ID NO: 376 или, по существу, идентичной им последовательности.

Согласно одному варианту осуществления антитело согласно настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи (LCVR), выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 154, SEQ ID NO: 170, SEQ ID NO: 186, SEQ ID NO: 202, SEQ ID NO: 218, SEQ ID NO: 234, SEQ ID NO: 250, SEQ ID NO: 266, SEQ ID NO: 282, SEQ ID NO: 298, SEQ ID NO: 314, SEQ ID NO: 322, SEQ ID NO: 368 и SEQ ID NO: 384 или, по существу, идентичной им последовательности.

Согласно одному варианту осуществления антитело согласно настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность HCVR и аминокислотную последовательность LCVR, причем последовательности пары HCVR/LCVR выбраны из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, SEQ ID NO: 18/26, SEQ ID NO: 34/42, SEQ ID NO: 50/58, SEQ ID NO: 66/74, SEQ ID NO: 82/90, SEQ ID NO: 98/106, SEQ ID NO: 114/122, SEQ ID NO: 130/138, SEQ ID NO: 146/154, SEQ ID NO: 162/170, SEQ ID NO: 178/186, SEQ ID NO: 194/202, SEQ ID NO: 210/218, SEQ ID NO: 226/234, SEQ ID NO: 242/250, SEQ ID NO: 258/266, SEQ ID NO: 274/282, SEQ ID NO: 290/298, SEQ ID NO: 306/314, SEQ ID NO: 314/322, SEQ ID NO: 360/368 и SEQ ID NO: 376/384.

Согласно настоящему изобретению также предусмотрено человеческое или гуманизированное антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела, содержащие аминокислотную последовательность определяющей комплементарности области 3 тяжелой цепи (HCDR3) и аминокислотную последовательность CDR3 легкой цепи (LCDR3), причем HCDR3 выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 152, SEQ ID NO: 168, SEQ ID NO: 184, SEQ ID NO: 200, SEQ ID NO: 216, SEQ ID NO: 232, SEQ ID NO: 248, SEQ ID NO: 264, SEQ ID NO: 280, SEQ ID NO: 296, SEQ ID NO: 312, SEQ ID NO: 366 и SEQ ID NO: 382 или, по существу, идентичной им последовательности, и аминокислотная последовательность LCDR3 выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 144, SEQ ID NO: 160, SEQ ID NO: 176, SEQ ID NO: 192, SEQ ID NO: 208, SEQ ID NO: 224, SEQ ID NO: 240, SEQ ID NO: 256, SEQ ID NO: 272, SEQ ID NO: 288, SEQ ID NO: 304, SEQ ID NO: 320, SEQ ID NO: 328, SEQ ID NO: 374 и SEQ ID NO: 390 или, по существу, идентичной им последовательности. Согласно другому варианту осуществления антитело или его фрагмент содержит пару аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8/16, SEQ ID NO: 24/32, SEQ ID NO: 40/48, SEQ ID NO: 56/64, SEQ ID NO: 72/80, SEQ ID NO: 88/96, SEQ ID NO: 104/112, SEQ ID NO: 120/128, SEQ ID NO: 136/144, SEQ ID NO: 152/160, SEQ ID NO: 168/176, SEQ ID NO: 184/192, SEQ ID NO: 200/208, SEQ ID NO: 216/224, SEQ ID NO: 232/240, SEQ ID NO: 248/256, SEQ ID NO: 264/272, SEQ ID NO: 280/288, SEQ ID NO: 296/304, SEQ ID NO: 312/320, SEQ ID NO: 328/336, SEQ ID NO: 366/374 и SEQ ID NO: 382/390.

Согласно родственному варианту осуществления антитело или его фрагмент дополнительно содержит аминокислотные последовательности CDR1 тяжелой цепи (HCDR1) и CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и аминокислотные последовательности CDR1 легкой цепи (LCDR1) и CDR2 легкой цепи (LCDR2), причем аминокислотная последовательность HCDR1 выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 148, SEQ ID NO: 164, SEQ ID NO: 180, SEQ ID NO: 196, SEQ ID NO: 212, SEQ ID NO: 228, SEQ ID NO: 244, SEQ ID NO: 260, SEQ ID NO: 276, SEQ ID NO: 292, SEQ ID NO: 308, SEQ ID NO: 362 и SEQ ID NO: 378 или, по существу, идентичной им последовательности; аминокислотная последовательность HCDR2 выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 150, SEQ ID NO: 166, SEQ ID NO: 182, SEQ ID NO: 198, SEQ ID NO: 214, SEQ ID NO: 230, SEQ ID NO: 246, SEQ ID NO: 262, SEQ ID NO: 278, SEQ ID NO: 294, SEQ ID NO: 310, SEQ ID NO: 364 и SEQ ID NO: 380 или, по существу, идентичной им последовательности; аминокислотная последовательность LCDR1 выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 140, SEQ ID NO: 156, SEQ ID NO: 172, SEQ ID NO: 188, SEQ ID NO: 204, SEQ ID NO: 220, SEQ ID NO: 236, SEQ ID NO: 252, SEQ ID NO: 268, SEQ ID NO: 284, SEQ ID NO: 300, SEQ ID NO: 316, SEQ ID NO: 324, SEQ ID NO: 370 и SEQ ID NO: 386 или, по существу, идентичной им последовательности; и аминокислотная последовательность LCDR2 выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 174, SEQ ID NO: 190, SEQ ID NO: 206, SEQ ID NO: 222, SEQ ID NO: 238, SEQ ID NO: 254, SEQ ID NO: 270, SEQ ID NO: 286, SEQ ID NO: 302, SEQ ID NO: 318, SEQ ID NO: 326, SEQ ID NO: 372 и SEQ ID NO: 388 или, по существу, идентичной им последовательности. Согласно другому варианту осуществления HCDR1, HCDR2 и HCDR3 выбраны из группы, состоящей из SEQ ID NO: 36/38/40, SEQ ID NO: 116/118/120, SEQ ID NO: 228/230/232, SEQ ID NO: 362/364/366 и SEQ ID NO: 378/380/382; и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 выбраны из группы, состоящей из SEQ ID NO: 44/46/48, SEQ ID NO: 124/126/128, SEQ ID NO: 236/238/240, SEQ ID NO: 370/372/374 и SEQ ID NO: 386/388/390. Согласно другому варианту осуществления CDR тяжелой и легкой цепей выбраны из группы, состоящей из SEQ ID NO: 36/38/40/44/46/48 (например, 21-E5), SEQ ID NO: 116/118/120/124/126/128 (например, 8D12), SEQ ID NO: 228/230/232/236/238/240 (например, 1A2), SEQ ID NO: 362/364/366/370/372/374 (например, H4H1657N2) и SEQ ID NO: 378/380/382/386/388/390 (например, H4H1669P). Согласно родственному варианту осуществления согласно настоящему изобретению предусмотрено антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела, которые специфически связывают GDF8, причем антитело или фрагмент содержит домены CDR тяжелой и легкой цепей, содержащиеся в пределах последовательностей переменных доменов тяжелой и легкой цепей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, SEQ ID NO: 18/26, SEQ ID NO: 34/42, SEQ ID NO: 50/58, SEQ ID NO: 66/74, SEQ ID NO: 82/90, SEQ ID NO: 98/106, SEQ ID NO: 114/122, SEQ ID NO: 130/138, SEQ ID NO: 146/154, SEQ ID NO: 162/170, SEQ ID NO: 178/186, SEQ ID NO: 194/202, SEQ ID NO: 210/218, SEQ ID NO: 226/234, SEQ ID NO: 242/250, SEQ ID NO: 258/266, SEQ ID NO: 274/282, SEQ ID NO: 290/298, SEQ ID NO: 306/314, SEQ ID NO: 114/322, SEQ ID NO: 360/368 и SEQ ID NO: 376/384.

Способы и техники для идентификации CDR в пределах аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR хорошо известны в настоящей области техники и их можно использовать для идентификации CDR в пределах указанных аминокислотных последовательностей HCVR и/или LCVR, раскрытых в настоящем документе. Иллюстративные общепринятые подходы, которые можно использовать для идентификации границ CDR, включают в себя, например, определение по Кабату, определение по Чотиа и определение согласно AbM. В общих чертах, определение по Кабату основано на изменчивости последовательностей, определение по Чотиа основано на положении областей структурных петель, и определение согласно AbM представляет собой сочетание между подходами Кабата и Чотиа. См., например, Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani et al, J. Mol. Biol. 273:927-948 (1997); и Martin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:9268-9272 (1989). Общедоступные базы данных также доступны для идентификации последовательностей CDR в пределах антитела.

Согласно настоящему изобретению также предусмотрены молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие антитело или антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению. Рекombinantные экспрессионные векторы, несущие кодирующие антитело нуклеиновые кислоты согласно настоящему изобретению, и клетки-хозяева, в которые такие векторы были введены, также предусмотрены настоящим изобретением, а также способы получения антител согласно настоящему изобретению путем культивирования клеток-хозяев согласно настоящему изобретению.

Согласно одному варианту осуществления антитело согласно настоящему изобретению содержит CDR, содержащиеся в пределах HCVR, или HCVR, кодируемую нуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 145, SEQ ID

NO: 161, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 209, SEQ ID NO: 225, SEQ ID NO: 241, SEQ ID NO: 257, SEQ ID NO: 273, SEQ ID NO: 289, SEQ ID NO: 305, SEQ ID NO: 359 и SEQ ID NO: 375 или, по существу, сходной последовательности, характеризующейся по меньшей мере 95% гомологией по отношению к ним.

Согласно одному варианту осуществления антитело согласно настоящему изобретению содержит CDR, содержащиеся в пределах LCVR, или LCVR, кодируемую нуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 153, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 185, SEQ ID NO: 201, SEQ ID NO: 217, SEQ ID NO: 233, SEQ ID NO: 249, SEQ ID NO: 265, SEQ ID NO: 281, SEQ ID NO: 297, SEQ ID NO: 313, SEQ ID NO: 321, SEQ ID NO: 367 и SEQ ID NO: 383 или, по существу, сходной последовательности, характеризующейся по меньшей мере 95% гомологией по отношению к ним.

Согласно настоящему изобретению также предусмотрено полностью человеческое или гуманизированное антитело или фрагмент антитела, которые связывают GDF8 с аффинностью (выраженной как константа диссоциации, "K_D"), составляющей приблизительно 1 нМ или меньше согласно измерению с помощью анализа поверхностного плазмонного резонанса (например, BIACORE™). Согласно определенным вариантам осуществления антитело согласно настоящему изобретению проявляет K_D, составляющую приблизительно 700 пМ или меньше; приблизительно 500 пМ или меньше; приблизительно 320 пМ или меньше; приблизительно 160 пМ или меньше; приблизительно 100 пМ или меньше; приблизительно 50 пМ или меньше; приблизительно 10 пМ или меньше или приблизительно 5 пМ или меньше.

Согласно одному варианту осуществления согласно настоящему изобретению предусмотрены полностью человеческое или гуманизированное моноклональное антитело (mAb), которое специфически связывает и ингибирует GDF8 человека и проявляет IC₅₀, составляющую меньше чем или равную приблизительно 10 нМ; приблизительно 5 нМ или меньше; приблизительно 3 нМ или меньше; приблизительно 2 нМ или меньше; приблизительно 1 нМ или меньше; приблизительно 500 пМ или меньше или приблизительно 200 пМ или меньше, как измерено с помощью анализа индуцируемой GDF8 люциферазы. Как показано в экспериментальном разделе ниже, некоторые из антител к GDF8 согласно настоящему изобретению блокируют активность близкородственных белков, таких как GDF11, с гораздо более высоким значением IC₅₀, чем GDF8 в люциферазном биоанализе. Согласно одному варианту осуществления согласно настоящему изобретению предусмотрено антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела, которые проявляют по меньшей мере приблизительно в 10 раз, по меньшей мере приблизительно в 50 раз, по меньшей мере приблизительно в 100 раз, по меньшей мере приблизительно в 200 раз, по меньшей мере приблизительно в 500 раз, по меньшей мере приблизительно в 1000 раз или по меньшей мере приблизительно в 1500 раз большее значение IC₅₀ для блокирования активности GDF11 по отношению к GDF8.

Согласно настоящему изобретению предусмотрены антитела к GDF8, характеризующиеся модифицированным профилем гликозилирования. В некоторых применениях можно применять модификацию для удаления нежелательных сайтов гликозилирования или антитело, в котором отсутствует фрагмент фукозы, присутствующий на олигосахаридной цепи, например, для увеличения функции антителозависимой клеточно-обусловленной цитотоксичности (ADCC) (см. Shield et al. (2002) JBC 277:26733). В других применениях модификацию галактозилирования можно осуществить для модификации комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC).

Согласно настоящему изобретению предусмотрены антитела к GDF8, которые связывают специфические эпитопы GDF8 и способны блокировать биологическую активность GDF8. Согласно первому варианту осуществления антитело согласно настоящему изобретению связывает эпитоп зрелого белка GDF8 (SEQ ID NO: 340) в пределах аминокислот от приблизительно 1 до приблизительно 109; от приблизительно 1 до приблизительно 54; от приблизительно 1 до приблизительно 44; от приблизительно 1 до приблизительно 34; от приблизительно 1 до приблизительно 24 и от приблизительно 1 до приблизительно 14. Согласно второму варианту осуществления антитело согласно настоящему изобретению связывает один или несколько эпитопов зрелого белка GDF8 (SEQ ID NO: 340) в пределах аминокислот от приблизительно 35 до приблизительно 109; от приблизительно 45 до приблизительно 109; от приблизительно 55 до приблизительно 109; от приблизительно 65 до приблизительно 109; от приблизительно 75 до приблизительно 109; от приблизительно 85 до приблизительно 109; от приблизительно 92 до приблизительно 109 или от приблизительно 95 до приблизительно 109. Согласно третьему варианту осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела связываются в пределах эпитопа зрелого белка GDF8 человека от приблизительно аминокислотного остатка 48 до приблизительно 72; от приблизительно 48 до приблизительно 69; от приблизительно 48 до приблизительно 65; от приблизительно 52 до приблизительно 72; от приблизительно 52 до приблизительно 65 или от приблизительно 56 до приблизительно 65.

