

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202292310** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.10.17

(22) Дата подачи заявки
2021.02.10

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 19/08 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(54) АНТИ-ACVR1 АНТИТЕЛА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 62/975,047; 63/030,131

(32) 2020.02.11; 2020.05.26

(33) US

(86) PCT/US2021/017427

(87) WO 2021/163170 2021.08.19

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

(72) Изобретатель:
**Айдон Винсент Дж., Хатселл Сара
Дж., Экономидес Арис Н. (US)**

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

(57) Изобретение относится к моноклональным антителам, которые связываются с белком рецептора активина А типа I (ACVR1), и способам их применения. В различных вариантах осуществления изобретения антитела представляют собой полностью человеческие антитела, которые связываются с ACVR1. В некоторых вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению применимы для ингибирования передачи сигналов ACVR1-опосредованного костного морфогенетического белка (BMP), обеспечивая, таким образом, средства лечения или профилактики ACVR1-ассоциированного заболевания, расстройства или состояния.

202292310

A1

A1

202292310

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-575174EA/032

АНТИ-ACVR1 АНТИТЕЛА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

ССЫЛКИ НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Настоящая заявка подана 10 февраля 2021 г. в качестве международной патентной заявки РСТ и по ней испрашивается приоритет в соответствии с 35 U.S.C. §119(e) предварительной заявки на патент США № 62/975,047, поданной 11 февраля 2020 г., и предварительной заявки на патент США № 63/030,131, поданной 26 мая 2020 г., полное содержание каждой из которых включено в настоящее описание посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[0002] Настоящее изобретение относится к антителам и антигенсвязывающим фрагментам антител, которые специфически связываются с рецептором активина А типа 1 (ACVR1) и/или мутантными белками ACVR1, а также к терапевтическим и диагностическим способам применения этих антител.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] Рецептор активина А типа 1 (ACVR1; также известный как ActR1; или киназа 2, подобная рецептору активина; ALK2) представляет собой однопроходный трансмембранный рецептор и является членом рецепторов костного морфогенетического белка (BMP) типа I суперсемейства рецепторов TGF- β . При связывании лиганда ACVR1 вместе с рецептором типа II инициирует нисходящий сигнальный каскад, приводящий к активации рецептор-специфического белка R-SMAD (SMAD1, SMAD5 или SMAD8), который затем связывается с белком SMAD4, что приводит к регуляции транскрипции генов (Massague 1998, Massague et al., 2005).

[0004] Мутации в гене ACVR1, кодирующем ALK2, рецептор BMP типа I, также известный как белок ACVR1, могут вызывать прогрессирующую оссифицирующую фибродисплазию (FOP), редкое заболевание, ведущее к прогрессирующему эктопическому образованию кости в мягких тканях с тяжелым нарушением движений тела из-за внескелетных костных мостов. Мутации ACVR1, ответственные за FOP, вызывают нарушение регуляции SMAD-зависимой нисходящей передачи сигналов и наделяют мутантный рецептор способностью реагировать на неканонический лиганд, активин А, запуская эктопическое образование костей. Мутации с усилением функции в гене, кодирующем ACVR1, приводят к инвалидизирующим нарушениям внескелетной (гетеротопической) оссификации у людей, таким как FOP. Например, у типичного пациента с FOP аминокислота гистидин в положении 206 белка ACVR1 может быть заменена аргинином. Это вызывает изменение домена активации глицин-серин белка, которое приводит к превращению несигнального комплекса Acvr1:активин А:Acvr2 в сигнальный комплекс. Результатом неофункции (новой функции) активина является инициация эндохондральной оссификации фибро-адипогенными клетками-предшественниками (FAP). Атипичные мутации с участием других остатков могут

работать аналогичным образом, приводя к тому, что белок ACVR1 остается в своей активной конформации, несмотря на отсутствие BMP. Мутации в гене ACVR1 также могут быть связаны с диффузной внутренней глиомой моста (DIPG).

[0005] Экспрессия в печени ключевого регулятора железа гепсидина контролируется сигнальным путем костный морфогенетический белок (BMP)/SMAD. Для передачи сигналов BMP требуется лиганд (например, BMP7, BMP6 или BMP2), рецепторы типа I (например, ACVR1), типа II (например, ACVR2 или BMPR2) и корецептор гомоувелина (HJV) для фосфорилирования белков SMAD. BMP6-опосредованная активация ACVR1 напрямую активирует транскрипцию *Hamp*, гена, который кодирует гепсидин. Гепсидин является негативным регулятором уровня железа, вызывая интернализацию ферропортина (*slc40a1*), единственного известного экспортера железа. Ингибирование сигнального каскада BMP6-ACVR1 приводит к снижению транскрипции *Hamp*, что приводит к снижению уровня циркулирующего гепсидина. Снижение циркулирующего гепсидина приводит к повышению уровня ферропортина, что позволяет увеличить поглощение железа из тонкого кишечника, тем самым повышая уровень циркулирующего железа.

[0006] Моноклональные анти-ACVR1 антитела описаны Katagiri et al., патент/публикация США №№ 10428148, 20180118835 и в WO 2019172165.

[0007] Полностью человеческие антитела, которые специфически связываются с белком ACVR1, его фрагментом или его мутантом с высокой аффинностью и которые ингибируют ACVR1-опосредованную передачу сигнала костного морфогенетического белка (BMP), могут иметь важное значение для профилактики и лечения, например, гетеротопической оссификации, эктопической оссификации, дисплазии костей, анемии или диффузной внутренней глиомы моста.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0008] Настоящее изобретение относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связываются с белком рецептора активина A типа 1 (ACVR1) и ингибируют ACVR1-опосредованную передачу сигнала BMP. В некоторых вариантах осуществления анти-ACVR1 антитела представляют собой полностью человеческие антитела, которые связываются с ACVR1 с высокой аффинностью и блокируют ACVR1 или дестабилизируют активированную конформацию. Антитела по настоящему изобретению полезны, помимо прочего, для дезактивации или снижения активности белка ACVR1. В некоторых вариантах осуществления антитела полезны для профилактики, лечения или облегчения по меньшей мере одного симптома или признака ACVR1-ассоциированного заболевания или расстройства у субъекта. В некоторых вариантах осуществления антитела можно вводить с целью профилактики или лечения субъекта, страдающего или подверженного риску ACVR1-ассоциированного заболевания или расстройства. В конкретных вариантах осуществления антитела применяют для профилактики и лечения гетеротопической оссификации, эктопической оссификации, дисплазии костей, анемии или некоторых видов рака, включая опухоли головного мозга,

путем введения нуждающемуся в этом субъекту.

[0009] В некоторых вариантах осуществления антитела по изобретению связываются с белком ACVR1 и/или его мутантом. Кроме того, представленные антитела связываются с белком ACVR1 или его мутантом с высокой аффинностью. Белки ACVR1, используемые в настоящем изобретении, включают белки ACVR1, которые могут быть получены от млекопитающего, такого как человек или мышь. Например, полноразмерная аминокислотная последовательность человеческого ACVR1 доступна в UniProtKB под регистрационным номером Q04771 (SEQ ID NO: 341).

[0010] Белок ACVR1 может включать сигнальный пептид, находящийся в положениях 1-20 белка ACVR1; например, регистрационный номер Q04771 (SEQ ID NO: 341). Зрелый белок ACVR1 может включать аминокислоты 21-509; например, регистрационный номер Q04771 (SEQ ID NO: 341). Белок ACVR1 может включать внеклеточный домен в пределах аминокислотных остатков 21-123; например, регистрационный номер Q04771 (SEQ ID NO: 341). Белок ACVR1 может включать трансмембранный домен в пределах аминокислотных остатков 124-146; например, регистрационный номер Q04771 (SEQ ID NO: 341). Белок ACVR1 может включать домен протеинкиназы в положениях 208-502; например, регистрационный номер Q04771 (SEQ ID NO: 341). Белок ACVR может включать гликозилирование в положении аминокислоты 102, содержащем N-связанный (GlcNAc...) аспарагин; например, регистрационный номер Q04771 (SEQ ID NO: 341). Белок ACVR может включать модифицированный остаток, например, такой как фосфосерин в положении 501; например, регистрационный номер Q04771 (SEQ ID NO: 341).

[0011] Мутации в гене ACVR1 могут быть причиной различных заболеваний, включая FOP. Белок ACVR1 может быть мутантным белком ACVR1 с аминокислотными заменами, которые можно наблюдать в различных семейных и спорадических случаях FOP. Человеческий белок ACVR1 может содержать различные мутации в SEQ ID NO: 341, включая, без ограничения, L196P (мутация замены лейцина в положении 196 пролином), delP197_F198insL (мутация, приводящая к делеции пролина в положении 197 и фенилаланина в положении 198 и вставке лейцина), R202I (мутация замены аргинина в положении 202 изолейцином), R206H (мутация замены аргинина в положении 206 гистидином), Q207E (мутация замены глутамина в положении 207 глутаминовой кислотой), R258S (мутация замены аргинина в положении 258 серином), R258G (мутация замены аргинина в положении 258 глицином), G325A (мутация замены глицина в положении 325 аланином), G328E (мутация замены глицина в положении 328 глутаминовой кислотой), G328R (мутация замены глицина в положении 328 аргинином), G328W (мутация замены глицина в положении 328 триптофаном), G356D (мутация замены глицина в положении 356 аспарагиновой кислотой) и R375P (мутация замены аргинина в положении 375 пролином).

[0012] В качестве другого примера, под регистрационным номером P37172 (SEQ ID NO: 342) доступна полноразмерная аминокислотная последовательность мышинового белка

ACVR1.

[0013] Антитела по изобретению могут быть полноразмерными (например, антитело IgG1 или IgG4) или могут содержать только антигенсвязывающую часть (например, фрагмент Fab, F(ab')₂ или scFv), и могут быть модифицированы с целью оказания воздействия на функциональность, например, для повышения персистенции в организме хозяина или для устранения остаточных эффекторных функций (Reddy et al., 2000, J. Immunol. 164:1925-1933). В некоторых вариантах осуществления антитела могут быть биспецифическими.

[0014] В первом аспекте настоящее изобретение относится к выделенным рекомбинантным моноклональным антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связываются с белком ACVR1. В некоторых вариантах осуществления антитела представляют собой полностью человеческие моноклональные антитела.

[0015] Типичные анти-ACVR1 антитела по настоящему изобретению перечислены в таблицах 1 и 2 настоящего описания. В таблице 1 представлены идентификаторы аминокислотных последовательностей переменных областей тяжелой цепи (HCVR), переменных областей легкой цепи (LCVR), определяющих комплементарность областей тяжелой цепи (HCDR) (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и определяющих комплементарность областей легкой цепи (LCDR) (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) иллюстративных антител. В таблице 2 представлены идентификаторы последовательностей нуклеиновых кислот HCVR, LCVR, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 иллюстративных антител.

[0016] Настоящее изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим HCVR, содержащую любую аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в таблице 1, или по существу аналогичную ей последовательность, идентичную на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%.

[0017] Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим LCVR, содержащую любую аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в таблице 1, или по существу аналогичную ей последовательность, идентичную на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%.

[0018] Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR (HCVR/LCVR), содержащую любую из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в таблице 1, в паре с любой из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в таблице 1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее изобретение относится

к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, содержащуюся в любом из иллюстративных анти-ACVR1 антител, перечисленных в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления анти-ACVR1 антитела по изобретению содержат пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из одной из SEQ ID NO: 2/10 (например, mAb27396), 22/30 (например, mAb27241), 22/72 (например, mAb27245), 42/48 (например, mAb27242), 58/62 (например, mAb27243), 76/84 (например, mAb27247), 96/104 (например, mAb27404), 116/119 (например, mAb27405), 128/136 (например, mAb27400), 203/211 (например, mAb29226), 273/277 (например, mAb29257) и 300/307 (например, mAb29266).

[0019] Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим HCVR и LCVR, где указанная HCVR содержит аминокислотную последовательность, приведенную в таблице 1, и имеет не более двенадцати аминокислотных замен, и/или указанная LCVR содержит аминокислотную последовательность, приведенную в таблице 1, и имеет не более десяти аминокислотных замен. Например, настоящее изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим HCVR и LCVR, где указанная HCVR содержит аминокислотную последовательность, приведенную в таблице 1, причем указанная аминокислотная последовательность имеет одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать или двенадцать аминокислотных замен. В другом примере настоящее изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим HCVR и LCVR, где указанная LCVR содержит аминокислотную последовательность, приведенную в таблице 1, причем указанная аминокислотная последовательность имеет одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять аминокислотных замен. В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к анти-ACVR1 антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим HCVR и LCVR, где указанная HCVR содержит аминокислотную последовательность, приведенную в таблице 1, причем указанная аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере одну аминокислотную замену, и/или указанная LCVR содержит аминокислотную последовательность, приведенную в таблице 1, причем указанная аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере одну аминокислотную замену.

[0020] Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), содержащую любую аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей HCDR1, перечисленных в таблице 1, или по существу аналогичную ей последовательность, идентичную на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%.

[0021] Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), содержащую любую аминокислотную последовательность, выбранную из

аминокислотных последовательностей HCDR2, перечисленных в таблице 1, или по существу аналогичную ей последовательность, идентичную на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%.

[0022] Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), содержащую любую аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей HCDR3, перечисленных в таблице 1, или по существу аналогичную ей последовательность, идентичную на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%.

[0023] Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим CDR1 легкой цепи (LCDR1), содержащую любую аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей LCDR1, перечисленных в таблице 1, или по существу аналогичную ей последовательность, идентичную на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%.

[0024] Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим CDR2 легкой цепи (LCDR2), содержащую любую аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей LCDR2, перечисленных в таблице 1, или по существу аналогичную ей последовательность, идентичную на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%.

[0025] Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим CDR3 легкой цепи (LCDR3), содержащую любую аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей LCDR3, перечисленных в таблице 1, или по существу аналогичную ей последовательность, идентичную на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%.

[0026] Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCDR3 и LCDR3 (HCDR3/LCDR3), содержащую любую из аминокислотных последовательностей HCDR3, перечисленных в таблице 1, в паре с любой из аминокислотных последовательностей LCDR3, перечисленных в таблице 1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3, содержащуюся в любом из иллюстративных анти-ACVR1 антител, перечисленных в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления пару аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3 выбирают из группы, состоящей из SEQ ID NO: 28/36 (например, mAb27242), 60/66 (например, mAb27243), 82/90 (например, mAb27247), 8/16 (например, mAb27396), 102/110 (например, mAb27405), 28/66 (например, mAb27245), 134/142 (например, mAb27400), 209/217 (например, mAb29226), 261/283

(например, mAb29257) и 305/313 (например, mAb29266).

[0027] Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим HCVR и LCVR, где указанная HCVR содержит HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности, приведенной в таблице 1, одной аминокислотой, HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности, указанной в таблице 1, одной аминокислотой, и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности, указанной в таблице 1, одной аминокислотой. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим HCVR и LCVR, где указанная LCVR содержит LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности, указанной в таблице 1, одной аминокислотой, LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности, указанной в таблице 1, одной аминокислотой, и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности, указанной в таблице 1, одной аминокислотой. Например, настоящее изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим HCVR и LCVR, где указанная HCVR содержит HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24 или 44 или аминокислотную последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 24 или 44 одной аминокислотой, HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46 или аминокислотную последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 46 одной аминокислотой, и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28 или 60 или аминокислотную последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 28 или 60 одной аминокислотой. В другом иллюстративном варианте осуществления настоящее изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим HCVR и LCVR, где указанная LCVR содержит LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50 или аминокислотную последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 50 одной аминокислотой, LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52 или 64 или аминокислотную последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 52 или 64 одной аминокислотой, и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: NO: 36 или 66 или аминокислотную последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 36 или 66 одной аминокислотой.

[0028] Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим набор из шести CDR (т.е. HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащийся в любом из иллюстративных антител, перечисленных в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3

выбирают из группы, состоящей из SEQ ID NO: 44-46-28-50-52-36 (например, mAb27242), 24-46-60-50-64-66 (например, mAb27243), 78-80-82-86-88-90 (например, mAb27247), 4-6-8-12-14-16 (например, mAb27396), 98-100-102-106-122-110 (например, mAb27405), 98-100-102-106-108-110 (например, mAb27404), 24-26-28-50-64-66 (например, mAb27245), 24-26-28-32-34-36 (например, mAb27241), 130-132-134-138-140-142 (например, mAb27400), 205-207-209-213-215-217 (например, mAb29226), 257-275-261-279-281-283 (например, mAb29257) и 4-303-305-309-311-313 (например, mAb29266).

[0029] В родственном варианте осуществления настоящее изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим набор из шести CDR (т.е. HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащийся в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, определенной любым из иллюстративных антител, перечисленных в таблице 1. Например, настоящее изобретение включает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, содержащийся в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10 (например, mAb27396), 22/30 (например, mAb27241), 22/72 (например, mAb27245), 42/48 (например, mAb27242), 58/62 (например, mAb27243), 76/84 (например, mAb27247), 96/104 (например, mAb27404), 116/119 (например, mAb27405), 128/136 (например, mAb27400), 203/211 (например, mAb29226), 273/277 (например, mAb29257) и 300/307 (например, mAb29266).

[0030] Способы и методы идентификации CDR в аминокислотных последовательностях HCVR и LCVR хорошо известны в данной области техники и могут быть использованы для идентификации CDR в определенных аминокислотных последовательностях HCVR и/или LCVR, раскрытых в настоящем описании. Соглашения, в качестве примера, которые можно использовать для идентификации границ CDR, включают, например, определение по Kabat, определение по Chothia и определение AbM. В общих чертах, определение по Kabat основано на изменчивости последовательностей, определение по Chothia основано на расположении областей структурной петли, а определение AbM представляет собой компромисс между подходами Kabat и Chothia. 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). Для идентификации последовательностей CDR в антителе также можно использовать общедоступные базы данных.

[0031] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которое специфически связывается с ACVR1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит три определяющих комплементарность (CDR) области тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в вариабельной области легкой цепи

(LCVR), где HCVR содержит: (i) аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 22, 42, 58, 76, 96, 116, 128, 148, 166, 186, 203, 223, 241, 255, 273, 289, 300 и 319; (ii) аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 22, 42, 58, 76, 96, 116, 128, 148, 166, 186, 203, 223, 241, 255, 273, 289, 300 и 319; (iii) аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 22, 42, 58, 76, 96, 116, 128, 148, 166, 186, 203, 223, 241, 255, 273, 289, 300 и 319; или (iv) аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 22, 42, 58, 76, 96, 116, 128, 148, 166, 186, 203, 223, 241, 255, 273, 289, 300 и 319, где указанная аминокислотная последовательность имеет не более 12 аминокислотных замен; и LCVR содержит: (a) аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 30, 48, 62, 72, 84, 104, 119, 136, 156, 174, 193, 211, 231, 245, 263, 277, 293, 307 и 327; (b) аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 30, 48, 62, 72, 84, 104, 119, 136, 156, 174, 193, 211, 231, 245, 263, 277, 293, 307 и 327; (c) аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 30, 48, 62, 72, 84, 104, 119, 136, 156, 174, 193, 211, 231, 245, 263, 277, 293, 307 и 327; или (d) аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 30, 48, 62, 72, 84, 104, 119, 136, 156, 174, 193, 211, 231, 245, 263, 277, 293, 307 и 327, где указанная аминокислотная последовательность имеет не более 10 аминокислотных замен.

[0032] В некоторых предпочтительных вариантах осуществления настоящее изобретение включает антитела, которые специфически связываются с ACVR1 антагонистическим образом, т.е. снижают или блокируют связывание и/или активность ACVR1.

[0033] Настоящее изобретение включает анти-ACVR1 антитела с модифицированным паттерном гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления может быть полезной модификация, приводящая к удалению нежелательных сайтов гликозилирования, или антитела, лишенные фрагмента фукозы, присутствующего в олигосахаридной цепи, например, для усиления функции антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) (см. Shield et al. (2002) JBC 277:26733). В других применениях модификация галактозилирования может быть выполнена для модификации комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC).

[0034] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые демонстрируют pH-зависимое связывание с ACVR1. Например, настоящее изобретение включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с ACVR1 с более высокой аффинностью при нейтральном pH, чем при кислом pH (т.е. связывание снижено при

кислом pH).

[0035] Настоящее изобретение также относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые конкурируют за специфическое связывание с ACVR1 с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, содержащим CDR HCVR и CDR LCVR, где каждая из HCVR и LCVR имеет аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей HCVR и LCVR, перечисленных в таблице 1.

[0036] Настоящее изобретение также относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые участвуют в перекрестной конкуренции за связывание с ACVR1 с эталонным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, содержащим CDR HCVR и CDR LCVR, где каждая из HCVR и LCVR имеет аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей HCVR и LCVR, перечисленных в таблице 1.

[0037] Настоящее изобретение также относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые связываются с тем же эпитопом, что и эталонное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащим три CDR HCVR и три CDR LCVR, где каждая из HCVR и LCVR имеет аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей HCVR и LCVR, перечисленных в таблице 1.

[0038] Настоящее изобретение также относится к выделенным антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые ингибируют индуцированную лигандом передачу сигналов, опосредованную BMP7, активинем А или другим лигандом семейства TGF-beta, образующим сигнальный комплекс с рецептором активина типа II. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент предотвращает образование сигнального комплекса ACVR1 с рецептором активина типа II. Настоящее изобретение относится к выделенным антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые могут связываться с тем же эпитопом на ACVR1, что и BMP7 или активин А, или рецептор активина типа II, или могут связываться с другим эпитопом на ACVR1, как BMP7 или активин А, или рецептор активина типа II.

[0039] В некоторых вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению являются биспецифическими, включающими первую специфичность связывания с первым эпитопом ACVR1 и вторую специфичность связывания со вторым эпитопом ACVR1, где первый и второй эпитопы различаются и не перекрываются.

[0040] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которое характеризуется одним или более из следующего:

- (a) представляет собой полностью человеческое моноклональное антитело;
- (b) связывается с внеклеточным доменом человеческого ACVR1, слитым с Fc (например, SEQ ID NO: 339), при 25°C с константой диссоциации (K_D) менее 60 нМ, менее 12 нМ, менее 2 нМ, менее 1 нМ или менее 0,5 нМ, измеренной в анализе методом

поверхностного плазмонного резонанса;

(с) связывается с внеклеточным доменом человеческого ACVR1, слитым с mFc (SEQ ID NO: 339), при 37°C с константой диссоциации (K_D) менее 150 нМ, менее 15 нМ, менее 5 нМ, менее 1,5 нМ или менее 1 нМ, измеренной в анализе методом поверхностного плазмонного резонанса;

(d) связывается с внеклеточным доменом человеческого ACVR1, слитым с тус-тус-гексагистидиновой меткой (например, SEQ ID NO: 338), при 25°C с K_D менее 300 нМ, менее 150 нМ, менее 25 нМ, менее 10 нМ, менее 5 нМ, менее 3 нМ или менее 2 нМ, измеренной в анализе методом поверхностного плазмонного резонанса;

(е) связывается с внеклеточным доменом человеческого ACVR1, слитым с тус-тус-гексагистидиновой меткой (например, SEQ ID NO: 338), при 37°C с K_D менее 500 нМ, менее 50 нМ, менее 25 нМ, менее 10 нМ, измеренной в анализе поверхностного плазмонного резонанса;

(f) не связывается с мышинным ACVR1 или связывается с внеклеточным доменом мышинового ACVR1, слитым с тус-тус-гексагистидиновой меткой (например, SEQ ID NO: 340), при 25°C с K_D более 500 нМ, измеренной в анализе методом поверхностного плазмонного резонанса;

(g) не связывается с мышинным ACVR1 или связывается с внеклеточным доменом мышинового ACVR1, слитым с тус-тус-гексагистидиновой меткой (например, SEQ ID NO: 340), при 37°C с K_D более 500 нМ, измеренной в анализе методом поверхностного плазмонного резонанса;

(k) связывается с клетками, экспрессирующими человеческий белок ACVR1 или человеческий белок ACVR(R206H);

(l) ингибирует активацию клеток, экспрессирующих человеческий ACVR1(R206H), человеческим активином А с IC_{50} менее 25 нМ, измеренной в клеточном биологическом анализе;

(m) ингибирует активацию клеток, экспрессирующих человеческий ACVR1(R206H), человеческим BMP7 с IC_{50} менее 20 нМ, менее 5 нМ, менее 3 нМ или менее 1 нМ или менее, измеренной в клеточной биопробе;

(m) в значительной степени снижает уровень гепсидина в сыворотке при введении мышам, экспрессирующим человеческий ACVR1 вместо мышинового аллеля;

(n) в значительной степени повышает уровень железа в сыворотке при введении мышам, экспрессирующим человеческий ACVR1 вместо мышинового аллеля; и/или

(o) ингибирует передачу сигналов ACVR1 дикого типа при введении мышам, экспрессирующим человеческий ACVR1 вместо мышинового аллеля; и

(o) содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей HCVR, перечисленных в таблице 1, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей LCVR, перечисленных в таблице 1.