Согласно определенным вариантам осуществления настоящего изобретения антитела к GDF8 связываются с GDF8 человека, но не с GDF8 от других видов. Альтернативно антитела к GDF8 согласно настоящему изобретению согласно определенным вариантам осуществления связываются с GDF8 чело-

века и с GDF8 от одного или нескольких не относящихся к человеку видов. Например, антитела к GDF8 согласно настоящему изобретению могут связываться с GDF8 человека и могут связываться или не связываться, в зависимости от конкретного случая, с одним или несколькими GDF8 мыши, крысы, морской свинки, хомяка, песчанки, свиньи, кошки, собаки, кролика, козы, овцы, коровы, лошади, верблюда, яванского макака, мартышки, макака-резуса или шимпанзе.

Согласно настоящему изобретению предусмотрено человеческое или гуманизованное моноклональное антитело к GDF8, конъюгированное с терапевтическим фрагментом ("иммуноконъюгат"), таким как цитотоксин, химиотерапевтическое лекарственное средство, иммунодепрессант или радиоактивный изотоп. Цитотоксические средства включают в себя любое средство, которое является вредным для клеток. Примеры подходящих цитотоксических средств и химиотерапевтических средств для образования иммуноконъюгатов известны в настоящей области техники (см., например, международную патентную публикацию WO 05/103081, которая специально включена в настоящий документ посредством ссылки).

Антитела согласно настоящему изобретению могут являться моноспецифическими, биспецифическими или мультиспецифическими.

Мультиспецифические антитела могут являться специфическими в отношении различных эпитопов одного целевого полипептида или могут содержать антигенсвязывающие домены, специфические в отношении больше одного целевого полипептида. См., например, Tutt et al., 1991, J. Immunol. 147:60-69; Kufer et al., 2004, Trends Biotechnol. 22:238-244. Антитела к GDF8 согласно настоящему изобретению можно соединить или коэкспрессировать с другой функциональной молекулой, например другим пептидом или белком. Например, антитело или его фрагмент можно функционально соединить (например, с помощью химического связывания, генетического слияния, нековалентной ассоциации или иным образом) с одной или несколькими другими молекулярными частицами, такими как другое антитело или фрагмент антитела, с получением биспецифического или мультиспецифического антитела со второй специфичностью связывания. Например, согласно настоящему изобретению предусмотрены биспецифические антитела, в которых одно плечо иммуноглобулина является специфическим в отношении GDF8 человека или его фрагмента, а другое плечо иммуноглобулина является специфическим в отношении второй терапевтической мишени или конъюгировано с терапевтическим фрагментом.

Иллюстративный биспецифический формат антител, который можно использовать в контексте настоящего изобретения, включает в себя использование первого домена C_{H3} иммуноглобулина (Ig) и второго домена C_{H3} Ig, причем первый и второй домены C_{H3} Ig отличаются друг от друга по меньшей мере на одну аминокислоту, и причем по меньшей мере различие в одной аминокислоте снижает связывание биспецифического антитела с белком А по сравнению с биспецифическим антителом, в котором отсутствует различие в аминокислотах. Согласно одному варианту осуществления первый домен C_{H3} Ig связывает белок А, и второй домен C_{H3} Ig содержит мутацию, которая снижает или устраняет связывание с белком А, такую как модификация H95R (согласно нумерации экзонов IMGT; H435R согласно нумерации EU). Второй C_{H3} может дополнительно содержать модификацию Y96F (согласно IMGT; Y436F согласно EU). Дополнительные модификации, которые можно обнаружить в пределах второго C_{H3} , включают в себя D16E, L18M, N44S, K52N, V57M и V82I (согласно IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M и V422I согласно EU) в случае антител IgG1; N44S, K52N и V82I (IMGT; N384S, K392N и V422I согласно EU) в случае антител IgG2; и Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q и V82I (согласно IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q и V422I согласно EU) в случае антител IgG4. Вариации биспецифического формата антител, описанного выше, предусмотрены в пределах объема настоящего изобретения.

Антитела к GDF8 и фрагменты антител согласно настоящему изобретению включают в себя белки, характеризующиеся аминокислотными последовательностями, которые отличаются от аминокислотных последовательностей описанных антител, но которые сохраняют способность связывать GDF8 человека. Такие варианты антител и фрагменты антител содержат одно или несколько добавлений, делеций или замен аминокислот по сравнению с исходной последовательностью, но проявляют биологическую активность, которая, по существу, эквивалентна биологической активности описанных антител. Аналогично кодирующие антитело к GDF8 последовательности ДНК согласно настоящему изобретению включают в себя последовательности, которые содержат одно или несколько добавлений, делеций или замен нуклеотидов по сравнению с раскрытой последовательностью, но которые кодируют антитело к GDF8 или фрагмент антитела, которые являются, по существу, биоэквивалентными антителу к GDF8 или фрагменту антитела согласно настоящему изобретению. Примеры таких вариантов аминокислотных последовательностей и последовательностей ДНК обсуждаются выше.

Два антигенсвязывающих белка, или антитела, считают биоэквивалентными, если, например, они представляют собой фармацевтические эквиваленты или фармацевтические альтернативы, чья скорость и степень абсорбции не демонстрирует значительного различия при введении в одинаковой молярной дозе при сходных экспериментальных условиях, либо одноразовой дозе, либо многократных доз. Некоторые антитела будут считать эквивалентными или фармацевтическими альтернативами, если они эквивалентны по степени своей абсорбции, но не по скорости своей абсорбции, и все же могут считаться биоэквивалентными, поскольку такие различия в скорости абсорбции являются преднамеренными и отражены

на этикетке, не являются существенными для достижения эффективных концентраций лекарственного средства в организме, например, при длительном применении и рассматриваются незначительными с медицинской точки зрения для конкретного изучаемого лекарственного продукта.

Согласно одному варианту осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если нет никаких клинически значимых различий в их безопасности, чистоте и активности.

Согласно одному варианту осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если пациент может переключаться один или несколько раз между препаратом сравнения и биологическим продуктом без ожидаемого увеличения риска неблагоприятных эффектов, включая в себя клинически значимое изменение иммуногенности или сниженную эффективность, по сравнению с непрерывной терапией без такого переключения.

Согласно одному варианту осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если оба они действуют по общему механизму или механизмам действия для условия или условий применения в той мере, в которой такие механизмы известны.

Биоэквивалентности можно продемонстрировать с помощью *in vivo* и *in vitro* способов. Меры биоэквивалентности включают в себя, например, (a) *in vivo* исследование с участием людей или других млекопитающих, в котором концентрацию антитела или его метаболитов измеряют в крови, плазме, сыворотке или другой биологической жидкости в зависимости от времени; (b) *in vitro* исследование, для которого установили корреляцию с данными о биодоступности для человека *in vivo* и которое является обоснованно прогностическим для данных о биодоступности для человека *in vivo*; (c) *in vivo* исследование с участием людей или других млекопитающих, в котором соответствующий острый фармакологический эффект антитела (или его мишени) измеряют в зависимости от времени; и (d) в хорошо контролируемом клиническом испытании, в котором устанавливают безопасность, эффективность, или биодоступность, или биоэквивалентность антитела.

Биоэквивалентные варианты антител к GDF8 согласно настоящему изобретению можно сконструировать путем, например, осуществления различных замен остатков или последовательностей или удаления концевых или расположенных внутри остатков или последовательностей, не являющихся необходимыми для биологической активности. Например, остатки цистеина, не являющиеся необходимыми для биологической активности, можно подвергнуть делеции или заменить другими аминокислотами для предотвращения образования ненужных или неправильных внутримолекулярных дисульфидных мостиков при ренатурации. В других контекстах биоэквивалентные антитела могут включать в себя варианты антител к GDF8, содержащие изменения в аминокислотах, которые модифицируют характеристики гликозилирования антител, например, мутации, которые устраняют или удаляют гликозилирование.

Терапевтическое введение и составы.

Согласно настоящему изобретению предусмотрены терапевтические композиции, содержащие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению. Введение терапевтических композиций согласно настоящему изобретению осуществляют вместе с подходящими носителями, вспомогательными веществами и другими средствами, которые включают в составы для обеспечения улучшенной транспортировки, доставки, переносимости и подобного.

Многочисленные приемлемые составы можно найти в фармакологическом справочнике, известном всем химикам-фармацевтам: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Указанные составы включают в себя, например, порошки, пасты, мази, желе, воски, масла, липиды, содержащие липиды (катионные или анионные) везикулы (такие как LIPOFECTIN™), ДНК-конъюгаты, безводные абсорбционные пасты, эмульсии масло-в-воде и вода-в-масле, эмульсии карбовакса (полиэтиленгликоли различных молекулярных масс), полутвердые гели и полутвердые смеси, содержащие карбовакс. Любая из вышеупомянутых смесей может являться приемлемой в видах лечения и терапии согласно настоящему изобретению при условии, что активный ингредиент в составе не инактивируется составом, и состав является физиологически совместимым и допустимым для пути введения. См. также Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) J. Pharm. Sci. Technol. 52:238-311.

Доза может варьировать в зависимости от возраста и размера субъекта, подлежащего введению, целевого заболевания, состояний, пути введения и подобного. Если антитело согласно настоящему изобретению используют для лечения различных состояний и заболеваний, ассоциированных с GDF8, у взрослых, предпочтительно вводить антитело согласно настоящему изобретению, как правило, в однократной дозе, составляющей от приблизительно 0,01 до приблизительно 20 мг/кг массы тела, от приблизительно 0,1 до приблизительно 10 мг/кг массы тела или от приблизительно 0,1 до приблизительно 5 мг/кг массы тела. Альтернативно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно вводить здоровому субъекту в комбинации с режимом физических упражнений. Согласно вариантам осуществления здоровый субъект испытывает возрастную потерю сухой мышечной массы и/или послеоперационное истощение мышечной ткани. Согласно вариантам осуществления эффективное количество для субъекта составляет по меньшей мере 400 мг или приблизительно 36 мг/кг (принимая 70 кг за среднюю массу взрослого человека).

В зависимости от тяжести состояния можно регулировать частоту и продолжительность лечения. В другом парентеральном введении и пероральном введении антитело можно вводить в дозе, соответст-

вующей дозе, представленной выше. Если состояние является особенно тяжелым, дозу можно увеличить в соответствии с состоянием вплоть до количества, которое вызывает значительные побочные эффекты, если они имеют место. Согласно вариантам осуществления субъект получает по меньшей мере две дозы или больше подкожно. Согласно вариантам осуществления субъекты получают многократные дозы с периодичностью, например, раз в неделю, раз в две недели, раз в три недели, раз в четыре недели, раз в пять недель и раз в шесть недель.

Известны различные системы доставки и их можно использовать для введения фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, например инкапсулирование в липосомы, микрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать мутантные вирусы, опосредованный рецепторами эндоцитоз (см., например, Wu et al. (1987) *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432). Способы введения включают в себя без ограничения интрадермальный, внутримышечный, интраперитонеальный, внутривенный, подкожный, интраназальный, эпидуральный и пероральный пути. Композицию можно вводить с помощью любого удобного пути, например с помощью инфузии или болюсной инъекции, путем абсорбции через эпителиальные или кожно-слизистые оболочки (например, слизистую ротовой полости, слизистые оболочки прямой кишки и кишечника и т.д.) и можно вводить вместе с другими биологически активными средствами. Введение может являться системным или локальным.

Фармацевтическую композицию также можно доставлять в везикуле, в частности липосоме (см. Langer (1990) *Science* 249:1527-1533).

Фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению можно доставлять подкожно или внутривенно с помощью стандартной иглы и шприца. Кроме того, в отношении подкожной доставки устройство для доставки в виде ручки легко находит применения в доставке фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению. Такое устройство для доставки в виде ручки может являться пригодным для повторного использования или одноразовым. В пригодном для повторного использования устройстве для доставки в виде ручки, как правило, используют заменяемый картридж, который содержит фармацевтическую композицию. Как только была введена вся фармацевтическая композиция внутри картриджа, и картридж стал пустым, пустой картридж можно легко снять и заменить новым картриджем, который содержит фармацевтическую композицию. После этого устройство для доставки в виде ручки можно использовать повторно. В одноразовом устройстве для доставки в виде ручки отсутствует заменяемый картридж. Вместо этого, одноразовое устройство для доставки в виде ручки поставляется предварительно заполненным фармацевтической композицией, содержащейся в резервуаре внутри устройства. Как только в резервуаре заканчивается фармацевтическая композиция, все устройство выбрасывают.

Различные пригодные для повторного использования устройства для доставки в виде ручки и автоинъектора находят применения в подкожной доставке фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению. Примеры включают в себя без ограничения AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK), шприц-ручку DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Bergdorf, Switzerland), шприц-ручку HUMALOG MIX 75/25™, шприц-ручку HUMALOG™, шприц-ручку HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly и Co., Indianapolis, IN), NOVOPEN™ I, II и III (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), шприц-ручку BD™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ и OPTICLIK™ (sanofi-aventis, Frankfurt, Germany), называя лишь некоторые из них. Примеры одноразовых устройств для доставки в виде ручки, находящихся применения в подкожной доставке фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, включают в себя без ограничения шприц-ручку SOLOSTAR™ (sanofi-aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) и KWIKPEN™ (Eli Lilly), автоинъектор SURECLICK™ (Amgen, Thousand Oaks, CA), PENLET™ (Haselmeier, Stuttgart, Germany), EIPEN (Dey, L.P.) и шприц-ручку HUMIRA™ (Abbott Labs, Abbott Park IL), называя лишь некоторые из них.