[0041] Во втором аспекте настоящее изобретение относится к молекулам

[0043] Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей HCDR1, перечисленных в таблице 1; в некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит любую полинуклеотидную последовательность, выбранную из последовательностей нуклеиновой кислоты HCDR1, перечисленных в таблице 2, или по существу аналогичную ей последовательность, которая идентична на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%.

[0045] Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновых кислот, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей HCDR3, перечисленных в таблице 1; в некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит любую полинуклеотидную последовательность, выбранную из последовательностей нуклеиновой кислоты HCDR3, перечисленных в таблице 2, или по существу аналогичную ей последовательность, которая идентична на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%.

[0046] Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновых кислот, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей LCDR1, перечисленных в таблице 1; в некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит любую полинуклеотидную последовательность, выбранную из

последовательностей нуклеиновой кислоты LCDR1, перечисленных в таблице 2, или по существу аналогичную ей последовательность, которая идентична на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%%.

[0047] Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновых кислот, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей LCDR2, перечисленных в таблице 1; в некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит любую полинуклеотидную последовательность, выбранную из последовательностей нуклеиновой кислоты LCDR2, перечисленных в таблице 2, или по существу аналогичную ей последовательность, которая идентична на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%%.

[0048] Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновых кислот, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей LCDR3, перечисленных в таблице 1; в некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит любую полинуклеотидную последовательность, выбранную из последовательностей нуклеиновой кислоты LCDR3, перечисленных в таблице 2, или по существу аналогичную ей последовательность, которая идентична на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%.

[0049] Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим HCVR, где HCVR содержит набор из трех CDR (т.е. HCDR1-HCDR2-HCDR3), причем набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3 соответствует любому из иллюстративных антител, перечисленных в таблице 1.

[0050] Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим LCVR, где LCVR содержит набор из трех CDR (т.е. LCDR1-LCDR2-LCDR3), причем набор аминокислотных последовательностей LCDR1-LCDR2-LCDR3 соответствует любому из иллюстративных антител, перечисленных в таблице 1.

[0051] Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим как HCVR, так и LCVR, где HCVR содержит любую аминокислотную последовательность из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в таблице 1, и где LCVR содержит любую аминокислотную последовательность из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит любую полинуклеотидную последовательность, выбранную из последовательностей нуклеиновой кислоты HCVR, перечисленных в таблице 2, или по существу аналогичную ей последовательность, которая идентична на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%, и полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты LCVR, перечисленных в таблице 1, или по существу аналогичную ей последовательность, которая идентична на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%. В некоторых вариантах осуществления согласно этому аспекту изобретения молекула нуклеиновой кислоты кодирует HCVR и LCVR, где HCVR и LCVR

получены из одного и того же анти-ACVR1 антитела, указанного в таблице 1.

[0052] В родственном аспекте настоящее изобретение относится к рекомбинантным векторам экспрессии, способным экспрессировать полипептид, содержащий вариабельную область тяжелой и/или легкой цепи антитела. Например, настоящее изобретение включает рекомбинантные векторы экспрессии, содержащие любую из молекул нуклеиновых кислот, упомянутых выше, т.е. молекул нуклеиновых кислот, кодирующих любую из последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, приведенных в таблице 2. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к векторам экспрессии, содержащим: (а) молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую HCVR антитела, которое связывает ACVR1, где HCVR содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей, перечисленных в таблице 1; и/или (б) молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую LCVR антитела, которое связывает ACVR1, где LCVR содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей, перечисленных в таблице 1. В объем настоящего изобретения также включены клетки-хозяева, в которые введены такие векторы, а также способы получения антител или их частей путем культивирования клеток-хозяев в условиях, обеспечивающих продуцирование антитела или фрагменты антител, и выделения антител и фрагментов антител, продуцированных таким образом. В некоторых вариантах осуществления клетки-хозяева включают клетку млекопитающего или прокариотическую клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку яичника китайского хомячка (CHO) или клетку *Escherichia coli* (*E. coli*). В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам получения антитела по изобретению или его антигенсвязывающего фрагмента, где способы включают введение в клетку-хозяина вектора экспрессии, содержащего последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую HCVR и/или LCVR антитела по изобретению или его антигенсвязывающего фрагмента, функционально связанную с промотором; культивирование клетки-хозяина в условиях, благоприятных для экспрессии последовательности нуклеиновой кислоты; и выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из культуральной среды и/или клетки-хозяина. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно очистить любым способом, известным в предшествующем уровне техники.

[0053] В третьем аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество по меньшей мере одного рекомбинантного моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывается с ACVR1, и фармацевтически приемлемый носитель. В родственном аспекте изобретение относится к композиции, которая представляет собой комбинацию анти-ACVR1 антитела и второго терапевтического агента. В одном из вариантов осуществления второй терапевтический агент представляет собой любой агент,

который целесообразно комбинировать с анти-ACVR1 антителом.

[0054] Иллюстративные агенты, которые можно успешно комбинировать с анти-ACVR1 антителом, включают, без ограничения, другие агенты, которые связывают и/или активируют активность ACVR1 (включая другие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты и т.д.) и/или агенты, которые не связываются непосредственно с ACVR1, но, тем не менее, способствуют лечению или облегчению по меньшей мере одного симптома или признака ACVR1-ассоциированного заболевания или расстройства (раскрытого в других разделах настоящего описания). Дополнительные комбинированные виды терапии и совместные составы, включающие анти-ACVR1 антитела по настоящему изобретению, раскрыты в настоящем описании в другом месте.

[0055] В четвертом аспекте изобретение относится к терапевтическим способам лечения у субъекта ACVR1-ассоциированного заболевания или расстройства с помощью анти-ACVR1 антитела или антигенсвязывающей части антитела по изобретению, где терапевтические способы включают введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей антитело по изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент. Подлежащее лечению расстройство представляет собой любое заболевание или состояние, которое купируется, облегчается, подавляется или предотвращается путем усиления активности ACVR1 (например, анемию, гетеротопическую оссификацию, эктопическую оссификацию, дисплазию костей или диффузную внутреннюю глиому моста). В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способам профилактики или лечения ACVR1-ассоциированного заболевания или расстройства, включающим введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества анти-ACVR1 антитела по изобретению или его антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно вводить с целью профилактики или терапии субъекту, имеющему или подверженному риску ACVR1-ассоциированного заболевания или расстройства. В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент вводят нуждающемуся в этом субъекту в комбинации со вторым терапевтическим агентом.

[0056] Второй терапевтический агент может быть выбран из группы, состоящей из антитела к активину А или его антигенсвязывающего фрагмента, антитела к BMP7 или его антигенсвязывающего фрагмента, антитела к ACVR2 или его антигенсвязывающего фрагмента, противовоспалительных лекарственных веществ, стероидов, бисфосфонатов, миорелаксантов или агонистов гамма-рецептора ретиноевой кислоты (RAR), модификации образа жизни, диетической добавки и любого другого лекарственного вещества или терапевтического агента, которые известны в данной области. В некоторых вариантах осуществления второй терапевтический агент может быть агентом, который способствует противодействию или облегчению любого возможного побочного эффекта(ов), связанного(ых) с антителом по изобретению или его антигенсвязывающим фрагментом, если такой(ие) побочный(ые) эффект(ы) возникает(ют). Антитело или его

фрагмент можно вводить подкожно, внутривенно, внутрикожно, внутривнутрибрюшинно, перорально, внутримышечно или интрацеребровентрикулярно. Антитело или его фрагмент можно вводить в дозе от примерно 0,1 мг/кг массы тела до примерно 100 мг/кг массы тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению можно вводить в одной или более дозах, составляющих от 10 до 600 мг.

[0057] Настоящее изобретение также включает применение анти-ACVR1 антитела по изобретению или его антигенсвязывающего фрагмента в производстве лекарственного средства для лечения заболевания или расстройства, благоприятное действие которого обусловлено активацией связывания ACVR1 и/или активности.

[0058] Другие варианты осуществления станут очевидными из приведенного далее подробного описания.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0059] На фиг. 1А показан график определенного с помощью микроКТ общего объема гетеротопической оссификации (НО) в течение 13 недель после хирургического вмешательства в модели посттравматической НО *in vivo* у мышей дикого типа. Мышам вводили либо антитело изотипического контроля (кружки, $n=12$), ALK3-Fc (квадраты, $n=12$), либо антитело mAb27242 Acvr1 (треугольники, $n=12$), начиная одновременно с индукцией повреждения. Объем НО измеряли с помощью микроКТ через 3, 6, 9 и 13 недель после повреждения. Антитела, блокирующие Acvr1, в значительной степени ослабляли общую НО по сравнению с изотипическим контролем через 9 недель после операции ($p<0,05$).

[0060] На фиг. 1В показан график определенного с помощью микроКТ объема прикрепленной гетеротопической оссификации (НО) в течение 13 недель после хирургического вмешательства в модели посттравматической НО *in vivo* у мышей дикого типа. Мышам вводили либо антитело изотипического контроля (кружки, $n=12$), ALK3-Fc (квадраты, $n=12$), либо антитело mAb27242 Acvr1 (треугольники, $n=12$), начиная одновременно с индукцией повреждения. Объем НО измеряли с помощью микроКТ через 3, 6, 9 и 13 недель после повреждения. Антитела, блокирующие Acvr1, в значительной степени ослабляли прикрепленную НО по сравнению с изотипическим контролем через 9 недель после операции ($p<0,05$).

[0061] На фиг. 1С показан график определенного с помощью микроКТ объема неприкрепленной гетеротопической оссификации (НО) в течение 13 недель после хирургического вмешательства в модели посттравматической НО *in vivo* у мышей дикого типа. Мышам вводили либо антитело изотипического контроля (кружки, $n=12$), ALK3-Fc (квадраты, $n=12$), либо антитело mAb27242 Acvr1 (треугольники, $n=12$), начиная одновременно с индукцией повреждения. Объем НО измеряли с помощью микроКТ через 3, 6, 9 и 13 недель после травмы. Антитела, блокирующие Acvr1, в значительной степени ослабляли прикрепленную НО по сравнению с изотипическим контролем через 13 недель после операции ($p<0,01$).

[0062] На фиг. 2А-С показаны изображения объема НО в поврежденной задней

конечности в модели посттравматической НО in vivo у мышей дикого типа, измеренного с помощью микроКТ по общему объему НО, прикрепленной НО (обведено пунктирными белыми линиями) или неприкрепленной НО (обведено короткими пунктирными белыми линиями) через 13 недель после операции.