В определенных ситуациях фармацевтическую композицию можно доставлять в системе контролируемого высвобождения, например, с использованием насоса или полимерных материалов. Согласно другому варианту осуществления систему контролируемого высвобождения можно поместить вблизи от мишени композиции, таким образом, обеспечивая необходимость только в доле системной дозы.

Примеры композиции для перорального введения включают в себя твердые или жидкие лекарственные формы, в частности таблетки (включая в себя драже и покрытые оболочкой таблетки), пилюли, гранулы, порошкообразные препараты, капсулы (включая в себя мягкие капсулы), сироп, эмульсии, суспензии и т.д. Такую композицию производят с помощью общеизвестных способов, и она содержит носитель, разбавитель или вспомогательное вещество, обычно используемые в области получения фармацевтических препаратов. Примеры носителя или вспомогательного вещества для таблеток представляют собой лактозу, крахмал, сахарозу, стеарат магния и подобное.

Инъекционные препараты могут включать в себя лекарственные формы для внутривенных, подкожных, внутрикожных и внутримышечных инъекций, капельных инфузий и т.д. Указанные инъекционные препараты можно получить с помощью широкоизвестных способов. Например, инъекционные препараты можно получить путем растворения, суспендирования или эмульгирования антитела или его со-

ли, описанных выше, в стерильной водной среде или в масляной среде, обычно используемых для инъекций. В качестве водной среды для инъекций существуют, например, физиологический солевой раствор, изотонический раствор, содержащий глюкозу и другие вспомогательные средства и т.д., которые можно использовать в комбинации с таким подходящим солюбилизирующим средством, как спирт (например, этанол), многоатомный спирт (например, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль), неионное поверхностно-активное вещество [например, полисорбат 80, аддукт HCO-50 (полиоксиэтилен (50 моль) гидрогенизированного касторового масла)] и т.д. В качестве масляной среды используют, например, кунжутное масло, соевое масло и т.д., которые можно использовать в комбинации с таким солюбилизирующим средством, как бензилбензоат, бензиловый спирт и т.д. Полученную таким образом инъекцию предпочтительно заполняют в подходящую ампулу.

Предпочтительно фармацевтические композиции для перорального или парентерального применения, описанные выше, получают в виде лекарственных форм в одноразовой дозе, подходящей для подбора дозы активных ингредиентов. Такие лекарственные формы в одноразовой дозе включают в себя, например, таблетки, пилюли, капсулы, инъекции (ампулы), суппозитории и т.д. Количество вышеупомянутого антитела, содержащегося в ней, составляет, как правило, приблизительно 5-500 мг на лекарственную форму в одноразовой дозе; особенно в форме инъекции предпочтительно, чтобы вышеупомянутое антитело содержалось в количестве, составляющем приблизительно 5-500 мг и приблизительно 10-400 мг для других лекарственных форм.

Терапевтические применения антител.

Антитела согласно настоящему изобретению являются применимыми, *inter alia*, для увеличения сухой мышечной массы у субъекта. Согласно некоторым вариантам осуществления способ увеличения сухой мышечной массы предусматривает обеспечение режима физических упражнений для субъекта и введение композиции, содержащей эффективное количество ингибитора GDF8. Согласно вариантам осуществления субъект представляет собой субъекта, которому врач не предписал ограничение физических упражнений, и/или у которого отсутствует состояние или нарушение, для которого противопоказаны физические упражнения. Согласно вариантам осуществления субъект характеризуется потерей сухой мышечной массы. Согласно другим вариантам осуществления возраст субъекта составляет по меньшей мере 50 лет, 55 лет или 60 лет или старше.

Согласно вариантам осуществления антитела согласно настоящему изобретению являются применимыми, *inter alia*, для лечения, профилактики и/или уменьшения интенсивности любого заболевания или нарушения, ассоциированного с активностью GDF8. Более конкретно, антитела согласно настоящему изобретению являются применимыми для лечения любого состояния или поражения, которое можно улучшить путем увеличения мышечной силы/мощности и/или мышечной массы и/или мышечной функции у индивидуума, или путем благоприятного изменения метаболизма (переработки углеводов, липидов и белков) путем блокирования активности GDF8. Иллюстративные заболевания, нарушения и состояния, которые можно лечить с помощью антител к GDF8 согласно настоящему изобретению, включают в себя без ограничения следующие: саркопения, кахексия (либо идиопатическая, либо вторичная по отношению к другим состояниям, например злокачественной опухоли, хронической почечной недостаточности или хроническому обструктивному заболеванию легких), травма мышц, истощение мышечной ткани и мышечная атрофия, например мышечная атрофия или истощение мышечной ткани, вызванные или связанные с отсутствием функциональной нагрузки на мышцы, иммобилизацией, постельным режимом, травмой, медицинским лечением или хирургическим вмешательством (например, перелом бедра, протезирование тазобедренного сустава, протезирование коленного сустава и т.д.) или необходимостью искусственной вентиляции легких. Дополнительные нарушения, которые можно лечить с помощью антител к GDF8 согласно настоящему изобретению, включают в себя без ограничения IBM (спорадический миозит с включениями).

Согласно настоящему изобретению предусмотрено режимы терапевтического введения, которые предусматривают введение антитела к GDF8 согласно настоящему изобретению в комбинации по меньшей мере с одним дополнительным терапевтически активным компонентом. Неограничивающие примеры таких дополнительных терапевтически активных компонентов включают в себя другие антагонисты GDF8 (например, низкомолекулярные ингибиторы GDF8 или другие антитела к GDF8 или связывающие GDF8 молекулы), ингибиторы факторов роста, иммунодепрессанты, противовоспалительные средства, ингибиторы метаболизма, ингибиторы ферментов и цитотоксические/цитостатические средства. Дополнительный(е) терапевтически активный(е) компонент(ы) можно вводить до, одновременно или после введения антитела к GDF8 согласно настоящему изобретению.

Согласно родственному варианту осуществления способ предусматривает комбинирование введения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента субъекту, который выполняет физические упражнения на регулярной основе, такие как физические упражнения с весовой нагрузкой. Согласно вариантам осуществления способ предусматривает обеспечение режима физических упражнений, такого как режим, который стимулирует увеличение сухой мышечной массы. Согласно вариантам осуществления режим физических упражнений включает в себя одно или несколько из следующего: тренировки с сопротивлением, силовые тренировки, пилатес, аэробные физические упражнения, тренировки с отягощениями и

йога. Согласно конкретному варианту осуществления режим физических упражнений включает в себя тренировки с сопротивлением и/или тренировки с отягощениями. Согласно вариантам осуществления режим физических упражнений предоставлен в письменной форме и / или путем иллюстрации, на машиночитаемом носителе, видео или в зале для занятий физическими упражнениями.

Согласно вариантам осуществления тренировки с сопротивлением включают в себя тренировку любых мышц организма, включая в себя без ограничения мышцы недоминантной ладони, доминантной ладони, ноги, руки, спины, мышцу живота, квадрицепс, заднюю часть голени, бицепс, трицепс, мышцу плеча, ягодичную мышцу и/или грудную мышцу. Тренировки с сопротивлением могут включать в себя использование весов, эластичной ленты, спортивных тренажеров и/или собственного веса субъекта. Физические упражнения могут включать в себя жим лежа, жим ногами, сгибание рук, сгибание ног, жим кистью, упражнение для брюшного пресса, жим икрами, подъем на бицепс, подъем на трицепс, стойку на локтях, боковую стойку на локтях и/или ходьбу по лестнице.

Согласно варианту осуществления режим физических упражнений предусматривает по меньшей мере один комплекс физических упражнений на группу мышц согласно конкретным вариантам осуществления больше, чем один, два или три комплекса физических упражнений. Согласно вариантам осуществления комплекс физических упражнений включают в себя по меньшей мере восемь повторов или больше.

Субъект соблюдает предусмотренный режим физических упражнений по меньшей мере один раз в неделю, два раза в неделю, три раза в неделю, четыре раза в неделю или пять раз в неделю. Согласно вариантам осуществления режим физических упражнений соблюдают в течение по меньшей мере 12 недель.

Согласно вариантам осуществления субъект соблюдает комплекс физических упражнений с минимальным уровнем интенсивности, например, с 50% или меньше от максимального веса, который можно поднимать для конкретного физического упражнения (1-RM). Согласно вариантам осуществления интенсивность постепенно увеличивают в ходе режима физических упражнений. Согласно вариантам осуществления 1-RM для каждого физического упражнения (жим лежа, жим ногами, сгибание ног и сгибание рук) можно измерить в зале для занятий физическими упражнениями на оборудовании, используемом для физической подготовки, при различных интервалах времени, таких как исходное измерение, 4 неделя и 8 неделя. Согласно вариантам осуществления интенсивность увеличивают приблизительно на 10% 1-RM в неделю. Согласно вариантам осуществления интенсивность составляет по меньшей мере 50%, и ее поддерживают на уровне, составляющем приблизительно 65-90% от максимального.

Согласно вариантам осуществления способ дополнительно предусматривает мониторинг выполняемых субъектом тренировок с сопротивлением, предусматривающий обеспечение прибора, который измеряет тренировку и/или обеспечение журнала учета или компьютерной программы для отслеживания повторов, продолжительности, интенсивности и частоты тренировок с сопротивлением. Согласно вариантам осуществления прибор включает в себя акселерометр, динамометр, устройство для линейного позиционирования и актиграф.

Согласно вариантам осуществления способ предусматривает введение ингибитора GDF8 в количестве, эффективном для увеличения сухой мышечной массы, не приводящим к неблагоприятным побочным эффектам на миокард и/или функцию сердца. Как обсуждалось ранее, ингибиторы GDF8 могут быть связаны с гипертрофией сердца. Тем не менее, согласно вариантам осуществления дозу и режим введения выбирают так, чтобы минимизировать какие-либо эффекты на миокард и/или функцию сердца. Согласно вариантам осуществления такие маркеры, как креатининкиназа, тропонин и подобное, подвергают мониторингу во время лечения. Согласно вариантам осуществления лечение прекращают, если наблюдается гипертрофия сердца и/или если сердечные маркеры, указывающие на повреждение сердца, повышаются по меньшей мере на 20%.

Примеры

Приведенные ниже примеры изложены таким образом, чтобы предоставить специалистам в настоящей области техники полное раскрытие и описание того, как осуществлять и применять способы и композиции согласно настоящему изобретению, и не предназначены для ограничения объема того, что авторы настоящего изобретения считают своим изобретением. Были предприняты попытки для обеспечения точности в отношении используемых численных значений (например, количеств, температуры и т.д.), но необходимо принимать во внимание некоторые экспериментальные погрешности и отклонения. Если не указано иное, части представляют собой части по массе, молекулярная масса представляет собой среднюю молекулярную массу, температура представлена в градусах Цельсия и давление равно или близко к атмосферному.

Пример 1. Получение антител человека к GDF8 человека.

Антитела к GDF8 человека получали, как описано в патенте США № 8840894. Иллюстративный ингибитор GDF8, используемый в последующем примере, представляет собой антитело к GDF8 человека, обозначенное "H4H1657N2" (также обозначаемое как REGN1033). H4H1657N2 характеризуется следующими характеристиками аминокислотной последовательности: переменная область тяжелой цепи (HCVR), содержащая SEQ ID NO: 360; переменный домен легкой цепи (LCVR), содержащий SEQ ID

NO: 368. CDRs REGN1033 содержат определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), содержащую SEQ ID NO: 362; HCDR2, содержащую SEQ ID NO: 364; HCDR3, содержащую SEQ ID NO: 366; определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), содержащую SEQ ID NO: 370; LCDR2, содержащую SEQ ID NO: 372; и LCDR3, содержащую SEQ ID NO: 374.

Пример 2. Клиническое испытание в отношении безопасности и биологического эффекта антитела к GDF8 с физическими упражнениями и без них.

Проводили рандомизированное, двойное слепое, плацебо-контролируемое, многоцентровое исследование на параллельных группах в отношении эффектов повторных доз подкожного лечения с помощью REGN1033 на безопасность, композиционный состав тела и объем мышц, мышечную силу и функцию ходьбы по лестнице у 120 здоровых субъектов - мужчин и женщин с малоподвижным образом жизни, возраст которых составлял 60 лет и старше. Использовали 2×2 факторный дизайн; вплоть до 120 субъектов (4 группы по 30 субъектов каждая) было необходимо рандомизировать в соотношении 1:1:1:1 на группы: плацебо отдельно, REGN1033 (400 мг SC Q2W × 6 доз) отдельно, плацебо + тренировки с сопротивлением (RT) или REGN1033 + RT. Рандомизация была стратифицирована по полу и по месту проведения исследования. RT состояли из тренировок с сопротивлением низкой интенсивности в тренажерном зале при 50% 1-повторном максимуме (1-RM) два раза в неделю всего 12 недель по меньшей мере с одним постепенным регулированием физической нагрузки во время исследования.

Первичной целью исследования являлась оценка эффекта REGN1033, с физическими упражнениями и без них, на общую безжировую массу тела, измеряемую с помощью двуэнергетической рентгеновской абсорбциометрии (DEXA). Вторичные цели включают в себя оценки эффектов на безопасность и переносимость; эффекты на аппендикулярную массу нежировых тканей и жировую массу с помощью DEXA, эффекты на объем мышц бедра, измеренный с помощью MPT, силу верхней и нижней частей тела с помощью способов на основе 1-повторного максимума, максимальную силу жима кистью и силу при ходьбе по лестнице.