[0063] На фиг. 2А показано репрезентативное изображение объема НО в поврежденной задней конечности в модели посттравматической НО in vivo у мышей дикого типа, измеренного с помощью микроКТ по общему объему НО, прикрепленной НО (обведено пунктирными белыми линиями) или неприкрепленной НО (обведено короткими пунктирными белыми линиями) через 13 недель после операции после введения антитела изотипического контроля.

[0064] На фиг. 2В показано репрезентативное изображение объема НО в поврежденной задней конечности в модели посттравматической НО in vivo у мышей дикого типа, измеренного с помощью микроКТ по общему объему НО, прикрепленной НО (обведено пунктирными белыми линиями) или неприкрепленной НО (обведено короткими пунктирными белыми линиями) через 13 недель после операции после введения Alk3-Fc. Объемы НО, измеренные с помощью микроКТ, в значительной степени уменьшились через 13 недель у мышей, получавших ALK3-Fc, по сравнению с мышами, получавшими изотипический контроль.

[0065] На фиг. 2С показано репрезентативное изображение объема НО в поврежденной задней конечности в модели посттравматической НО in vivo у мышей дикого типа, измеренного с помощью микроКТ по общему объему НО, прикрепленной НО (обведено пунктирными белыми линиями) или неприкрепленной НО (обведено короткими пунктирными белыми линиями) через 13 недель после операции после введения анти-ACVR антитела mAb27242. Объемы НО, измеренные с помощью микроКТ, в значительной степени уменьшились через 13 недель у мышей, получавших анти-ACVR антитело, по сравнению с мышами, получавшими антитело изотипического контроля.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0066] Перед описанием способов по изобретению следует обратить учесть, что настоящее изобретение не ограничено конкретными описанными способами и экспериментальными условиями, поскольку такие способы и условия могут меняться. Также следует учесть, что используемая в настоящем описании терминология предназначена только для целей описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения, поскольку объем настоящего изобретения ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

[0067] Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, имеют такое же значение, в котором их обычно понимают специалисты в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Хотя при практическом применении или тестировании настоящего изобретения могут быть использованы любые способы и материалы, аналогичные или эквивалентные раскрытым в описании, здесь описаны предпочтительные способы и материалы. Все публикации,

патенты и заявки на патенты, упомянутые в настоящем описании, включены в него полностью посредством ссылки.

Определения

[0068] Термин «ACVR1», также упоминаемый как «ALK2», относится к рецептору активина А типа 1 (также известному как активин-подобная киназа 2). ACVR1 представляет собой однопроходный мембранный белок I типа. Полноразмерная аминокислотная последовательность человеческого ACVR1 доступна в UniProtKB под регистрационным номером Q04771 и содержит 509 аминокислотных остатков (SEQ ID NO: 341). Белок содержит внеклеточный домен аминокислотных остатков 21-123, трансмембранный домен в аминокислотных положениях 124-146 и цитоплазматический домен в положениях 147-509. При связывании лиганда ACVR1 образует рецепторный комплекс, состоящий из двух трансмембранных серин/треониновых киназ типа II и типа I. Рецепторы типа II фосфорилируют и активируют рецепторы типа I, которые аутофосфорилируют, а затем связывают и активируют регуляторы транскрипции SMAD. ACVR1 является рецептором активина.

[0069] Примером аминокислотной последовательности человеческого полноразмерного белка ACVR1 является аминокислотная последовательность, представленная в UniProtKB/Swiss-Prot под регистрационным номером Q04771 (SEQ ID NO: 341). Полноразмерная аминокислотная последовательность мышинного белка ACVR1 доступна под регистрационным номером P37172 (SEQ ID NO: 342).

[0070] Термин «ACVR1» включает рекомбинантный белок ACVR1 или его фрагмент. Термин также охватывает белок ACVR1 или его фрагмент, связанный, например, с гистидиновой меткой, меткой PADRE, мышинным или человеческим Fc или сигнальной последовательностью (например, SEQ ID NO: 338-340).

[0071] Термин «ACVR1» может включать белок ACVR1 или его фрагмент, содержащий мутацию. Например, мутация может быть основана на соответствующей аминокислотной последовательности человеческого ACVR1 или ее фрагменте, приведенной в UniProtKB под регистрационным номером Q04771 (SEQ ID NO: 341). Например, белок ACVR1 или его фрагмент могут содержать мутацию, включая, без ограничения, L196P, delP197_F198insL, R202I, R206H, Q207E, R258S, R258G, G325A, G328E, G328R, G328W, G356D и R375P соответствующей SEQ ID NO: 341.

[0072] В контексте настоящего описания термин «антитело» означает молекулу иммуноглобулина, состоящую из четырех полипептидных цепей, двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, соединенных между собой дисульфидными связями (т.е. «молекулы полноразмерных антител»), а также ее мультимеры (например, IgM) или антигенсвязывающие фрагменты. Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области тяжелой цепи («HCVR» или «V_H») и константной области тяжелой цепи (состоящей из доменов C_{H1}, C_{H2} и C_{H3}). Каждая легкая цепь состоит из вариабельной области легкой цепи («LCVR или «V_L») и константной области легкой цепи (C_L). Области V_H и V_L могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые

определяющими комплементарность областями (CDR), которые перемежаются с более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных в направлении от amino-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В некоторых вариантах осуществления изобретения FR антитела (или его антигенсвязывающего фрагмента) могут быть идентичны последовательностям человеческой зародышевой линии или могут быть модифицированы естественным или искусственным способом. Консенсусная аминокислотная последовательность может быть определена с помощью параллельного анализа двух или более CDR.

[0073] Также возможна замена одного или более остатков CDR или удаление одного или более CDR. В научной литературе описаны антитела, согласно которым связывание возможно без одной или двух CDR. Padlan et al. (1995 FASEB J. 9:133-139) проанализировали области контакта между антителами и их антигенами, основываясь на опубликованных кристаллических структурах, и пришли к выводу, что только примерно от одной пятой до одной трети остатков CDR действительно контактируют с антигеном. Padlan также обнаружил множество антител, в которых одна или две CDR не имели аминокислот, контактирующих с антигеном (см. также Vajdos et al. 2002 J Mol Biol 320:415-428).

[0074] Остатки CDR, не контактирующие с антигеном, могут быть идентифицированы на основании предыдущих исследований (например, остатки H60-H65 в CDRH2 часто не требуются) областей CDR по Kabat, лежащих вне CDR по Chothia, путем молекулярного моделирования и/или эмпирически. Если CDR или его остаток(ки) опущены, их обычно заменяют аминокислотой, занимающей соответствующее положение в другой последовательности человеческого антитела, или консенсусом таких последовательностей. Положения для замены в пределах CDR и аминокислоты для замены также могут быть выбраны эмпирически. Эмпирические замены могут быть консервативными или неконсервативными заменами.

[0075] Полностью человеческие моноклональные анти-ACVR1 антитела по изобретению могут содержать одну или более аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасных и/или CDR-областях переменных доменов тяжелой и легкой цепей по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии. Такие мутации можно легко установить путем сравнения раскрытых в настоящем описании аминокислотных последовательностей с последовательностями зародышевой линии, доступными, например, из находящихся в открытом доступе баз данных последовательностей антител. Настоящее изобретение включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, полученные из любой аминокислотной последовательности, раскрытой в настоящем описании, где одна или более аминокислот в одной или более каркасных и/или CDR областях мутированы в соответствующий(е) остаток(ки) последовательности зародышевой линии, из которой было получено антитело, или в соответствующий(е) остаток(ки) другой последовательности человеческой

зародышевой линии, или на консервативную аминокислотную замену соответствующего(их) остатка(ов) зародышевой линии (все такие изменения последовательности упоминаются в настоящем описании как «мутации зародышевой линии»). Специалист в данной области, взяв за основу раскрытые в настоящем описании последовательности переменных областей тяжелой и легкой цепей, может легко получить множество антител и антигенсвязывающих фрагментов, которые содержат одну или более отдельных мутаций зародышевой линии или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления все остатки каркаса и/или CDR в доменах V_H и/или V_L мутированы обратно в остатки, обнаруженные в исходной последовательности зародышевой линии, из которой было получено антитело. В других вариантах осуществления только некоторые остатки мутированы обратно в исходную последовательность зародышевой линии, например, только мутантные остатки, обнаруженные в пределах первых 8 аминокислот FR1 или в пределах последних 8 аминокислот FR4, или только мутантные остатки, обнаруженные в CDR1, CDR2 или CDR3. В других вариантах осуществления один или более остатков каркаса и/или CDR мутированы в соответствующие остатки другой последовательности зародышевой линии (т.е. последовательности зародышевой линии, которая отличается от последовательности зародышевой линии, из которой антитело было получено изначально). Кроме того, антитела по настоящему изобретению могут содержать любую комбинацию двух или более мутаций зародышевой линии в каркасной области и/или областях CDR, например, в которых некоторые отдельные остатки мутированы в соответствующий остаток конкретной последовательности зародышевой линии, в то время как некоторые другие остатки, которые отличаются от исходной последовательности зародышевой линии, сохранены или мутированы в соответствующий остаток другой последовательности зародышевой линии. После получения антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или более мутаций зародышевой линии, можно легко протестировать на наличие одного или более требуемых свойств, таких как повышенная специфичность связывания, повышенная аффинность связывания, улучшенные или усиленные антагонистические биологические свойства, сниженная иммуногенность и т.д. Настоящее изобретение включает антитела и антигенсвязывающие фрагменты, полученные таким общим способом.

[0076] Настоящее изобретение также включает полностью человеческие моноклональные анти-ACVR1 антитела, содержащие варианты любой из раскрытых в настоящем описании аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR с одной или более консервативными заменами. Например, настоящее изобретение включает анти-ACVR1 антитела с аминокислотными последовательностями HCVR, LCVR и/или CDR, содержащими, например, 10 или менее, 8 или менее, 6 или менее, 4 или менее и т.д. консервативных аминокислотных замен относительно любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, раскрытых в настоящем описании.

[0077] В контексте настоящего описания термин «человеческое антитело» или

«полностью человеческое антитело» включает антитела, имеющие переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулина человеческой зародышевой линии. Человеческие mAb по изобретению могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина человеческой зародышевой линии (например, мутации, введенные методом случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro*, или соматические мутации *in vivo*), например, в CDR и, в частности, CDR3. Однако термин «человеческое антитело» или «полностью человеческое антитело» в данном контексте не включает mAb, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии другого вида млекопитающего (например, мыши), были привиты к человеческой последовательности FR. Термин включает антитела, которые рекомбинантно продуцируются в организме млекопитающего, отличного от человека, или в клетках млекопитающего, отличного от человека. Термин не предназначен для включения антител, выделенных из организма человека или образованных в нем.

[0078] Термин «рекомбинантный», используемый в настоящем описании, относится к антителам по изобретению или их антигенсвязывающим фрагментам, созданным, экспрессированным, выделенным или полученным с помощью технологий или способов, известных в данной области как технология рекомбинантной ДНК, которые включают, например, сплайсинг и трансгенную экспрессию ДНК. Термин относится к антителам, экспрессированным в системе экспрессии млекопитающих, отличных от человека (включая трансгенных млекопитающих, отличных от человека, например, трансгенных мышей), или клетках (например, клетках CHO), или выделенным из рекомбинантной комбинаторной библиотеки человеческих антител.

[0079] Термин «специфически связывает» или «специфически связывается с» и т.п. означает, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент образует комплекс с антигеном, который является относительно стабильным в физиологических условиях. Специфическое связывание можно охарактеризовать константой равновесной диссоциации, составляющей по меньшей мере примерно 1×10^{-8} М или менее (например, более низкое значение K_D означает более прочное связывание). Способы определения того, связываются ли две молекулы специфически, хорошо известны в данной области и включают, например, равновесный диализ, поверхностный плазмонный резонанс и т.п. Согласно настоящему описанию, антитела, которые специфически связываются с ACVR1, идентифицируют с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, BIACORE™. Более того, полиспецифические антитела, которые связываются с одним доменом в ACVR1 и одним или более дополнительными антигенами, или биспецифические антитела, которые связываются с двумя разными областями ACVR1, в контексте настоящего описания также считаются антителами, которые «специфически связываются».