Отбор пациентов.

Целевая популяция для настоящего исследования - 120 здоровых субъектов -мужчин и женщин с малоподвижным образом жизни в возрасте 60 лет и старше.

Критерии включения представляли собой следующие:

1. Мужчины и женщины в возрасте 60 лет и старше, без существенных проблем со здоровьем или состояний;
2. Ведущие активную половую жизнь мужчины, согласные использовать противозачаточные средства и не сдавать сперму во время исследования и в течение 4 месяцев после исследования;
3. Женщины, нуждающиеся в клиническом подтверждении статуса постменопаузы (по меньшей мере 12 месяцев с последней менструации, подтвержденного с помощью уровней FSH в постменопаузе >20 мМЕ/мл или прошедшие стерилизацию хирургическим путем);
4. Индекс массы тела (BMI) от 19 до 35 кг/м² включительно;
5. Без состояния, которое могло ограничить участие в тренировках с сопротивлением под контролем инструктора на основании PAR-Q (опросник готовности к физической активности);
6. Малоподвижный образ жизни, определяемый по баллу, составляющему ≤125 в опроснике о физической активности CHAMPS-18 в последние 3 месяца;
7. Согласие поддерживать текущую диету и придерживаться программ физических упражнений, описанных для исследования, и не начинать какие-либо новые программы питания/коррекции веса;
8. Согласие и способность приходить на все приемы в клинику и завершить все связанные с исследованием процедуры;
9. Предоставлять полные связанные с исследованием опросники; и
10. Предоставить форму информированного согласия (ICF).

Критерии исключения из исследования включают в себя тех субъектов, которые были госпитализированы или у которых была серьезная операция, которые характеризуются наличием остеоартрита, ревматологических заболеваний или ортопедических нарушений, которые ограничивают объем движения в суставах или способность к физическим упражнениям; которые характеризуются наличием нарушений ЖКТ, хронического заболевания почек, злокачественной опухоли, заболевания легких, заболевания сердца, бронхиальной астмы, инсульта с остаточным парезом, паралича, рассеянного склероза, болезни Паркинсона, нарушения когнитивных функций, психиатрических состояний, которые требуют острого или хронического терапевтического вмешательства (например, большое депрессивное расстройство, биполярное расстройство, паническое расстройство, шизофрения), применение в настоящее время или предыдущее применение любых лекарственных средств, которые, как известно, влияют на мышечную массу или мышечную деятельность, в пределах 6 месяцев, и не способных пройти MPT бедер.

Введение лекарственных средств.

REGN1033 поставляли в виде лиофилизированного лекарственного продукта и вводили подкожно в настоящем исследовании. Каждый флакон лиофилизированного REGN1033 разводили в асептических условиях до конечной концентрации, составляющей 100 мг/мл. Плацебо, соответствующее REGN1033,

получают в том же составе, что и REGN1033, без добавления REGN1033. Объем для плацебо был таким же при каждом уровне дозы. Субъекты получали 400 мг REGN1033 или плацебо (комбинированные с тренировками с сопротивлением RT для субъектов в группах 3 и 4) каждые 2 недели всего 6 доз SC в область живота. Конкретный квадрант живота документально зарегистрирован.

План исследования.

Настоящее исследование характеризовалось периодом скрининга, составляющим 28 дней (день -28 - день -1, скрининг/до лечения), периодом лечения с помощью лекарственного средства (день 1 - день 71) и 10-недельным периодом последующего наблюдения после введения последней дозы. Исходные показатели массы, силы и функции ходьбы по лестнице и электрокардиографии получали во время периода скрининга (день -14 - день -1). Исходные показатели для DEXA и MPT получали между днем -7 ± 3 и днем -1. Для всех других параметров исходные показатели получали в день 1 (исходный уровень). Общая продолжительность исследования от введения первой дозы составляла приблизительно 20 недель.

Субъектов подвергали скринингу на день -28 - день -1 и удовлетворяющих критериям субъектов рандомизировали в 1 из 4 групп в день 1: плацебо; плацебо и RT; REGN1033; REGN1033 и RT. Соответствие субъектов критериям определяли с помощью стандартных процедур скрининга, а также скрининга в отношении нарушения когнитивных функций с использованием опросника Краткой шкалы оценки психического статуса (MMSE) и скрининга в отношении малоподвижного образа жизни с использованием опросника о физической активности CHAMPS 18 (Community Health Activities Model Program for Seniors 18).

Не позднее 2 недель до начала введения доз (день -14 - день -1) всех субъектов ознакомили с физическими упражнениями и измерениями мышечной силы и функции: жим ногами, жим лежа, сгибание ног, сгибание рук, динамическая сила кисти и ходьба по лестнице без нагрузки и с нагрузкой (8 шагов). Исходную силу верхней и нижней частей тела (определяемую с помощью 1-повторного максимума [1-RM] для жима лежа и жима ногами), максимальную динамическую силу кисти и силу при ходьбе по лестнице без нагрузки и с нагрузкой определяли для всех субъектов в пределах 2 недель (день -14 - день -1) до начала введения доз. Для каждого измерения силы/функции проводили 2 два теста для субъектов во всех 4 группах лечения в 2 отдельных визитах в пределах 2 недель до введения первой дозы исследуемого лекарственного средства, чтобы обеспечить ознакомление и обучение процедурам тестирования. Среднее значение указанных 2 измерений во время указанных 2 сеансов тестирования будут использовать в качестве исходного значения.

1-RM для каждого физического упражнения RT (жим лежа, жим ногами, сгибание ног и сгибание рук) измеряли в зале для занятий физическими упражнениями на оборудовании, используемом для физических тренировок на исходном уровне, на 4 неделе и на 8 неделе и которое использовали для расчета нагрузки для RT тренировки во время 1-4 недели, 5-8 недели и 9-12 недели. Физические тренировки проводили два раза в неделю в течение 12-недельного периода лечения. По меньшей мере 1 день разделял каждую сессию физических упражнений. В пределах 10 дней до начала введения доз (день -7 ± 3 дня) всех субъектов подвергли DEXA всего организма для определения общей и регионарной жировой массы и аппендикулярной массы нежировых тканей. Субъектов также подвергли MPT обоих бедер для определения объема мышц и SC и внутримышечного жира. Полученные значения служили в качестве исходного уровня для указанных параметров.

В день 1 и каждые 2 недели после этого всего 6 раз субъекты получали SC дозы исследуемого лекарственного средства (400 мг REGN1033 или плацебо), введенного в область живота в виде 2 инъекций по 2 мл каждая в место инъекции. Проводили наблюдение за субъектами в течение 30 мин в отношении основных показателей состояния организма и для сбора неблагоприятных явлений (АЕ), включая в себя возникновение реакций в месте инъекции. Акселерометрию использовали для мониторинга физической активности во время исследования.

Субъекты в группе 3 и 4 посещали место проведения выполняемых под контролем инструктора тренировок с сопротивлением низкой интенсивности основных групп мышц верхних и нижних конечностей с использованием оборудования для тренировок с сопротивлением два раза в неделю в течение 12 недель. Все физические упражнения в тренировке выполняли с относительно низкой интенсивностью, составляющей 50% 1-RM для каждого физического упражнения.

Все субъекты, завершающие исследование, проходили лабораторные исследования и оценку безопасности на 2, 4, 6, 8 и 10 неделе в дни 15, 29, 43, 57 и 71 (все с интервалом между визитами, составляющим ± 3 дня), если вводили последующие дозы исследуемого лекарственного средства. Субъектов подвергали последующему наблюдению в течение 10 недель после введения последней дозы (день 71), и они возвращались в клинику для лабораторных исследований и оценки безопасности на 12, 14, 16 и 20 неделе (дни 85 ± 3 , 99 ± 3 , 113 ± 3 и 141 ± 3 [до конца последнего предусмотренного исследованием визита]). Показатели эффективности (DEXA, MPT, мышечная сила и физическое функционирование) получали при скрининге и на 12 неделе (день 85 ± 3). DEXA и мышечную силу (двойной жим ногами, жим лежа и максимальный жим кистью) и физическое функционирование (сила ходьбы по лестнице) определяли на 6 неделе и 20 неделе. Электрокардиограммы получали в день 1, на 4 неделе, 8 неделе, 12 неделе и в конце

исследования. Эхокардиограммы проводили на 12 неделе (день 85 ± 3 дня).

Все субъекты получили инструкции носить прибор GT3X Actigraph (установленный на частоту регистрации - 30 Гц) на запястье в течение первых 2 недель исследования, начиная с визита в день 1 до дня 15, и в течение другого 14-дневного периода с дня 71 по день 85 (исключая периоды тренировок с сопротивлением в зале для занятий физическими упражнениями и во время сна). Субъекты возвращали прибор в место проведения исследования для загрузки данных (день 15 и день 85). Время, потраченное при различных уровнях активности, определяли на основании анализа порогового значения активности с использованием заданных границ определения. Оценки уровней метаболизма и расхода энергии определяли с помощью заранее установленных алгоритмов (Actigraph Corp).

Анализ образцов и статистика.

Первичную переменную эффективности, т.е. процентное изменение общей массы нежировых тканей с помощью двухэнергетической рентгеновской абсорбциометрии (DEXA) от исходного уровня до 12 недели анализировали с использованием подхода с применением модели со смешанными эффектами для повторных измерений (MMRM). Вторичные переменные эффективности анализировали сходным образом. Модель включала в себя факторы (фиксированные эффекты) для лечения (с 4 уровнями R1033 + RT, R1033 без RT, плацебо + RT и плацебо без RT), исходный слой (пол), визит, исходное значение и взаимосвязь лечения и визита в качестве ковариат. Производили сравнение первичной конечной точки между REGN1033 без RT и плацебо без RT. Такое же сравнение производили между REGN1033 с RT и плацебо с RT. Кроме того, исследовали эффект физических упражнений.

Результаты.

Во всех 4 группах лечения 93,8-96,6% рандомизированных субъектов завершили свой визит на 12 неделе. Только один субъект, в группе лечения плацебо отдельно, который прервал исследование вследствие неблагоприятного явления. % субъектов в каждой из групп: плацебо (PLC), плацебо + RT (PLC + RT), REGN1033 (R1033) и REGN1033 + RT (R1033+RT), которые получали все 6 доз исследуемого лекарственного средства, представлял собой 87,5%, 93,1%, 84,4% и 90,6% соответственно. Отсутствовал дисбаланс во всех группах в соблюдении либо лечения, либо RT. Демографические показатели являлись сбалансированными среди 4 групп, за исключением того, что группа плацебо характеризовалась повышенным процентным отношением (18,8%) темнокожих субъектов; и группа плацебо + RT характеризовалась повышенным процентным отношением (75,9%), а группа REGN1033 характеризовалась пониженным процентным отношением (56,3%) субъектов в возрасте старше 65 лет. Исходные значения для DEXA, MPT, мышечной силы и физического функционирования для каждой группы значимо не отличались друг от друга (данные не показаны).

Первичная цель исследования состояла в оценке эффекта REGN1033, с физическими упражнениями и без них, на общую безжировую массу тела, измеренную с помощью двухэнергетической рентгеновской абсорбциометрии (DEXA). Вторичные цели включают в себя оценки эффектов на безопасность и переносимость; эффектов на аппендикулярную массу нежировых тканей и жировую массу с помощью DEXA, эффектов на объем мышц бедра, измеренный с помощью MPT, силу верхней и нижней частей тела с помощью способов с использованием 1-повторного максимума, максимальной силы жима кистью и силы ходьбы по лестнице. Кроме того, исследовали потенциальные метаболические эффекты REGN1033 на HbA1C и HOMA-IR.

Первичную переменную эффективности, т.е. процентное изменение общей массы нежировых тканей с помощью двухэнергетической рентгеновской абсорбциометрии (DEXA) от исходного уровня до 12 недели анализировали с использованием подхода на основе модели со смешанными эффектами для повторных измерений (MMRM). Модель включала в себя факторы (фиксированные эффекты) для лечения (с 4 уровнями R1033 + RT, R1033 без RT, плацебо + RT и плацебо без RT), исходный слой (пол), визит, исходное значение и взаимосвязь лечения и визита в качестве ковариат. Производили сравнение первичной конечной точки между REGN1033 без RT и плацебо без RT. Такое же сравнение производили между REGN1033 с RT и плацебо с RT. Кроме того, исследовали эффект физических упражнений. Вторичные конечные точки эффективности с непрерывным результатом лечения анализировали с помощью способа, сходного с таковым для первичной конечной точки эффективности.

Дозы и режимы введения доз для настоящего исследования выбирали на основании результатов других исследований.

В завершеном SAD исследовании 76 здоровых волонтеров получали REGN1033 в дозах, составляющих вплоть до 10 мг/кг внутривенно (IV) и 400 мг SC. Среди них когорта лиц пожилого возраста из 8 здоровых волонтеров в возрасте 65-85 лет получала 6 мг/кг IV исследуемого лекарственного средства. Все дозы хорошо переносились; не наблюдали никаких клинически значимых сигналов о проблемах безопасности (данные не показаны).

Другое исследование разрабатывали для оценки безопасности, переносимости, фармакокинетики (PK), иммуногенности и фармакодинамических (PD) эффектов REGN1033, введенного SC, у здоровых волонтеров в возрасте 60 лет и старше. Исследовали всего 5 когорт с 12 субъектами, набранными в каждую когорту. Субъекты получали SC дозы REGN1033 (n=9) или плацебо (n=3). Запланированные режимы введения доз REGN1033 представляли собой 100, 200 или 400 мг Q2W всего 6 доз на каждого субъекта.

екта и 200 мг или 400 мг Q4W всего 3 дозы на каждого субъекта. Результаты исследования, показанные на фиг. 1А, указывают на то, что указанные дозы REGN1033 хорошо переносятся и связаны с увеличением массы нежировых тканей, обнаруженным с помощью DEXA.