[0080] Термин «высокоаффинное» антитело относится к mAb, которые имеют аффинность связывания с ACVR1, выраженную K_D , равной по меньшей мере 10^{-8} М;

предпочтительно 10^{-9} М; более предпочтительно 10^{-10} М, еще более предпочтительно 10^{-11} М, измеренную с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, BIACORE™ или аффинной ELISA в растворе.

[0081] Термин «медленная скорость диссоциации», « K_{off} » или « k_d » означает, что антитело диссоциирует от ACVR1, с константой скорости $1 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$ или менее, предпочтительно $1 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ или менее, определенной методом поверхностного плазмонного резонанса, например, BIACORE™.

[0082] Термины «антигенсвязывающая часть» антитела, «антигенсвязывающий фрагмент» антитела и т.п., в контексте настоящего описания, включают любой встречающийся в природе, ферментативно полученный, синтетический или генно-инженерный полипептид или гликопротеин, который специфически связывает антиген с образованием комплекса. Термины «антигенсвязывающий фрагмент» антитела или «фрагмент антитела», в контексте настоящего описания, относятся к одному или более фрагментам антитела, которые сохраняют способность связываться с белком ACVR1.

[0083] В конкретных вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению или фрагменты антитела могут быть конъюгированы с фрагментом, таким как лиганд или терапевтический фрагмент («иммуноконъюгат»), вторым анти-ACVR1 антителом или любым другим терапевтическим фрагментом, пригодным для лечения ACVR1-ассоциированного заболевания или расстройства.

[0084] Термин «выделенное антитело» в контексте настоящего описания относится к антителу, которое по существу не содержит других антител (Ab), обладающих другой антигенной специфичностью (например, выделенное антитело, которое специфически связывает ACVR1, или его фрагмент, по существу не содержит антител, которые специфически связываются с антигенами, отличными от ACVR1).

[0085] В контексте настоящего описания, термины «деактивирующее антитело» или «антагонистическое антитело» (или «антитело, снижающее или блокирующее активность ACVR1», или «антитело, дестабилизирующее активированную конформацию») относятся к антителу, связывание которого с ACVR1 приводит к деактивации по меньшей мере одной биологической активности ACVR1. Например, антитело по изобретению может уменьшать анемию при введении нуждающемуся в этом субъекту.

[0086] В контексте настоящего описания, термин «поверхностный плазмонный резонанс» относится к оптическому явлению, которое позволяет выполнить анализ биомолекулярных взаимодействий в реальном времени путем детектирования изменений в концентрации белка в матрице биосенсора, например, с помощью системы BIACOR™. (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden и Piscataway, N.J.).

[0087] В контексте настоящего описания, термин « K_D » означает константу равновесной диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген.

[0088] Термин «эпитоп» относится к антигенной детерминанте, которая взаимодействует со специфическим антигенсвязывающим сайтом в вариабельной области

молекулы антитела, известной как паратоп. Один антиген может иметь более одного эпитопа. Таким образом, разные антитела могут связываться с разными областями антигена и могут иметь разные биологические эффекты. Термин «эпитоп» также относится к участку на антигене, на который реагируют В- и/или Т-клетки. Он также относится к области антигена, которая связана с антителом. Эпитопы могут быть определены как структурные или функциональные. Функциональные эпитопы в целом представляют собой подмножество структурных эпитопов и имеют остатки, которые непосредственно способствуют аффинности взаимодействия. Эпитопы также могут быть конформационными, т.е. состоять из нелинейных аминокислот. В некоторых вариантах осуществления эпитопы могут включать детерминанты, которые представляют собой химически активные поверхностные группы молекул, такие как аминокислоты, боковые цепи сахаров, фосфорильные группы или сульфонильные группы, и в некоторых вариантах осуществления могут иметь специфические трехмерные структурные характеристики и/или характеристики удельного заряда.

[0089] В контексте настоящего описания, термин «перекрестно конкурирует» означает, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с антигеном и ингибирует или блокирует связывание другого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Этот термин также включает конкуренцию между двумя антителами в обеих ориентациях, т.е. первое антитело, которое связывает и блокирует связывание второго антитела, и наоборот. В некоторых вариантах осуществления первое антитело и второе антитело могут связываться с одним и тем же эпитопом. Альтернативно, первое и второе антитела могут связываться с разными, но перекрывающимися эпитопами, так что связывание одного ингибирует или блокирует связывание второго антитела, например, в результате возникающих стерических затруднений. Перекрестную конкуренцию между антителами можно измерить способами, известными в данной области, например, с помощью интерферометрического анализа биослоя без метки в реальном времени. Перекрестная конкуренция между двумя антителами может быть выражена как связывание второго антитела, показатель которого меньше фонового сигнала из-за связывания антитела с самим собой (когда первое и второе антитела являются одним и тем же антителом). Перекрестная конкуренция между 2 антителами может быть выражена, например, в виде % связывания второго антитела, показатель которого меньше исходного фонового сигнала связывания антитела с самим собой (когда первое и второе антитела являются одним и тем же антителом).

[0090] Термин «значительная степень идентичности» или «по существу идентичный» применительно к нуклеиновой кислоте или ее фрагменту указывает, что при оптимальном выравнивании соответствующих нуклеотидных вставок или делеций с другой нуклеиновой кислотой (или комплементарной ей цепью) идентичность нуклеотидной последовательности составляет по меньшей мере примерно 90% и, более предпочтительно, по меньшей мере примерно 95%, 96%, 97%, 98% или 99% нуклеотидных оснований, измеренная с помощью любого хорошо известного алгоритма

идентичности последовательности, такого как FASTA, BLAST или GAP, как описано ниже. Молекула нуклеиновой кислоты, демонстрирующая существенную степень идентичности с эталонной молекулой нуклеиновой кислоты, может, в некоторых случаях, кодировать полипептид, имеющий такую же или по существу аналогичную аминокислотную последовательность, что и полипептид, кодируемый эталонной молекулой нуклеиновой кислоты.

[0091] Применительно к полипептидам термин «значительная степень сходства» или «по существу аналогичный» означает, что две пептидные последовательности при их оптимальном выравнивании, например, с помощью программ GAP или BESTFIT с применением штрафов по умолчанию за открытие гэпа, идентичны на по меньшей мере 90%, более предпочтительно на по меньшей мере 95%, 98% или 99%. Предпочтительно положения остатков, которые не идентичны, отличаются консервативными аминокислотными заменами. «Консервативная аминокислотная замена» представляет собой замену аминокислотного остатка другим аминокислотным остатком, имеющим боковую цепь (группу R) с аналогичными химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). Как правило, консервативная аминокислотная замена по существу не изменяет функциональные свойства белка. В случаях, когда две или более аминокислотных последовательностей отличаются друг от друга консервативными заменами, процент или степень сходства можно увеличить с внесением поправки на консервативную природу замены. Средства внесения такой корректировки хорошо известны специалистам в данной области техники. См., например, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331, которая включена в настоящее описание посредством ссылки. Примеры аминокислотных групп, которые имеют боковые цепи с подобными химическими свойствами, включают 1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; 2) алифатические-гидроксильные боковые цепи: серин и треонин; 3) амидосодержащие боковые цепи: аспарагин и глутамин; 4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; 5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; 6) кислые боковые цепи: аспартат и глутамат и 7) серосодержащие боковые цепи: цистеин и метионин. Предпочтительными группами консервативных аминокислотных замен являются: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин. В качестве альтернативы, консервативная замена представляет собой любое изменение с положительным значением в логарифмической матрице правдоподобия PAM250, раскрытой в Gonnet et al. (1992) *Science* 256: 1443-45, включенной в настоящее описание посредством ссылки. «Умеренно консервативная» замена представляет собой любое изменение, имеющее неотрицательное значение в логарифмической матрице правдоподобия PAM250.

[0092] Сходство последовательностей для полипептидов обычно измеряют с помощью программного обеспечения для анализа последовательностей. Программное обеспечение для анализа белков позволяет сопоставлять схожие последовательности

путем определения степени сходства с учетом разных замен, делеций и других модификаций, включая консервативные аминокислотные замены. Например, программное обеспечение 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 из разных видов организмов, или между белком дикого типа и его мутантным вариантом. См., например, GCG версии 6.1. Полипептидные последовательности также можно сравнивать с помощью FASTA с параметрами по умолчанию или рекомендуемыми параметрами; программа в GCG версии 6.1. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) позволяет выполнять выравнивания и выдает процент идентичности последовательностей областей наилучшего перекрытия между заданными и искомыми последовательностями (Pearson (2000), см. выше). Другим предпочтительным алгоритмом при сравнении последовательности по изобретению с базой данных, содержащей большое количество последовательностей различных организмов, является компьютерная программа BLAST, особенно BLASTP или TBLASTN, с применением параметров по умолчанию. См., например, Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 и (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402, каждая из которых включена в описание посредством ссылки.

[0093] Фраза «терапевтически эффективное количество» означает количество, обеспечивающее требуемый эффект, для достижения которого его вводят. Точное количество будет зависеть от цели лечения и может быть определено специалистом в данной области с помощью известных методов (см., например, Lloyd (1999) *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding*).

[0094] Используемый в настоящем описании термин «субъект» относится к животному, предпочтительно млекопитающему, более предпочтительно человеку, нуждающемуся в улучшении, профилактике и/или лечении заболевания или расстройства, связанного с ACVR1, такого как анемия или эктопическая оссификация. Этот термин включает людей, которые имеют такое заболевание или расстройство или находятся в группе риска.

[0095] В контексте настоящего описания термины «лечить», «лечение» или «лечащий» относятся к уменьшению или облегчению тяжести по меньшей мере одного симптома или признака ACVR1-ассоциированного заболевания или расстройства в результате введения нуждающемуся в этом субъекту терапевтического средства, такого как антитело по настоящему изобретению. Эти термины включают ингибирование прогрессирования заболевания или ухудшения симптома/показания. Термины также включают положительный прогноз в отношении заболевания, т.е. после введения терапевтического агента, такого как антитело по настоящему изобретению, субъект может излечиться от заболевания или проявление заболевания может быть ослаблено. Терапевтическое средство можно вводить субъекту в терапевтической дозе.

[0096] Термины «предотвращать», «профилактика» или «предотвращение»

относятся к ингибированию проявления ACVR1-ассоциированного заболевания или расстройства или любых симптомов или признаков такого заболевания или расстройства при введении антитела по настоящему изобретению.

Антигенсвязывающие фрагменты антител

[0097] Если специально не указано иное, термин «антитело», в контексте настоящего описания, следует понимать как включающий молекулы антител, содержащие две тяжелые цепи иммуноглобулина и две легкие цепи иммуноглобулина (т.е. «молекулы полноразмерного антитела»), а также их антигенсвязывающие фрагменты. Термины «антигенсвязывающая часть» антитела, «антигенсвязывающий фрагмент» антитела и т.п., используемые в настоящем описании, включают любые встречающиеся в природе, ферментативно полученные, синтетические или генно-инженерные полипептиды или гликопротеины, которые специфически связываются с антигеном с образованием комплекса. Термины «антигенсвязывающий фрагмент» антитела или «фрагмент антитела», используемые в настоящем описании, относятся к одному или более фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с белком ACVR1, его фрагментом и/или его мутантом. Фрагмент антитела может включать Fab-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент, Fv-фрагмент, dAb-фрагмент, фрагмент, содержащий CDR, или выделенный CDR. В некоторых вариантах осуществления термин «антигенсвязывающий фрагмент» относится к полипептидному фрагменту полиспецифической антигенсвязывающей молекулы. Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут быть получены, например, из молекул полноразмерных антител с применением любых подходящих стандартных методов, таких как протеолитическое расщепление или методы рекомбинантной генной инженерии, включающие манипулирование и экспрессию ДНК, кодирующей переменные и (необязательно) константные домены антитела. Такая ДНК известна и/или легкодоступна, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК (включая, например, библиотеки фаг-антител) или может быть синтезирована. ДНК можно секвенировать и конструировать химическим путем или с помощью методов молекулярной биологии, например, с целью размещения одного или более переменных и/или константных доменов в подходящей конфигурации или с целью введения кодонов, создания цистеиновых остатков, модификации, добавления или удаления аминокислот, и т.д.