Из указанных исследований PK и общие PD данные GDF8 указывают на то, что REGN1033 может достигать концентраций, связанных с насыщением поражения мишени во всем интервале доз для уровней доз, составляющих 400 мг Q4W и 400 мг Q2W. На уровне дозы, составляющей 100 мг Q4W, предполагают, что воздействия REGN1033 будут явно меньше, чем те, которые достигаются при повышенных дозах. Данные PK и PD из исследований 1 фазы указывают на то, что эта пониженная доза не будет достигать концентраций, ассоциированных с поражением мишени во всем интервале доз у всех индивидуумов.

Результаты для конечного результата в отношении первичной переменной эффективности показаны в табл. 1 и на фиг. 1В.

Таблица 1

	Неделя 12 REGN отдельно по сравн. с PBO отдельно	Неделя 12 REGN + RT по сравн. с PBO + RT	Неделя 12 REGN комб. по сравн. с PBO комб.	Неделя 12 PBO + RT по сравн. с PBO	Неделя 12 REGN + RT по сравн. с REGN	Модель MMRM эффект REGN	Модель MMRM эффект физичес- ких упражнений	Модель MMRM эффект взаимосвя- зи REGN и физичес- ких упражнений
Обобщенное представле- ние первичной эффектив- ности								
Процентное изменение общей безжировой массы согласно измерению с помощью двухэнерге- тической рентгенов- ской абсорбцио- метрии (DEXA) от исходного уровня	1,66% по сравн. с 1,79% (p=0,8640)	3,10% по сравн. с 0,25% (p<0,0001)	2,39% по сравн. с 0,79% (p=0,0048)	-0,25% по сравн. с 1,79% (p=0,0088)	3,10% по сравн. с 1,79% (p=0,0609)	(p=0,0008)	(p=0,6333)	(p=0,0124)

Без физических упражнений лечение с помощью REGN1033 (REGN) не увеличивало общую безжировую массу тела, измеренную с помощью DEXA, по сравнению с лечением плацебо (PBO) (скорректированное по плацебо изменение -0,13% p=0,8640, от исходного уровня до 12 недели). С физическими упражнениями лечение с помощью REGN1033 (REGN+RT) значительно увеличивало общую безжировую массу тела, измеренную с помощью DEXA, от исходного уровня до 12 недели по сравнению с лечением плацебо (PBO+RT) (скорректированное по плацебо увеличение, составляющее 3,34%, p <0,0001). См. табл. 1 и фиг. 1В. Процентное изменение в группе "плацебо + RT" является значимо более низким, чем в группе "плацебо отдельно": -0,25% по сравнению с 1,79% (p=0,0088), но группа "REGN1033 + RT" численно больше, чем группа "REGN1033 отдельно": 3,10% по сравнению с 1,66% (p=0,0609).

Факторная модель MMRM также показывает значимый эффект лечения с помощью REGN1033 на процентное изменение общей безжировой массы тела с помощью DEXA от исходного уровня до 12 недели (P=0,0008), которое сохранялось на 20 неделе (P=0,0004). Кроме того, MMRM также показывает эффект взаимосвязи (p=0,0124) между физическими упражнениями и лечением.

У субъектов, рандомизированных для получения тренировочных упражнений с сопротивлением с прогрессирующей нагрузкой, лечение с помощью REGN1033 (REGN+RT) значительно увеличивало аппендикулярную безжировую массу тела, измеренную с помощью DEXA от исходного уровня до 12 недели, по сравнению с лечением плацебо (PBO+RT) (различие невзвешенного маргинального среднего по сравнению с плацебо 4,34%, P=0,001). Как наблюдали в анализе общей безжировой массы тела, процентное изменение аппендикулярной массы нежировых тканей в группе "плацебо + RT" являлось значимо более низким, чем в группе "плацебо отдельно": 0,08% по сравнению с 2,25% (p=0,0200), но этот показатель в группе "REGN1033+ RT" являлся значимо более высоким, чем в группе "REGN1033 отдельно": 4,42% по сравнению с 2,30% (p=0,0217). Факторная модель MMRM также показывает значимый эффект лечения

(0,0008) и взаимосвязь между лечением и физическими упражнениями на 12 неделе ($p=0,0040$), которые сохраняются на 20 неделе. См. табл. 2 и фиг. 2.

Таблица 2

	Неделя 12 REGN отдельно по сравн. с PBO отдельно	Неделя 12 REGN + RT по сравн. с PBO + RT	Неделя 12 REGN комб. по сравн. с PBO комб.	Неделя 12 PBO + RT по сравн. с PBO	Неделя 12 REGN + RT по сравн. с REGN	Модель MMRM эффект REGN	Модель MMRM эффект физичес- ких упражнений	Модель MMRM эффект взаимосвя- зи REGN и физичес- ких упражнений
Процентное изменение аппендикуля- рной массы согласно измерению с помощью DEXA	2,30% по сравн. с 2,25% $d=0,04\%$ ($p=0,9617$)	4,42% по сравн. с 0,08% $d=4,34\%$ ($p<0,0001$)	3,37% по сравн. с 1,19% $d=2,18\%$ ($p=0,0015$)	0,08% по сравн. с 2,25% ($p=0,0200$)	4,42% по сравн. с 2,30% ($p=0,0217$)	($p=0,0008$)	($p=0,9728$)	($p=0,0040$)

Лечение с помощью REGN1033, с физическими упражнениями или без них, приводило к статистически значимым увеличениям объема мышц бедра согласно MPT. См. фиг. 3. Скорректированные по плацебо эффекты на объем мышц бедра согласно MPT (исключая внутримышечный жир и сосуды) на 12 неделе составляли +3,7%, $p=0,0006$ без физических упражнений (REGN отдельно) и +4,5%, $p<0,0001$ с физическими упражнениями (REGN+RT). Существует тенденция к увеличению мышцы бедра, включая в себя объем внутримышечного жира и сосудов в группе "REGN1033 отдельно" по сравнению с группой "плацебо отдельно" и к увеличению мышцы бедра, включая в себя объем внутримышечного жира и сосудов, в группе "REGN1033 + RT" по сравнению с группой "плацебо + RT". На 12 неделе невзвешенное маргинальное среднее значение процентного (%) изменения от исходного значения объема мышц бедра, включая в себя объем внутримышечного жира и сосудов (первоначальная шкала), в группах "плацебо отдельно", "плацебо + RT", "REGN1033 отдельно" и "REGN1033 + RT" составляет -0,03%, -0,434%, 2,076% и 3,405% соответственно. У субъектов, рандомизированных, чтобы не получать физические упражнения, лечение с помощью REGN1033 значимо увеличивало мышцу бедра, включая в себя объем внутримышечного жира и сосудов, согласно измерениям с помощью MPT от исходного уровня до 12 недели по сравнению с лечением плацебо (различие невзвешенного маргинального среднего по сравнению с плацебо 2,11%, $P=0,0139$). У субъектов, рандомизированных, чтобы получать тренировочные упражнения с сопротивлением с прогрессирующей нагрузкой, лечение с помощью REGN1033 значимо увеличивало мышцу бедра, включая в себя объем внутримышечного жира и сосудов, согласно измерению с помощью MRI от исходного уровня до 12 недели по сравнению с лечением с помощью плацебо (различие невзвешенного маргинального среднего по сравнению с плацебо 3,84%, $p<0,0001$).

Факторная модель MMRM также показывает значимый эффект лечения ($<0,0001$), но не эффект физических упражнений ($p=0,4453$). Взаимосвязь между лечением и физическими упражнениями на 12 неделе не является значимой ($p=0,1651$). Наблюдали увеличение безжировой массы тела согласно измерениям с помощью DEXA в получающей плацебо группе, которое не сопровождалось увеличением объема мышц согласно измерениям с помощью MPT. Причина этого несоответствия неизвестна.

Существует тенденция к увеличению гиноидной жировой массы в группе "плацебо отдельно" на 12 неделе по сравнению с другими группами лечения и к уменьшению гиноидной жировой массы в группе "REGN1033 + RT". На 12 неделе невзвешенное маргинальное среднее значение процентного (%) изменения от исходного уровня в группах "плацебо отдельно", "плацебо + RT", "REGN1033 отдельно" и "REGN1033 + RT" составляет 2,42%, -0,49%, -0,27% и -2,17% соответственно. См. фиг. 4. Факторная модель MMRM показывает тенденцию значимых эффектов лечения ($p=0,0824$) и физических упражнений (0,0531) на гиноидную жировую массу, но отсутствие взаимосвязи между физическими упражнениями и лечением ($p=0,8774$).

Также получали данные четырех измерений мышечной силы. Оборудование стандартизировали во всех местах проведения исследования для 1-RM измерений жима лежа и жима ногами, но не для измерений сгибания рук и сгибания ног. Более того, только у подгруппы субъектов производили измерения сгибания рук и сгибания ног.

Наблюдали тенденцию к увеличению силы жима ногами во всех группах. На 12 неделе невзвешенное маргинальное среднее значение процентного (%) изменения от исходного значения в группах "плацебо отдельно", "плацебо + RT", "REGN1033 отдельно" и "REGN1033 + RT" составляет 4,7%, 8,9%, 6,7% и 9,7% соответственно. Факторная модель MMRM не показала значимый эффект лечения ($p=0,8389$), но пограничный эффект физических упражнений ($p=0,0541$) на жим ногами. Эффект взаимосвязи между физическими упражнениями и лечением являлся незначимым ($p=0,8029$).

Существовала тенденция к увеличению силы жима лежа во всех группах. В группе "REGN1033 от-

дельно" этот показатель увеличивался больше по сравнению с группой "плацебо отдельно", и в группе "REGN1033 + RT" также показатель увеличивался больше по сравнению с "плацебо + RT". См. фиг. 5. На 12 неделе невзвешенное маргинальное среднее значение процентного (%) изменения от исходного значения в группах "плацебо отдельно", "плацебо + RT", "REGN1033 отдельно" и "REGN1033 + RT" представляет собой 2,2%, 10,5%, 10,4% и 15,3% соответственно. У субъектов, рандомизированных, чтобы не получать тренировочные упражнения с сопротивлением с прогрессирующей нагрузкой, лечение с помощью REGN1033 увеличивало силу жима лежа от исходного уровня до 12 недели по сравнению с лечением с помощью плацебо (различие невзвешенного маргинального среднего по сравнению с плацебо 8,2%, $P=0,0524$). У субъектов, рандомизированных, чтобы получать тренировочные упражнения с сопротивлением с прогрессирующей нагрузкой, лечение с помощью REGN1033 численно увеличивало жим лежа от исходного уровня до 12 недели по сравнению с лечением с помощью плацебо, но это не являлось значимым (различие невзвешенного маргинального среднего по сравнению с плацебо 5,3%, $P=0,2316$). Факторная модель MMRM показала значимые эффекты лечения ($p=0,0525$) и статистически значимый эффект физических упражнений (0,0272) на жим лежа и отсутствие эффекта взаимосвязи ($p=0,5089$) между физическими упражнениями и лечением.

Существовала тенденция к увеличению силы сгибания ног во всех группах вплоть до 12 недели. На 12 неделе невзвешенное маргинальное среднее значение процентного (%) изменения от исходного значения в группах "плацебо отдельно", "плацебо + RT", "REGN1033 отдельно" и "REGN1033 + RT" составляло 5,3%, 16,3%, 10,4% и 9,7% соответственно. Изменение в силе сгибания ног в группе "REGN1033 отдельно" являлось на 5,1% выше, чем в группе "плацебо отдельно", тем не менее, в группе "REGN1033 + RT" являлось на 6,6% ниже, чем в группе "плацебо + RT". Процентное изменение в группе "плацебо + RT" являлось значимо выше, чем в группе "плацебо отдельно": 16,3% по сравнению с 5,30% ($p=0,0050$), тем не менее в группе "REGN1033 + RT" не было выше, чем в группе "REGN1033 отдельно": 9,79% по сравнению с 10,4% ($p=0,8388$). Факторная модель MMRM не показала значимый эффект взаимосвязи ($p=0,0229$) между физическими упражнениями и лечением.

Существовала тенденция к увеличению силы сгибания рук во всех группах (данные не показаны). На 12 неделе невзвешенное маргинальное среднее значение процентного (%) изменения от исходного значения в группах "плацебо отдельно", "плацебо + RT", "REGN1033 отдельно" и "REGN1033 + RT" составляет 8,1%, 21,7%, 12,4% и 15,7% соответственно. У субъектов, рандомизированных, чтобы не получать тренировочные упражнения с сопротивлением с прогрессирующей нагрузкой, лечение с помощью REGN1033 увеличивало силу сгибания рук от исходного уровня до 12 недели по сравнению с плацебо, но указанное различие не являлось статистически значимым (различие невзвешенного маргинального среднего по сравнению с плацебо 4,3%, $P=0,4589$).

У субъектов, рандомизированных, чтобы получать тренировочные упражнения с сопротивлением с прогрессирующей нагрузкой, лечение с помощью REGN1033 меньше увеличивало силу сгибания рук от исходного уровня до 12 недели по сравнению с плацебо, но это не являлось значимым (различие невзвешенного маргинального среднего по сравнению с плацебо -6,0%, $P=0,3121$). Факторная модель MMRM не показала значимый эффект лечения с помощью REGN1033 ($p=0,8958$), пограничные эффекты физических упражнений ($p=0,053$) и отсутствие значимого эффекта взаимосвязи ($p=0,1318$) между физическими упражнениями и лечением.