[0098] Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают: (i) Fab-фрагменты; (ii) фрагменты F(ab')₂; (iii) фрагменты Fd; (iv) фрагменты Fv; (v) молекулы одноцепочечного Fv (scFv); (vi) фрагменты dAb; и (vii) минимальные единицы распознавания, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гипервариабельную область антитела (например, выделенную определяющую комплементарность область (CDR), такую как пептид CDR3), или ограниченный пептид FR3-CDR3-FR4. В контексте настоящего описания выражение «антигенсвязывающий фрагмент» также включает другие сконструированные молекулы, такие как домен-специфические антитела, однодоменные антитела, антитела с удаленным доменом,

химерные антитела, антитела с привитой CDR, диатела, триатела, тетратела, минитела, нанотела (например, моновалентные нанотела, двухвалентные нанотела и т.д.), малые модульные иммунофармацевтические препараты (SMIP) и переменные домены IgNAR акулы.

[0099] Антигенсвязывающий фрагмент антитела обычно содержит по меньшей мере один переменный домен. Переменный домен может иметь любой размер или любой аминокислотный состав и обычно содержит по меньшей мере одну CDR, которая примыкает к одной или более каркасным последовательностям или находится в рамке считывания. В антигенсвязывающих фрагментах, содержащих домен V_H , связанный с доменом V_L , домены V_H и V_L могут быть расположены относительно друг друга в любом подходящем порядке. Например, переменная область может быть димерной и содержать димеры V_H - V_H , V_H - V_L или V_L - V_L . Альтернативно, антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный домен V_H или V_L .

[00100] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать по меньшей мере один переменный домен, ковалентно связанный с по меньшей мере одним константным доменом. Неограничивающие иллюстративные конфигурации переменных и константных доменов, которые возможны в антигенсвязывающем фрагменте антитела по настоящему изобретению, включают: (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 переменного и константного доменов, включая любую из представленных иллюстративных конфигураций, перечисленных выше, переменный и константный домены могут быть либо непосредственно связаны друг с другом, либо могут быть связаны посредством полной или частичной шарнирной или линкерной области. Шарнирная область может состоять по меньшей мере из 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или более) аминокислот, что обеспечивает гибкую или полугибкую связь между соседними переменными и/или константными доменами в одной полипептидной молекуле. Более того, антигенсвязывающий фрагмент антитела по настоящему изобретению может содержать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) любой из перечисленных выше конфигураций переменного и константного доменов в нековалентной связи друг с другом и/или с одним или более мономерными доменами V_H или V_L (например, дисульфидной связью(ями)).

[00101] Как и в случае молекул полноразмерных антител, антигенсвязывающие фрагменты могут быть моноспецифическими или полиспецифическими (например, биспецифическими). Полиспецифический антигенсвязывающий фрагмент антитела обычно содержит по меньшей мере два разных переменных домена, где каждый переменный домен способен специфически связываться с отдельным антигеном или с другим эпитопом на одном и том же антигене. Любой формат полиспецифического антитела, включая типичные форматы биспецифического антитела, раскрытые в

настоящем описании, может быть адаптирован с помощью стандартных методов, доступных в данной области, для применения в контексте антигенсвязывающего фрагмента антитела по настоящему изобретению.

Получение человеческих антител

[00102] Способы получения антител с помощью трансгенных мышей известны в данной области. Любые такие известные способы можно использовать в контексте настоящего изобретения для получения человеческих антител, которые специфически связываются с ACVR1.

[00103] Для получения антител к белку ACVR1 можно использовать любой из следующих иммуногенов. В некоторых вариантах осуществления антитела по изобретению получают, используя мышей, иммунизированных полноразмерным нативным белком ACVR1 (см., например, UniProtKB/Swiss-Prot, регистрационный номер Q04771) или ДНК, кодирующей белок или его фрагмент. Альтернативно, белок или его фрагмент может быть продуцирован стандартными биохимическими методами, модифицирован и использован в качестве иммуногена.

[00104] В некоторых вариантах осуществления иммуноген может представлять собой рекомбинантный белок ACVR1 или его фрагмент, экспрессированный в *E. coli* или в любых других эукариотических клетках или клетках млекопитающих, таких как клетки яичника китайского хомячка (CHO) (например, SEQ ID NO: 338-340).

[00105] С помощью метода VELOCIMMUNE® (см., например, US 6,596,541, Regeneron Pharmaceuticals, VELOCIMMUNE®) или любой другого известного способа получения моноклональных антител, сначала выделяют высокоаффинные химерные антитела к ACVR1, имеющие человеческую переменную область и мышиную константную область. Технология VELOCIMMUNE® включает создание трансгенной мыши с геном, содержащим человеческие переменные области тяжелой и легкой цепей, функционально связанные с эндогенными локусами мышинной константной области, в результате чего в ответ на антигенное воздействие в организме мыши продуцируется антитело, содержащее человеческую переменную область и мышиную константную область. ДНК, кодирующую переменные области тяжелой и легкой цепей антитела, выделяют и функционально связывают с ДНК, кодирующей человеческие константные области тяжелой и легкой цепей. Затем ДНК экспрессируют в клетке, способной экспрессировать полностью человеческое антитело.

[00106] Как правило, мышь VELOCIMMUNE® заражают представляющим интерес антигеном, и из мышей, экспрессирующих антитела, выделяют лимфатические клетки (такие как В-клетки). Лимфатические клетки могут быть слиты с клеточной линией миеломы с получением бессмертных гибридных клеточных линий, и такие гибридные клеточные линии подвергают скринингу и отбору с целью идентификации гибридных клеточных линий, которые продуцируют антитела, специфичные к представляющему интерес антигену. ДНК, кодирующая переменные области тяжелой цепи и легкой цепи, может быть выделена и связана с требуемыми изотипическими

константными областями тяжелой цепи и легкой цепи. Такой белок антитела может продуцироваться в клетке, такой как клетка СНО. Альтернативно, ДНК, кодирующая антиген-специфические химерные антитела или переменные домены легкой и тяжелой цепей, может быть выделена непосредственно из антиген-специфических лимфоцитов.

[00107] Сначала выделяют высокоаффинные химерные антитела, имеющие человеческую переменную область и мышиную константную область. Как и в приведенном ниже экспериментальном разделе, анализируют характеристики антител, и отбирают антитела с требуемыми характеристиками, включая аффинность, селективность, эпитоп и т.д. Мышинные константные области заменяют желательной человеческой константной областью, чтобы получить полностью человеческое антитело по изобретению, например дикого типа или модифицированные IgG1 или IgG4. Несмотря на то, что выбранные константные области можно менять в зависимости от конкретного применения, характеристики высокоаффинного связывания антигена и специфичности к мишени в переменной области остаются неизменными.

Биоэквиваленты

[00108] Анти-ACVR1 антитела по настоящему изобретению и фрагменты антитела включают белки, имеющие аминокислотные последовательности, отличающиеся от последовательностей описанных антител, но сохраняющие способность связывать белок ACVR1. Такие варианты антител и фрагменты антител содержат одно или более добавлений, делеций или замен аминокислот относительно исходной последовательности, но проявляют биологическую активность, по существу эквивалентную активности описанных антител. Аналогичным образом, последовательности ДНК, кодирующие антитела по настоящему изобретению, включают последовательности, которые содержат одно или более добавлений, делеций или замен нуклеотидов относительно раскрытой последовательности, но которые кодируют антитело или фрагмент антитела, по существу биоэквивалентные антителу по изобретению или фрагменту антитела.

[00109] Два антигенсвязывающих белка или антитела считаются биоэквивалентными, если, например, они являются фармацевтическими эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, у которых скорость и степень абсорбции существенно не различаются при введении в одной и той же молярной дозе либо единичной дозе, либо при введении нескольких доз в аналогичных экспериментальных условиях. Некоторые антитела считаются эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, если они эквивалентны по степени абсорбции, но не по скорости абсорбции, и при этом могут считаться биоэквивалентными, поскольку такие различия в скорости абсорбции являются преднамеренными и отражены в маркировке, не являются существенными для достижения эффективных концентраций лекарственного средства в организме, например, при постоянном применении, и считаются незначимыми с медицинской точки зрения для конкретного изучаемого лекарственного препарата.

[00110] В одном из вариантов осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если отсутствуют клинически значимые различия в их

безопасности, чистоте или активности.

[00111] В одном из вариантов осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если пациент может один или более раз переходить от приема эталонного продукта к приему биологического продукта, и наоборот, без ожидаемого увеличения риска появления побочных эффектов, включая клинически значимое изменение иммуногенности или снижение эффективности по сравнению с продолжением терапии без такого перехода.

[00112] В одном из вариантов осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если они оба действуют по общему механизму или механизмам действия в отношении состояния или условий применения, в той мере, в какой известны такие механизмы.

[00113] Биоэквивалентность может быть продемонстрирована методами *in vivo* и/или *in vitro*. Меры биоэквивалентности включают, например, (a) тест *in vivo* на людях или других млекопитающих, при котором концентрацию антитела или его метаболитов измеряют в крови, плазме, сыворотке или другой биологической жидкости в зависимости от времени; (b) тест *in vitro*, который коррелирует с данными о биодоступности для человека *in vivo* и является разумным прогнозом; (c) тест *in vivo* на людях или других млекопитающих, в котором соответствующий острый фармакологический эффект антитела (или его мишени) измеряют как функцию от времени; и (d) хорошо контролируемое клиническое испытание, в котором устанавливают безопасность, эффективность или биодоступность, или биоэквивалентность антитела.

[00114] Биоэквивалентные варианты антител по изобретению могут быть сконструированы, например, путем введения различных замен остатков или последовательностей или удаления концевых или внутренних остатков или последовательностей, которые не являются необходимыми для биологической активности. Например, цистеиновые остатки, не являющиеся необходимыми для биологической активности, могут быть удалены или заменены другими аминокислотами, чтобы предотвратить образование ненужных или неправильных внутримолекулярных дисульфидных мостиков при ренатурации. В других контекстах биоэквивалентные антитела могут включать варианты антител, содержащие аминокислотные замены, которые модифицируют характеристики гликозилирования антител, например, мутации, устраняющие или удаляющие гликозилирование.

Анти-ACVR1 антитела, содержащие варианты Fc

[00115] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения представлены анти-ACVR1 антитела, содержащие Fc-домен, содержащий одну или более мутаций, которые усиливают или ослабляют связывание антитела с рецептором FcRn, например, при кислотном pH по сравнению с нейтральным pH. Например, настоящее изобретение включает анти-ACVR1 антитела, содержащие мутацию в области C_H2 или C_H3 Fc-домена, при этом мутация(и) увеличивает(ют) аффинность Fc-домена к FcRn в кислой среде (например, в эндосомах, где pH находится в диапазоне от примерно

5,5 до примерно 6,0). Такие мутации могут приводить к увеличению времени полувыведения антитела из сыворотки при введении животному. Неограничивающие примеры таких модификаций Fc включают, например, модификацию в положении 250 (например, E или Q); 250 и 428 (например, L или F); 252 (например, L/Y/F/W или T), 254 (например, S или T) и 256 (например, S/R/Q/E/D или T); или модификацию в положении 428 и/или 433 (например, H/L/R/S/P/Q или K) и/или 434 (например, A, W, H, F или Y [N434A, N434W, N434H, N434F или N434Y]); или модификацию в положении 250 и/или 428; или модификацию в положении 307 или 308 (например, 308F, V308F) и 434. В одном из вариантов осуществления модификация содержит модификацию 428L (например, M428L) и 434S (например, N434S); модификацию 428L, 259I (например, V259I) и 308F (например, V308F); модификацию 433K (например, H433K) и 434 (например, 434Y); модификацию 252, 254 и 256 (например, 252Y, 254T и 256E); модификацию 250Q и 428L (например, T250Q и M428L); и модификацию 307 и/или 308 (например, 308F или 308P). В другом варианте осуществления модификация содержит модификацию 265A (например, D265A) и/или модификацию 297A (например, N297A).