Существовала тенденция к увеличению силы жима доминантной кистью в группах, получавших REGN1033 (данные не показаны). На 12 неделе невзвешенное маргинальное среднее значение процентного (%) изменения от исходного значения в группах "плацебо отдельно", "плацебо + RT", "REGN1033 отдельно" и "REGN1033 + RT" составляло 1,8%, 1,2%, 4,8% и 5,0% соответственно. У субъектов, рандомизированных, чтобы не получать тренировочные упражнения с сопротивлением с прогрессирующей нагрузкой, лечение с помощью REGN1033 увеличивало силу жима доминантной кистью от исходного уровня до 12 недели по сравнению с плацебо, но это не являлось значимым (различие невзвешенного маргинального среднего по сравнению с плацебо 3,0%, $P=0,4180$). У субъектов, рандомизированных, чтобы получать тренировочные упражнения с сопротивлением с прогрессирующей нагрузкой, лечение с помощью REGN1033 больше увеличивало силу жима доминантной кистью от исходного уровня до 12 недели по сравнению с плацебо, но это не являлось значимым (различие невзвешенного маргинального среднего по сравнению с плацебо 3,8%, $P=0,3198$). Факторная модель MMRM показывает статистически значимый эффект лечения с помощью REGN1033 ($p=0,0407$), но отсутствие эффекта физических упражнений ($p=0,7033$) или взаимосвязи между физическими упражнениями и лечением ($p=0,8283$).

Существовала тенденция к увеличению силы жима недоминантной кистью в группах, получавших REGN1033, но не в группах, получавших плацебо (данные не показаны). На 12 неделе невзвешенное маргинальное среднее значение процентного (%) изменения от исходного значения в группах "плацебо отдельно", "плацебо + RT", "REGN1033 отдельно" и "REGN1033 + RT" составляло 1,8%, -0,8%, 7,0% и 4,2% соответственно. У субъектов, рандомизированных, чтобы не получать тренировочные упражнения с сопротивлением с прогрессирующей нагрузкой, лечение с помощью REGN1033 больше увеличивало силу жима недоминантной кистью от исходного уровня до 12 недели по сравнению с плацебо, но это не являлось значимым (различие невзвешенного маргинального среднего по сравнению с плацебо 5,1%,

$P=0,1432$). У субъектов, рандомизированных, чтобы получать тренировочные упражнения с сопротивлением с прогрессирующей нагрузкой, лечение с помощью REGN1033 больше увеличивало силу жима недоминантной кистью от исходного уровня до 12 недели по сравнению с плацебо, но это не являлось значимым (различие невзвешенного маргинального среднего по сравнению с плацебо 5,0%, $P=0,1708$). Факторная модель MMRM показала статистически значимый эффект лечения с помощью REGN1033 ($p=0,0039$) и пограничную значимость эффекта физических упражнений ($p=0,0581$) на силу жима недоминантной кистью. Отсутствовал эффект взаимосвязи между физическими упражнениями и лечением ($p=0,6224$).

Существовала тенденция к увеличению силы ходьбы по лестнице с нагрузкой во всех группах (данные не показаны). На 12 неделе невзвешенное маргинальное среднее значение процентного (%) изменения от исходного значения в группах "плацебо отдельно", "плацебо + RT", "REGN1033 отдельно" и "REGN1033 + RT" составляло 5,6%, 12,9%, 12,2% и 15,0% соответственно. У субъектов рандомизированных, чтобы не получать тренировочные упражнения с сопротивлением с прогрессирующей нагрузкой, лечение с помощью REGN1033 больше увеличивало силу ходьбы по лестнице с нагрузкой от исходного уровня до 12 недели по сравнению с плацебо, но это не являлось значимым (различие невзвешенного маргинального среднего по сравнению с плацебо 6,6%, $P=0,1303$). У субъектов, рандомизированных, чтобы получать тренировочные упражнения с сопротивлением с прогрессирующей нагрузкой, лечение с помощью REGN1033 больше увеличивало силу ходьбы по лестнице с нагрузкой от исходного уровня до 12 недели по сравнению с плацебо, но это не являлось значимым (различие невзвешенного маргинального среднего по сравнению с плацебо 2,2%, $P=0,6368$). Факторная модель MMRM не показала статистически значимый эффект лечения ($p=0,3612$) или взаимосвязь между физическими упражнениями и лечением ($p=0,8043$), но показала статистически значимый эффект физических упражнений ($p=0,0151$) при ходьбе по лестнице с нагрузкой.

Существовала тенденция к увеличению силы ходьбы по лестнице без нагрузки во всех группах. На 12 неделе невзвешенное маргинальное среднее значение процентного (%) изменения от исходного значения в группах "плацебо отдельно", "плацебо + RT", "REGN1033 отдельно" и "REGN1033 + RT" составляло 6,1%, 12,5%, 5,4%, и 9,8% соответственно. Отсутствовало различие между группами, получившими REGN1033 и плацебо. Факторная модель MMRM не показала статистически значимый эффект лечения ($p=0,4670$) или взаимосвязь между лечением и физическими упражнениями ($p=0,4180$), но показала статистическую значимость эффекта физических упражнений ($p=0,0295$). Процентное изменение в группе "плацебо + RT" было выше, чем в группе "плацебо отдельно" 12,5% по сравнению с 6,1% ($p=0,0900$), и в группе "REGN1033 + RT" выше, чем в группе "REGN1033 отдельно": 9,8% по сравнению с 5,4% ($p=0,2253$), тем не менее указанные различия не являются статистически значимыми.

Лечение с помощью REGN1033 и тренировочные упражнения с сопротивлением (RT), как правило, хорошо переносились в исследовании. Результаты связанных с лечением неблагоприятных явлений (TEA) показаны в табл. 3.

Таблица 3

	Плацебо		REGN1033	
	Отдельно	RT	400 мг	400 мг + RT
	(N=32)	(N=29)	(N=32)	(N=32)
Число TEAE	151	103	129	98
Число серьезных TEAE	1	1	3	0
Субъекты по меньшей мере с одним TEAE	26 (81,3%)	27 (93,1%)	27 (84,4%)	28 (87,5%)
Субъекты по меньшей мере с одним связанным с лекарственным средством TEAE	10 (31,3%)	6 (20,7%)	14 (43,8%)	10 (31,3%)
Субъекты по меньшей мере с одним серьезным TEAE	1 (3,1%)	1 (3,4%)	2 (6,3%)	0
Субъекты с TEAE, являющимися результатом прекращения приема исследуемого лекарственного средства	3 (9,4%)	1 (3,4%)	1 (3,1%)	0
Субъекты с TEAE, которые привели к смерти	0	0	0	0

Отсутствовали зарегистрированные смертельные исходы в настоящем исследовании, и в общем 5 серьезных TEAS произошли у 4 субъектов, включая в себя перелом стопы у 1 субъекта в группе "плацебо отдельно"; холецистит у 1 субъекта в группе "плацебо + RT", стрессовую кардиомиопатию у 1 субъек-

та в группе "REGN1033" и гипокалиемию и гипотензию у 1 субъекта в группе "REGN1033". Отсутствовали сообщения о серьезных TEAE в группе "REGN1033 + RT". У субъектов в группе "плацебо отдельно" регистрировали больше TEAE и связанных с лечением TEAE по сравнению с другими группами. Количество и процентное отношение субъектов, испытывающих по меньшей мере одно TEAE, являлись сходными во всех группах лечения: 26 (81,3%) в группе "плацебо отдельно", 27 (93,1%) в группе "плацебо + RT", 27 (84,4%) в группе "REGN1033" и 28 (87,5%) в группе "REGN1033 + RT" соответственно. Всего 5 субъектов (3 и 1 в группах "плацебо" и "плацебо + RT" по сравнению с 1 и 0 субъектами в группах "REGN1033" и "REGN1033 + RT" соответственно) прекратили лечение с помощью лекарственного средства вследствие TEAE.

В категориях потенциально клинически значимых значений (PCSV) основных показателей состояния организма, ЭКГ и гематологии, отсутствовали данные о несбалансированной более высокой частоте сигналов в отношении PCSV в группах лечения с помощью REGN1033. Наблюдали численно большее количество субъектов с химическими PCSV в группе "REGN1033 комбинированный", чем наблюдали в группе "плацебо комбинированное". Повышенные значения креатинкиназы, составляющие >3-кратного увеличения от верхней границы нормы, наблюдали у 2 (6,3%), 1 (3,4%), 2 (6,3%) и 4 (12,5%) субъектов в группе "плацебо отдельно", "плацебо + RT", "REGN1033" и "REGN1033 + RT" соответственно. Не наблюдали появления значений креатинкиназы >10-кратного увеличения от верхней границы нормы (табл. 14.3.4.2.3). Больше субъектов в получивших лечение с помощью REGN1033 группах (7 [10,9%]) характеризовались увеличением массы тела >5%, чем в получивших лечение с помощью плацебо группах (3, [4,9%], табл. 14.3.5.1.2).

Обзор параметров эхокардиограммы, связанных со структурой и функцией сердца, не выявил какого-либо сигнала о гипертрофии сердца или любых других вредных эффектов на функцию сердца. Лечение с помощью REGN1033 не характеризовалось эффектом на фракцию выброса левого желудочка, толщину стенки LV или толщину межжелудочковой перегородки. Отсутствовали зарегистрированные увеличения индекса массы LV или индекса массы LV или в получивших REGN1033, или в получивших плацебо группах лечения (данные не показаны).

Выводы.

Вместе с физическими упражнениями лечение с помощью REGN1033 значительно увеличивало общую безжировую массу тела у здоровых субъектов согласно измерению с помощью DEXA от исходного уровня до 12 недели по сравнению с лечением с помощью плацебо (3,1% по сравнению с -0,2%, <0,0001). Без физических упражнений лечение с помощью REGN1033 не значительно увеличивало общую безжировую массу тела, измеренную с помощью DEXA, по сравнению с лечением с помощью плацебо.

Для вторичных конечных точек эффективности результаты аппендикулярной массы нежировых тканей с помощью DEXA согласуются с результатами, наблюдаемыми для общей безжировой массы тела с помощью DEXA. Лечение с помощью REGN1033, с физическими упражнениями или без них, приводило к статистически значимым увеличениям в объеме мышц бедра согласно МРТ, исключая внутримышечный жир и сосуды, на 12 неделе по сравнению с лечением с помощью плацебо (скорректированное по плацебо увеличение составило 3,7%, $P=0,0006$ без физических упражнений и 4,5%, $P<0,0001$ с физическими упражнениями).

Тренировочные упражнения с сопротивлением (RT) в настоящем исследовании являлись хорошо переносимыми в этой группе населения пожилого возраста. Значимые эффекты физических упражнений продемонстрировали с помощью модели MMRM в большинстве измерений силы/функциональности. Указанный уровень физических упражнений RT не приводил к значимому увеличению массы нежировых тканей согласно измерениям с помощью DEXA или объема мышц согласно измерениям с помощью МРТ. Лечение с помощью REGN1033 также характеризовалось тенденцией к эффектам на некоторые конечные точки в отношении силы и функциональности, исследуемые в настоящем исследовании. Положительные эффекты наблюдали в следующих функциях: жим лежа силу, динамическая сила кисти и ходьба по лестнице с нагрузкой.

В общем, 400 мг Q2W REGN1033 SC, как правило, являлись хорошо переносимыми в настоящем испытании. Количество пациентов, сообщающих о TEAE, являлось сопоставимым во всех группах лечения. Обзор TEAE не выявил значимого сигнала о проблеме безопасности. Исследования эхокардиограмм не выявили вредных эффектов на структуру или функцию сердца.

Пример 3. Протокол клинического испытания лечения с помощью антитела к GDF8 субъектов с саркопенией с физическими упражнениями и без них.

Проводили рандомизированное, двойное слепое, плацебо-контролируемое, многоцентровое исследование фазы 2 безопасности и эффективности 3-месячного SC лечения с помощью REGN1033 у пациентов с саркопенией. 250 пациентов набирали в исследование, в 4 группах лечения. Удовлетворяющие критериям пациенты представляли собой мужчин и женщин с саркопенией и связанным с ней нарушением подвижности, в возрасте 70 лет и старше, со средним возрастом, составляющим 78 лет. Пациентов рандомизировали в соотношении 1:1:1:1 для получения плацебо SC каждые 2 недели (Q2W) всего 6 введений, REGN1033 в дозе 300 мг SC Q2W всего 6 введений, REGN1033 в дозе 300 мг SC каждые 4 недели (Q4W) всего 3 введения (чередую введение плацебо через неделю), и REGN1033 в дозе 100 мг SC Q4W

всего 3 введения (чередую введение плацебо через неделю). Исследование характеризовалось периодом скрининга/периодом до лечения (день -28 - день -1), 12-недельным периодом лечения (день 1 - день 85) и 8-недельным периодом последующего наблюдения (по день 141).

Процедуры скрининга и процедуры до лечения (день -28 - день -1).

Последовательный процесс скрининга происходил во время 3 визитов, при этом предварительное соответствие критериям определяли в 1 визит, а предшествующие лечению процедуры проводили во 2 и 3 визиты. Если это было возможным в местах проведения исследования, визит 1 и визит 2 проводили в одно и то же время, если это так, процедуры визита 2 проводили не позднее 21 дня от первой дозы исследуемого лекарственного средства. Предварительное соответствие критериям определяли в 1 визите с помощью стандартных процедур скрининга, а также скорости походки на расстояние 4 м [4 M] и балла по Краткой шкале оценки психического статуса (MMSE). Пациенты, удовлетворяющие критериям предварительного соответствия, возвращались в клинику на визит 2 и визит 3 для предшествующих лечению начальных процедур и измерений.

Процедуры включали в себя стандартные оценки безопасности и лабораторных исследований, сканирование с помощью DEXA, эхокардиограммы, измерения силы (жим ногами, жим лежа и динамическая сила кисти) и функциональные измерения (ходьба по лестнице, краткая батарея тестов для оценки физической работоспособности [SPPB], скорость походки на расстояние 4 м и тест 6-минутной ходьбой [6MWT]).

Период лечения и введение исследуемого лекарственного средства (день 1 - день 85).

Начиная с дня 1 пациентов рандомизировали для получения или REGN1033, или соответствующего плацебо. Дозы являлись следующими:

300 мг SC Q2W всего 6 введений,

300 мг SC Q4W всего 3 введения (чередую введение плацебо через неделю для поддержания слепого формата),

100 мг SC Q4W всего 3 введения (чередую введение плацебо через неделю для поддержания слепого формата),

совпадающее плацебо SC Q2W всего 6 введений.

Инъекции вводили в область живота. За пациентами наблюдали в течение 30 мин в отношении основных показателей состояния организма и для сбора неблагоприятных явлений (АЕ), включая в себя возникновение реакций в месте инъекции. Проводили процедуры определения эффективности и безопасности, а также регистрировали сообщаемые пациентами конечные результаты (PRO). Образцы крови собирали для определения фармакокинетики (РК), антител к лекарственному средству (АДА) и исследования. Все образцы крови собирали после ночного голодания и перед введением дозы.

Последующее наблюдение (день 86 - день 141).

Визиты для последующего наблюдения осуществляли в день 141, на 8 неделе после окончания визита для лечения в день 85.

Конечные точки.

Первичная конечная точка в исследовании представляла собой процентное изменение общей безжировой массы тела согласно измерениям с помощью DEXA от исходного уровня до 12 недели. Вторичные конечные точки представляли собой TEAE от исходного значения до конца исследования, изменения от исходного значения в аппендикулярной массе нежировых тканей с помощью DEXA, максимальная сила жима ногами, 1-повторный максимум (1-RM), максимальная сила жима лежа (1-RM), скорость походки на расстояние 4 м, SPPB и части шкалы SPPB, расстояние, пройденное в тесте 6MWT, регионарная и общая жировая масса согласно измерениям с помощью DEXA и сила жима кистью согласно измерениям с помощью ручного динамометра.

Процедуры и оценки.

Безопасность и переносимость REGN1033 оценивали по основным показателям состояния организма, электрокардиограмме (ЭКГ), эхокардиограмме, неблагоприятным явлениям (АЕ) и клиническим лабораторным исследованиям. Пациентов просили осуществлять мониторинг и сообщать обо всех АЕ, испытанных от момента подписания проинформированного согласия до окончания предусмотренного исследованием визита.

Эффективность оценивали с помощью DEXA, измерений силы (жим ногами, жим лежа и динамическая сила кисти) и функциональных измерений (ходьба по лестнице, SPPB, скорость походки на 4 м и 6MWT). Другие используемые измерения представляли собой акселерометрию и PRO (форма оценки физического функционирования из 10 пунктов [PF-10], Шкала усталости в опроснике функциональной оценки терапии хронического заболевания [FACIT], опросник оценки состояния здоровья: индекс инвалидизации [HAQ-DI], краткая форма миниопросника нутриционного статуса [MNA-SF] и опросник быстрой оценки физической активности [RAPA]).

Результаты.

95% рандомизированных пациентов завершили исследование. Как показано ниже в табл. 4, в каждом из трех исследуемых режимов дозирования лечение с помощью REGN1033 значительно увеличивало общую безжировую массу тела от исходного уровня до 12 недели по сравнению с плацебо; средние раз-

личия от плацебо составляли 1,7% ($p=0,008$), 1,8% ($p=0,004$) и 2,3% ($p<0,001$) для REGN1033 100 мг SC Q4W, 300 мг Q4W и 300 мг Q2W соответственно, что соответствовало увеличению массы нежировых тканей, составляющим 0,7, 0,8 и 1,0 кг. Аппендикулярная масса нежировых тканей также значительно увеличивалась у пациентов, получивших лечение с помощью REGN1033: скорректированные по плацебо изменения находились в диапазоне, составляющем 2,3-2,8%. Измеренные с помощью DEXA общая жировая масса, андройдная жировая масса и гиноидная жировая масса показали численные уменьшения за счет лечения с помощью REGN1033. Лечение с помощью REGN1033 приводило к направленно большим средним изменениям от исходного значения в различных измерениях силы и функции относительно плацебо.

Таблица 4

	REGN 100 мг Q4W (n=62) по сравнению с PBO (n=65)	REGN 300 мг Q4W (n=64) по сравнению с PBO (n=65)	REGN 300 мг Q2W (n=59) по сравнению с PBO (n=65)
Первичная конечная точка эффективности: DEXA – Процентное изменение от исходного уровня до 12 недели			
Процентное изменение общей массы нежировых тканей согласно измерению с помощью двухэнергетической рентгеновской абсорбциометрии (DEXA) от исходного уровня	1,191% по сравнению с -0,474% d=1,664% ($p=0,0077$)	1,308% по сравнению с -0,474% d=1,781% ($p=0,0043$)	1,816% по сравнению с -0,474% d=2,289% ($p=0,0004$)
Обобщенное представление вторичных конечных точек эффективности: DEXA - Процентное изменение от исходного уровня до 12 недели			
Процентное изменение аппендикулярной массы нежировых тканей согласно измерениям с помощью DEXA	2,162% по сравнению с -0,249% d=2,412% ($p=0,0026$)	2,033% по сравнению с -0,249% d=2,282% ($p=0,0043$)	2,502% по сравнению с -0,249% d=2,751% ($p=0,0008$)
Процентное изменение общей жировой массы (г) согласно измерениям с помощью DEXA	-0,077% по сравнению с -0,076% d=-0,001% ($p=0,9993$)	-2,666% по сравнению с -0,076% d=-2,590% ($p=0,0099$)	-0,947% по сравнению с -0,076% d=-0,871% ($p=0,3945$)
Процентное изменение андройдной жировой массы (г) согласно измерениям с помощью DEXA	-0,496% по сравнению с 2,501% d=-2,998% ($p=0,0587$)	-3,164% по сравнению с 2,501% d=-5,665% ($p=0,0004$)	-2,209% по сравнению с 2,501% d=-4,710% ($p=0,0038$)
Процентное изменение от исходного значения в гиноидной жировой массе (г) согласно измерениям с помощью DEXA	0,022% по сравнению с 0,156% d=-0,135% ($p=0,9050$)	-2,608% по сравнению с 0,156% d=-2,751% ($p=0,0152$)	-2,185% по сравнению с 0,156% d=-2,341% ($p=0,0434$)

REGN1033, как правило, являлся безопасным и хорошо переносимым. Частота неблагоприятных явлений являлась сходной во всех группах лечения. Процентное отношение субъектов, испытавших по меньшей мере одно SAE, также являлось сходным во всех группах лечения (7,7% в получавшей плацебо группе по сравнению с 7,4% в получавших лечение с помощью REGN1033 группах). Отсутствовал различимый профиль распределения SAE. Отсутствовали клинически значимые тенденции, наблюдаемые для лабораторных исследований, основных показателей состояния организма, ЭКГ и эхокардиограмм.

Выводы.

Лечение с помощью REGN1033 значительно увеличивало общую безжировую и аппендикулярную массу нежировых тканей у пациентов с саркопенией и являлось хорошо переносимым.

Настоящее изобретение не ограничено в своем объеме конкретными вариантами осуществления, описанными в настоящем документе. Более того, различные модификации согласно настоящему изобретению в дополнение к описанным в настоящем документе станут очевидными специалистам в настоящей области техники из представленного выше описания и прилагаемых фигур. Предполагается, что такие модификации подпадают под объем прилагаемой формулы изобретения. Все публикации, ссылки на которые представлены в настоящем документе, включены в настоящий документ посредством ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ увеличения безжировой массы тела у субъекта человека, предусматривающий:

а) обеспечение режима физических упражнений для субъекта, при котором режим физических упражнений включает в себя тренировку с сопротивлением с прогрессирующей нагрузкой, и

б) введение композиции, содержащей эффективное количество ингибитора GDF8, при котором ингибитор GDF8 представляет собой антитело к GDF8 человека или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связывают GDF8, и

где антитело или его фрагмент содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи HCDR1, HCDR2, HCDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 362/364/366 соответственно; и три определяющие комплементарность области легкой цепи LCDR1, LCDR2, LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 370/372/374 соответственно.

2. Способ лечения заболевания, нарушения или состояния, ассоциированного с активностью GDF8, и который может быть улучшен путем увеличения безжировой массы тела у субъекта человека, причем заболевание или нарушение выбирают из группы, состоящей из саркопении, кахексии, травмы мышцы, истощения мышечной ткани, мышечной атрофии и спорадического миоизита с включениями (sIBM), предусматривающий:

а) обеспечение режима физических упражнений для субъекта, при котором режим физических упражнений включает в себя тренировку с сопротивлением с прогрессирующей нагрузкой, и

б) введение нуждающемуся в этом субъекту композиции, содержащей эффективное количество ингибитора фактора роста и дифференцировки 8 (GDF8), при котором ингибитор GDF8 представляет собой антитело к GDF8 человека или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связывают GDF8, и

где антитело или его фрагмент содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи HCDR1, HCDR2, HCDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 362/364/366 соответственно; и три определяющие комплементарность области легкой цепи LCDR1, LCDR2, LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 370/372/374 соответственно.

3. Способ по п.2, при котором кахексия является либо идиопатической, либо вторичной по отношению к другим состояниям, выбранным из группы, состоящей из злокачественной опухоли, хронической почечной недостаточности или хронического обструктивного заболевания легких.

4. Способ по п.2, где мышечная атрофия или мышечное истощение вызваны или связаны с отсутствием функциональной нагрузки на мышцы, иммобилизацией, постельным режимом, травмой, медицинским лечением или хирургическим вмешательством.

5. Способ по любому из пп.1-4, при котором эффективное количество составляет по меньшей мере 400 мг.

6. Способ по любому из пп.1-5, при котором эффективное количество включает в себя режим введения доз, выбранный из группы, состоящей из одноразовой дозы, составляющей 0,01-20 мг/кг массы тела, 0,1-10 мг/кг массы тела или 0,1-5 мг/кг массы тела.

7. Способ по любому из пп.1-6, при котором тренировка с сопротивлением включает в себя комплекс физических упражнений для тренировки мышц, выбранных из группы, состоящей из мышц доминантной кисти, недоминантной кисти, ноги, руки, мышцы спины, мышцы живота, мышцы плеча, ягодичной мышцы, мышцы груди и их комбинаций.

8. Способ по любому из пп.1-7, при котором введение ингибитора GDF8 в количестве, эффективном для увеличения безжировой массы тела, не приводит к неблагоприятным побочным эффектам на миокард и/или функцию сердца.

9. Способ по любому из пп.1-8, при котором композицию вводят по меньшей мере раз в шесть недель, раз в пять недель, раз в четыре недели, раз в три недели, раз в две недели, один раз в неделю, два раза в неделю, три раза в неделю, четыре раза в неделю или пять раз в неделю.

10. Способ по любому из пп.1-9, при котором композицию составляют для внутривенного или подкожного введения.

11. Способ по любому из пп.1-10, при котором антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность вариативной области тяжелой цепи (HCVR) SEQ ID NO: 360 и аминокислотную последовательность вариативной области легкой цепи (LCVR) SEQ ID NO: 368.

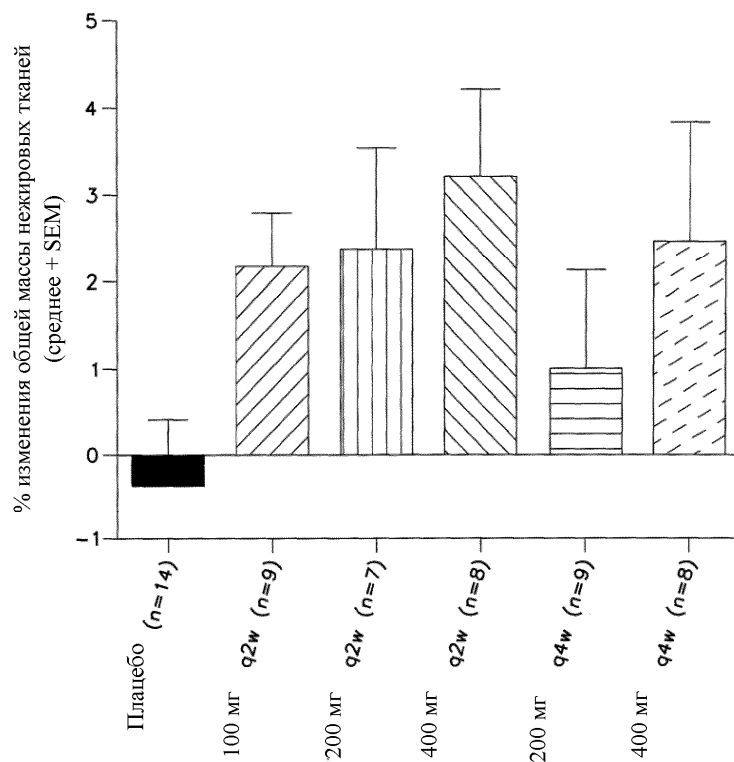
12. Способ по любому из пп.1-11, при котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывает эпитоп зрелого белка GD8 SEQ ID NO: 340 в пределах аминокислотных остатков 48-72.

13. Способ по любому из пп.1-12, при котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой мультиспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое может связывать 2 или больше эпитопов GDF8.