[00116] Например, настоящее изобретение включает анти-ACVR1 антитела, содержащие Fc-домен, содержащий одну или более пар или групп мутаций, выбранных из группы, состоящей из: 250Q и 248L (например, T250Q и M248L); 252Y, 254T и 256E (например, M252Y, S254T и T256E); 428L и 434S (например, M428L и N434S); 257I и 311I (например, P257I и Q311I); 257I и 434H (например, P257I и N434H); 376V и 434H (например, D376V и N434H); 307A, 380A и 434A (например, T307A, E380A и N434A); и 433K и 434F (например, H433K и N434F). В рамках настоящего изобретения рассматриваются все возможные комбинации вышеуказанных мутаций Fc-домена и других мутаций в вариабельных доменах антитела, раскрытых в настоящем описании.

[00117] Настоящее изобретение также относится к анти-ACVR1 антителам, содержащим химерную константную область тяжелой цепи (C_H), где химерная область C_H содержит сегменты, полученные из областей C_H более чем одного изотипа иммуноглобулина. Например, антитела по изобретению могут содержать химерную область C_H , содержащую часть или весь домен C_{H2} , полученный из молекулы человеческого IgG1, IgG2 или IgG4, в комбинации с частью или полным доменом C_{H3} , полученным из молекулы человеческого IgG1, молекула человеческого IgG2 или человеческого IgG4. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитела по изобретению содержат химерную область C_H с химерной шарнирной областью. Например, химерный шарнир может содержать аминокислотную последовательность «верхнего шарнира» (аминокислотные остатки в положениях 216-227 согласно нумерации EU), полученную из шарнирной области человеческого IgG1, IgG2 или IgG4, в комбинации с последовательностью «нижнего шарнира» (аминокислотные остатки в положениях 228-236 согласно нумерации EU), полученной из шарнирной области человеческого IgG1, человеческого IgG2 или человеческого IgG4. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления химерная шарнирная область содержит

аминокислотные остатки, полученные из верхнего шарнира человеческого IgG1 или IgG4, и аминокислотные остатки, полученные из нижнего шарнира человеческого IgG2. Антитело, содержащее химерную область C_H, раскрытую в настоящем описании, в некоторых вариантах осуществления может проявлять модифицированные эффекторные функции Fc, не оказывая при этом неблагоприятное воздействие на терапевтические или фармакокинетические свойства антитела. (См., например, публикацию заявки на патент США 2014/0243504, описание которой полностью включено в настоящее описание посредством ссылки).

Биологические характеристики антител

[00118] В общем случае, антитела по настоящему изобретению функционируют через связывание с белком ACVR1, снижая при этом его активность. Например, настоящее изобретение включает антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, которые связываются с человеческим белком ACVR1 (например, при 25°C или 37°C) с K_D менее 500 нМ, измеренной с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, в формате анализа, описанном в настоящем описании в Примере 3.

[00119] В некоторых вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связывают ACVR1 с K_D менее примерно 500 нМ, менее примерно 400 нМ, менее примерно 300 нМ, менее примерно 200 нМ, менее примерно 100 нМ, менее примерно 50 нМ, менее примерно 25 нМ, менее примерно 10 нМ, менее примерно 5 нМ, менее примерно 3 нМ, менее примерно 2 нМ, менее примерно 1 нМ, измеренной в анализе методом поверхностного плазмонного резонанса, например, в формате анализа, описанном в настоящем описании в примере 3, или в по существу аналогичном анализе. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к выделенному анти-ACVR1 антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которое представляет собой полностью человеческое моноклональное антитело.

[00120] В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связываются с внеклеточным доменом человеческого ACVR1, слитым с Fc (например, SEQ ID NO: 339), при 25°C с константой диссоциации (K_D) менее 60 нМ, менее 12 нМ, менее 2 нМ, менее 1 нМ или менее 0,5 нМ, измеренной в анализе методом поверхностного плазмонного резонанса, например, в формате анализа, определенном в настоящем описании в примере 3, или в по существу аналогичном анализе.

[00121] В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связываются с внеклеточным доменом человеческого ACVR1, слитым с mFc (SEQ ID NO: 339), при 37°C с константой диссоциации (K_D) менее 150 нМ, менее 15 нМ, менее 5 нМ, менее 1,5 нМ или менее 1 нМ, измеренной в анализе методом поверхностного плазмонного резонанса, например, в формате анализа, описанном в настоящем описании в примере 3, или в по существу аналогичном анализе.

[00122] В некоторых вариантах осуществления антитела или их

антигенсвязывающие фрагменты связываются с внеклеточным доменом человеческого ACVR1, слитым с мус-мус-гексагистидиновой меткой (например, SEQ ID NO: 338), при 25°C с K_D менее 300 нМ, менее 150 нМ, менее 25 нМ, менее 10 нМ, менее 5 нМ, менее 3 нМ или менее 2 нМ, измеренной в анализе методом поверхностного плазмонного резонанса, например, в формате анализа, описанном в настоящем описании в примере 3, или в по существу аналогичном анализе.

[00123] В некоторых вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связываются с внеклеточным доменом человеческого ACVR1, слитым с мус-мус-гексагистидиновой меткой (например, SEQ ID NO: 338), при 37°C с K_D менее 500 нМ, менее 50 нМ, менее 25 нМ, менее 10 нМ, измеренной в анализе методом поверхностного плазмонного резонанса, например, в формате анализа, описанном в настоящем описании в примере 3, или в по существу аналогичном анализе.

[00124] В некоторых вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты не связывают мышинный ACVR1, например, в формате анализа, описанном в настоящем описании в примере 3, или в по существу аналогичном анализе.

[00125] В некоторых вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связываются с внеклеточным доменом мышинного ACVR1, слитым с мус-мус-гексагистидиновой меткой (например, SEQ ID NO: 340), при 25°C с K_D более 500 нМ, измеренной в анализе методом поверхностного плазмонного резонанса, например, в формате анализа, описанном в настоящем описании в примере 3, или в по существу аналогичном анализе.

[00126] В некоторых вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связываются с внеклеточным доменом мышинного ACVR1, слитым с мус-мус-гексагистидиновой меткой (например, SEQ ID NO: 340), при 37°C с K_D более 500 нМ, измеренной в анализе методом поверхностного плазмонного резонанса, например, в формате анализа, описанном в настоящем описании в примере 3, или в по существу аналогичном анализе. Настоящее изобретение также включает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с клетками, экспрессирующими человеческий белок ACVR1 или человеческий белок ACVR(R206H), например, в формате анализа, описанном в настоящем описании в примере 3, или в по существу аналогичном анализе.

[00127] В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела или их антигенсвязывающие фрагменты ингибируют активацию клеток, экспрессирующих человеческий ACVR1(R206H), человеческим активинном А с IC_{50} менее 25 нМ, измеренной в клеточном биологическом анализе, например, в формате анализа, описанном в настоящем описании в примере 6, или в по существу аналогичном анализе.

[00128] В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела или их антигенсвязывающие фрагменты ингибируют активацию клеток, экспрессирующих человеческий ACVR1(R206H), человеческим BMP7 с IC_{50} менее 20 нМ, менее 5 нМ, менее

3 нМ или менее 1 нМ или менее, измеренной в клеточном биологическом анализе, например, в формате анализа, описанном в настоящем описании в примере 6, или в по существу аналогичном анализе.

[00129] Изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые в значительной степени снижают уровень гепсидина в сыворотке при введении мышам, экспрессирующим человеческий ACVR1, вместо мышинового аллеля, например, в формате анализа, описанном в настоящем описании в примере 7, или в по существу аналогичном анализе.

[00130] В некоторых вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты в значительной степени повышают уровни железа в сыворотке при введении мышам, экспрессирующим человеческий ACVR1, вместо мышинового аллеля, например, в формате анализа, описанном в настоящем описании в примере 7, или в по существу аналогичном анализе.

[00131] В некоторых вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты ингибируют передачу сигналов ACVR1 дикого типа при введении мышам, экспрессирующим человеческий ACVR1, вместо мышинового аллеля, например, в формате анализа, описанном в настоящем описании в примере 7, или в по существу аналогичном анализе.

[00132] В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению в значительной степени ослабляют гетеротопическую оссификацию (НО) в посттравматической модели НО у мышей дикого типа, например, описанной в примере 8 настоящего описания, или в по существу аналогичной модели.

[00133] В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела или их антигенсвязывающие фрагменты специфически связываются с человеческим ACVR1, его фрагментом или его мутантом и содержат HCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей HCVR, перечисленных в таблице 1, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей LCVR, перечисленных в таблице 1.

[00134] В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к выделенному рекомбинантному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которое специфически связывается с белком ACVR1 и ингибирует ACVR1-опосредованную передачу сигнала костного морфогенетического белка (BMP), где антитело или его фрагмент проявляют одну или более из следующих характеристик: (a) представляет собой полностью человеческое моноклональное антитело; (b) связывается с внеклеточным доменом человеческого ACVR1, слитым с Fc (например, SEQ ID NO: 339), при 25°C с константой диссоциации (K_D) менее 60 нМ, менее 12 нМ, менее 2 нМ, менее 1 нМ или менее 0,5 нМ, измеренной в анализе методом поверхностного плазмонного резонанса; (c) связывается с внеклеточным доменом человеческого ACVR1, слитым с mFc

(SEQ ID NO: 339), при 37°C с константой диссоциации (K_D) менее 150 нМ, менее 15 нМ, менее 5 нМ, менее 1,5 нМ или менее 1 нМ, измеренной в анализе методом поверхностного плазмонного резонанса; (d) связывается с внеклеточным доменом человеческого ACVR1, слитым с мус-мус-гексагистидиновой меткой (например, SEQ ID NO: 338), при 25°C с K_D менее 300 нМ, менее 150 нМ, менее 25 нМ, менее 10 нМ, менее 5 нМ, менее 3 нМ или менее 2 нМ, измеренной в анализе методом поверхностного плазмонного резонанса; (e) связывается с внеклеточным доменом человеческого ACVR1, слитым с мус-мус-гексагистидиновым маркером (например, SEQ ID NO: 338), при 37°C с K_D менее 500 нМ, менее 50 нМ, менее 25 нМ, менее 10 нМ, измеренной в анализе методом поверхностного плазмонного резонанса; (f) не связывается с мышинным ACVR1 или связывается с внеклеточным доменом мышинового ACVR1, слитым с мус-мус-гексагистидиновой меткой (например, SEQ ID NO: 340), при 25°C с K_D более 500 нМ, измеренной в анализе методом поверхностного плазмонного резонанса; (g) не связывается с мышинным ACVR1 или связывается с внеклеточным доменом мышинового ACVR1, слитым с мус-мус-гексагистидиновой меткой (например, SEQ ID NO: 340), при 37°C с K_D более 500 нМ, измеренной в анализе методом поверхностного плазмонного резонанса; (k) связывается с клетками, экспрессирующими человеческий белок ACVR1 или человеческий белок ACVR(R206H); (l) ингибирует активацию клеток, экспрессирующих человеческий ACVR1(R206H), человеческим активином А с IC_{50} менее 25 нМ, измеренной в клеточном биологическом анализе; (m) ингибирует активацию клеток, экспрессирующих человеческий ACVR1(R206H), человеческим BMP7 с IC_{50} менее 20 нМ, менее 5 нМ, менее 3 нМ или менее 1 нМ или менее, измеренной в клеточном биологическом анализе; (m) в значительной степени снижает уровень гепсидина в сыворотке при введении мышам, экспрессирующим человеческий ACVR1 вместо мышинового аллеля; (n) в значительной степени повышает уровень железа в сыворотке при введении мышам, экспрессирующим человеческий ACVR1 вместо мышинового аллеля; и/или (o) ингибирует передачу сигналов ACVR1 дикого типа при введении мышам, экспрессирующим человеческий ACVR1 вместо мышинового аллеля; и (p) содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей HCVR, перечисленных в таблице 1, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей LCVR, перечисленных в таблице 1.