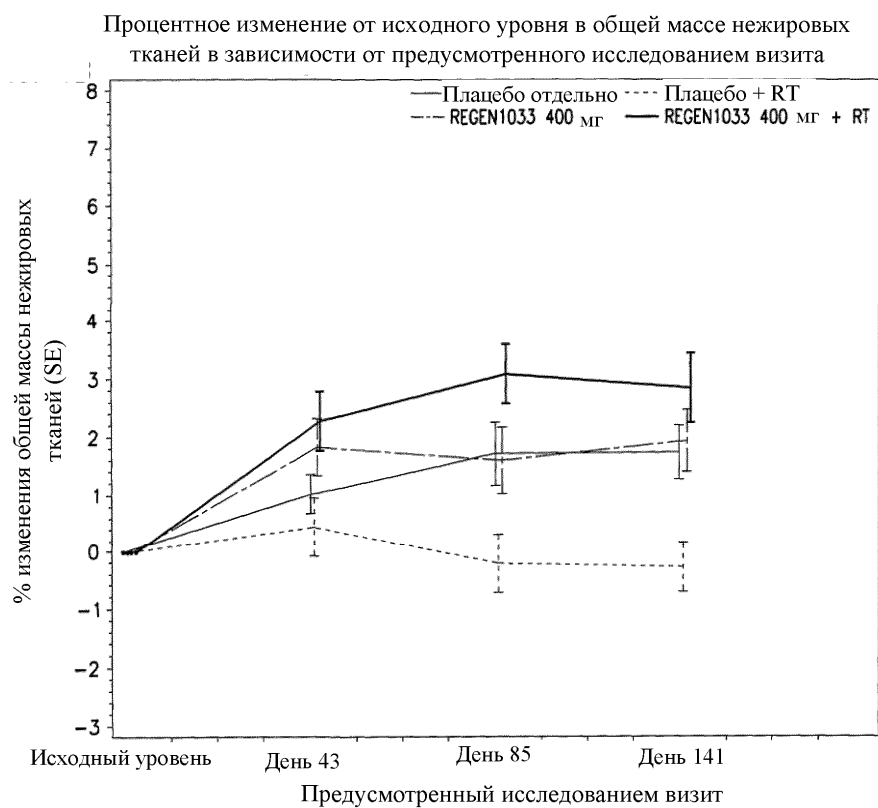
14. Способ по любому из пп.1-13, при котором антитело к GDF8 или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент.

15. Способ по любому из пп.1-14, при котором возраст субъекта составляет 60 лет или старше.

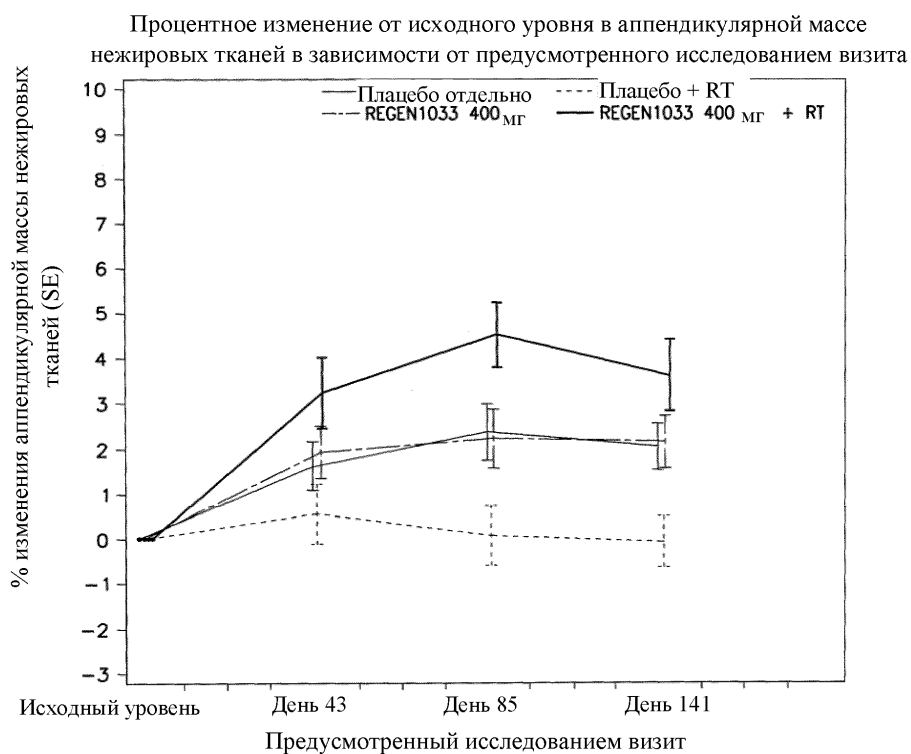
16. Способ по любому из пп.1-15, при котором тренировку с сопротивлением с прогрессирующей нагрузкой осуществляют по меньшей мере один раз в неделю в течение по меньшей мере 12 недель.



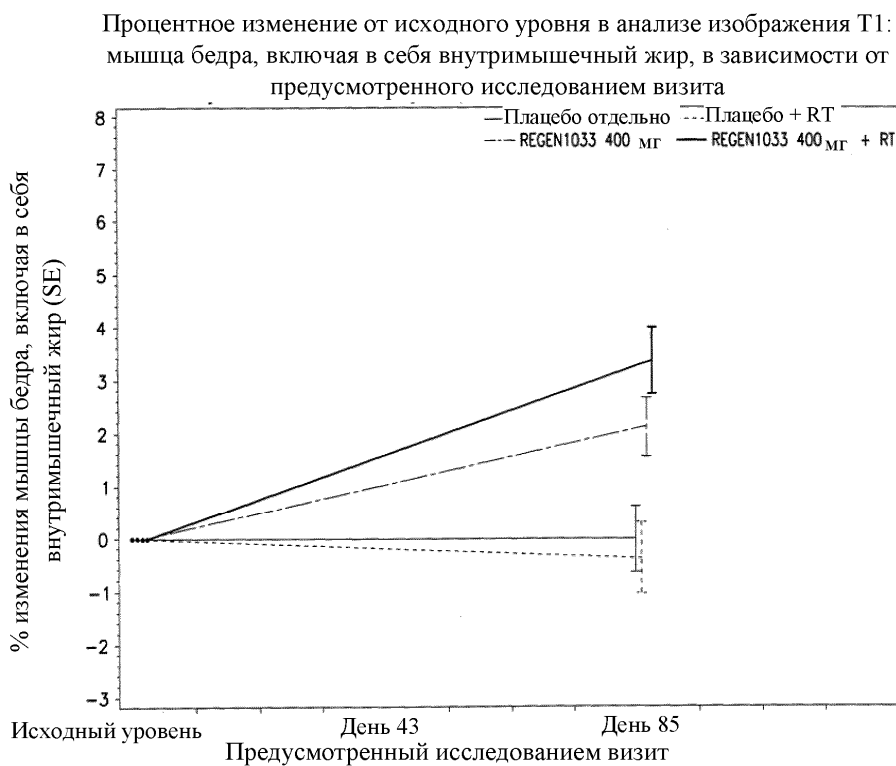
Фиг. 1А



Фиг. 1В

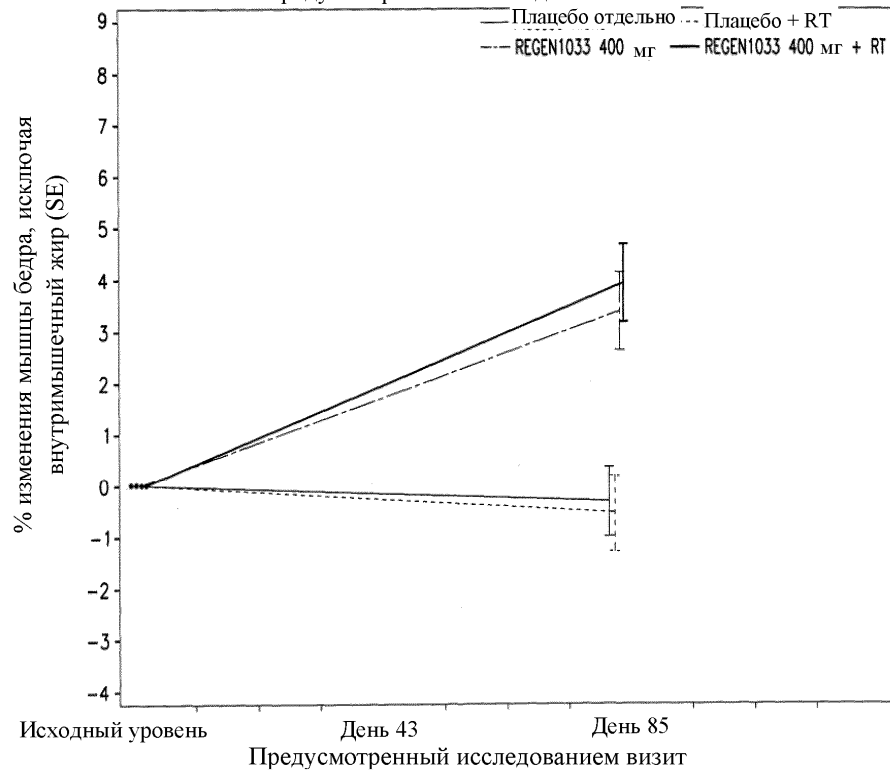


Фиг. 2

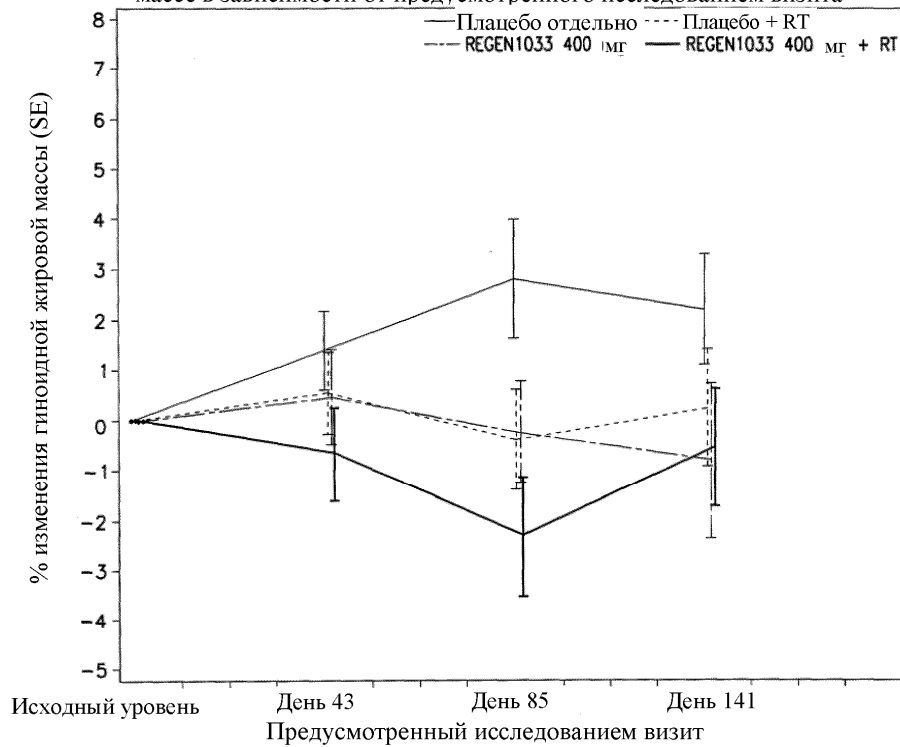


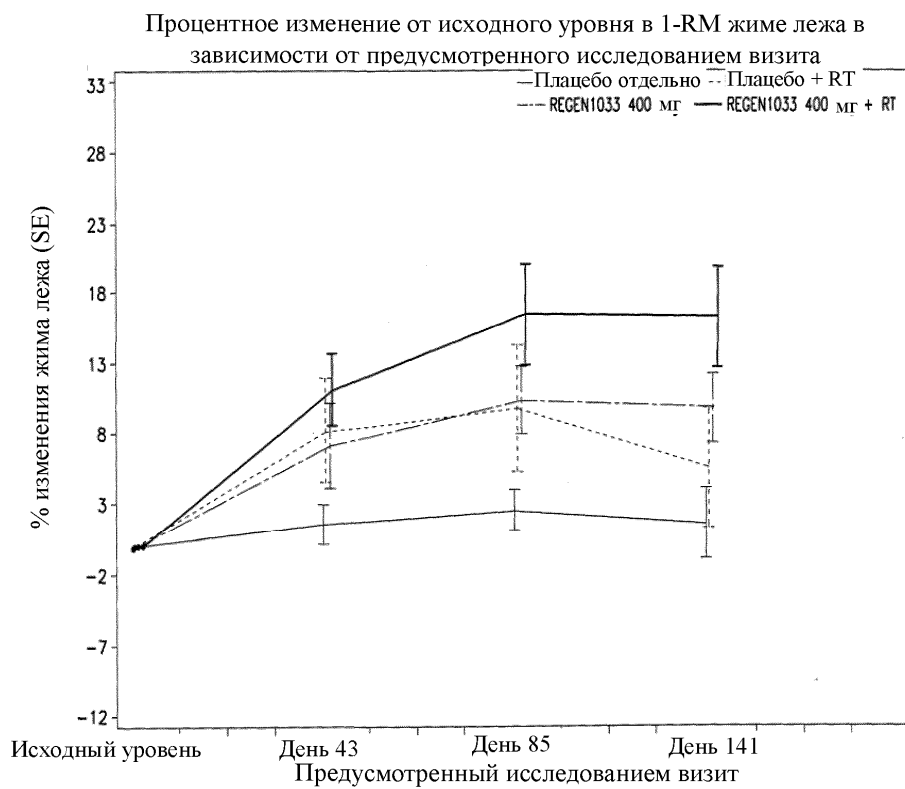
Фиг. 3А

Процентное изменение от исходного уровня в анализе изображения T1:
мышца бедра, исключая внутримышечный жир, в зависимости от
предусмотренного исследованием визита



Процентное изменение от исходного уровня в гиноидной жировой
массе в зависимости от предусмотренного исследованием визита





Фиг. 5



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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