[00135] Антитела по настоящему изобретению могут обладать одной или более из вышеупомянутых биологических характеристик или любыми их комбинациями. Другие биологические характеристики антител по настоящему изобретению будут очевидны специалисту в данной области из обзора настоящего описания, включая приведенные в настоящем описании рабочие примеры.

Картирование эпитопов и родственные технологии

[00136] Настоящее изобретение относится к анти-ACVR1 антителам, которые взаимодействуют с одной или более аминокислотами, находящимися в одной или более

областях молекулы белка ACVR1. Эпитоп, с которым связываются антитела, может состоять из одной непрерывной последовательности из 3 или более (например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более) аминокислот, расположенных в любом из вышеупомянутых доменов молекулы белка ACVR1 (например, линейный эпитоп в домене). Альтернативно, эпитоп может состоять из множества несмежных аминокислот (или аминокислотных последовательностей), расположенных внутри одного или обоих вышеупомянутых доменов молекулы белка (например, конформационный эпитоп).

[00137] Для определения, «взаимодействует ли антитело с одной или более аминокислотами» в полипептиде или белке могут быть использованы различные методы, известные специалистам в данной области. Иллюстративные методы включают, например, рутинные анализы перекрестного блокирования, такие как описанные в *Antibodies*, Harlow and Lane (Cold Spring Harbour Press, Cold Spring Harbour, NY). Другие методы включают аланиновый сканирующий мутационный анализ, блот-анализ пептидов (Reineke (2004) *Methods Mol. Biol.* 248:443-63), анализ расщепления пептидов, кристаллографические исследования и ЯМР-анализ. Кроме того, можно использовать такие методы, как удаление эпитопа, экстракция эпитопа и химическая модификация антигенов (Tomer (2000) *Prot. Sci.* 9:487-496). Другим методом, который можно использовать для идентификации аминокислот в полипептиде, с которым взаимодействует антитело, является обмен водород/дейтерий, определяемый масс-спектрометрией. В общих чертах, метод обмена водород/дейтерий включает мечение представляющего интерес белка дейтерием с последующим связыванием антитела с меченым дейтерием белком. Затем комплекс белок/антитело переносят в воду, и обмениваемые протоны в аминокислотах, которые защищены комплексом антител, подвергают обратному обмену дейтерия на водород с меньшей скоростью, чем обмениваемые протоны в аминокислотах, которые не являются частью границы раздела. В результате аминокислоты, образующие часть границы раздела белок/антитело, могут удерживать дейтерий и, следовательно, иметь относительно более высокую массу по сравнению с аминокислотами, не включенными в границу раздела. После диссоциации антитела целевой белок подвергают расщеплению протеазами и масс-спектрометрическому анализу, выявляя таким образом меченные дейтерием остатки, соответствующие конкретным аминокислотам, с которыми взаимодействует антитело. См., например, Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267:252-259; Engen and Smith (2001) *Anal. Chem.* 73:256A-265A.

[00138] Термин «эпитоп» относится к участку на антигене, на который реагируют В- и/или Т-клетки. Эпитопы В-клеток могут быть образованы как из смежных аминокислот, так и из несмежных аминокислот, совмещенных в результате третичной укладки белка. Эпитопы, образованные из смежных аминокислот, обычно сохраняются при воздействии денатурирующих растворителей, тогда как эпитопы, образованные в результате третичной укладки, обычно теряются при обработке денатурирующими

растворителями. Эпитоп обычно включает по меньшей мере 3 и чаще по меньшей мере 5 или 8-10 аминокислот в уникальной пространственной конформации.

[00139] Основанное на модификации профилирование антител (MAP), также известное как основанное на структуре антигена профилирование антител (ASAP), представляет собой метод, который позволяет классифицировать большое количество моноклональных антител (mAb), направленных против одного и того же антигена, по сходству профиля связывания каждого антитела с химически или ферментативно модифицированными поверхностями антигена (см. патент США 2004/0101920, специально включенный в настоящее описание во всей своей полноте посредством ссылки). Каждая категория может отражать уникальный эпитоп, который либо явно отличается от эпитопа, представленного в другой категории, либо частично перекрывается с ним. Такой метод позволяет быстро отфильтровать генетически идентичные антитела, что позволяет сосредоточить основное внимание на характеристике генетически различных антител. В случае применения при скрининге гибридом MAP может облегчить идентификацию редких гибридомных клонов, которые продуцируют mAb требуемыми характеристиками. MAP можно использовать для сортировки антител по изобретению на группы антител, связывающихся с разными эпитопами.

[00140] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает анти-ACVR1 антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые взаимодействуют с одним или более эпитопами, находящимися во внеклеточном домене ACVR1. Эпитоп(ы) может(могут) состоять из одной или более смежных последовательностей из 3 или более (например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более) аминокислот, расположенных во внеклеточном домене ACVR1. Альтернативно эпитоп может состоять из множества несмежных аминокислот (или аминокислотных последовательностей), расположенных в белке ACVR1.

[00141] Настоящее изобретение относится к анти-ACVR1 антителам, которые связываются с тем же эпитопом или частью эпитопа, что и любые конкретные иллюстративные антитела, перечисленные в таблице 1. Аналогично, настоящее изобретение также относится к анти-ACVR1 антителам, которые конкурируют за связывание с белком ACVR1 или его фрагментом с любым из конкретных иллюстративных антител, перечисленных в таблице 1. Например, настоящее изобретение относится к анти-ACVR1 антителам, которые перекрестно конкурируют за связывание с белком ACVR с одним или более антителами, перечисленными в таблице 1.

[00142] С помощью стандартных способов, известных в данной области, можно легко определить, связывается ли антитело с тем же эпитопом, что и эталонное анти-ACVR1 антитело, или конкурирует с ним за связывание. Например, чтобы определить, связывается ли тестируемое антитело с тем же эпитопом, что и эталонное анти-ACVR1 антитело по изобретению, связывание эталонного антитела с белком или пептидом ACVR1 осуществляют в условиях насыщения. Затем оценивают способность тестируемого антитела связываться с молекулой белка ACVR1. Если тестируемое

антитело способно связываться с ACVR1 после насыщения связывания с эталонным анти-ACVR1 антителом можно сделать вывод, что тестируемое антитело связывается с другим эпитопом, отличным от того, с которым связывается эталонное анти-ACVR1 антитело. С другой стороны, если тестируемое антитело не способно связываться с белком ACVR1 после насыщения связывания с эталонным анти-ACVR1 антителом, тестируемое антитело может связываться с тем же эпитопом, что и эпитоп, который связан с эталонным анти-ACVR1 антителом по изобретению.

[00143] Для определения, конкурирует ли антитело за связывание с эталонным анти-ACVR1 антителом, описанный выше метод связывания выполняют в двух ориентациях: в первой ориентации связывание эталонного антитела с белком ACVR1 осуществляют в условиях насыщения с последующей оценкой связывания тестируемого антитела с молекулой ACVR1. Во второй ориентации выполняют связывание тестируемого антитела с молекулой ACVR1 в условиях насыщения с последующей оценкой связывания эталонного антитела с молекулой ACVR1. Если в обеих ориентациях только первое (насыщающее) антитело способно связываться с молекулой ACVR1, то делают вывод, что тестируемое антитело и эталонное антитело конкурируют за связывание с ACVR1. Как будет понятно специалисту в данной области техники, антитело, которое конкурирует за связывание с эталонным антителом, не обязательно может связываться с тем же эпитопом, что и эталонное антитело, но может стерически блокировать связывание эталонного антитела через связывание с перекрывающимся эпитопом или соседним эпитопом.

[00144] Два антитела связываются с одним и тем же или перекрывающимся эпитопом, если каждое из них конкурентно ингибирует (блокирует) связывание другого с антигеном. Иными словами, 1-, 5-, 10-, 20- или 100-кратный избыток одного антитела ингибирует связывание другого на по меньшей мере 50%, но предпочтительно на 75%, 90% или даже на 99% в анализе конкурентного связывания (см., например, Junghans et al., Cancer Res. 1990 50:1495-1502). Альтернативно, два антитела имеют один и тот же эпитоп, если по существу все аминокислотные мутации в антигене, которые снижают или устраняют связывание одного антитела, снижают или устраняют связывание другого. Два антитела имеют перекрывающиеся эпитопы, если некоторые аминокислотные мутации, которые уменьшают или устраняют связывание одного антитела, уменьшают или устраняют связывание другого.

[00145] Затем могут быть проведены дополнительные рутинные эксперименты (например, мутация пептида и анализ связывания) с целью подтверждения, действительно ли наблюдаемое отсутствие связывания тестируемого антитела является результатом связывания с тем же эпитопом, с которым связывается эталонное антитело, или отсутствие наблюдаемого связывания является результатом стерической блокировки (или другого явления). Эксперименты такого рода можно выполнять методом ELISA, RIA, поверхностного плазмонного резонанса, проточной цитометрии или с помощью любого другого количественного или качественного анализа связывания антител, доступного в

данной области.

Иммуноконъюгаты

[00146] Настоящее изобретение относится к человеческому моноклональному анти-ACVR1 антителу, конъюгированному с терапевтическим фрагментом («иммуноконъюгатом»), для лечения ACVR1-ассоциированного заболевания или расстройства (например, анемии или эктопической оссификации). В контексте настоящего описания термин «иммуноконъюгат» относится к антителу, которое химически или биологически связано с радиоактивным агентом, цитокином, интерфероном, целевым или репортерным фрагментом, ферментом, пептидом или белком или терапевтическим агентом. Антитело может быть связано с радиоактивным агентом, цитокином, интерфероном, целевым или репортерным фрагментом, ферментом, пептидом или терапевтическим агентом в любом месте молекулы при условии, что оно способно связывать свою мишень. Примеры иммуноконъюгатов включают конъюгаты антитело-лекарственное средство и слитые белки антитело-токсин. В одном из вариантов осуществления агент может представлять собой другое второе антитело к белку ACVR1. Тип терапевтического фрагмента, который может быть конъюгирован с анти-ACVR1 антителом, выбирают с учетом подлежащего лечению состояния и требуемого терапевтического эффекта, который необходимо достичь. Примеры подходящих агентов для образования иммуноконъюгатов известны в данной области; см., например, WO 05/103081.

Полиспецифические антитела

[00147] Антитела по настоящему изобретению могут быть моноспецифическими, биспецифическими или полиспецифическими. Полиспецифические антитела могут быть специфичными к разным эпитопам одного целевого полипептида или могут содержать антигенсвязывающие домены, специфичные к более чем одному целевому полипептиду. См., например, Tutt et al., 1991, J. Immunol. 147:60-69; Kufer et al., 2004, Trends Biotechnol. 22:238-244.

[00148] Любая из полиспецифических антигенсвязывающих молекул по изобретению или их варианты могут быть сконструированы с помощью стандартных молекулярно-биологических методов (например, метода экспрессии рекомбинантной ДНК и белка), известных специалисту в данной области техники.

[00149] В некоторых вариантах осуществления ACVR1-специфические антитела создают в биспецифическом формате («биспецифические»), в котором переменные области, связывающиеся с отдельными доменами белка ACVR1, связаны вместе для придания двухдоменной специфичности в пределах одной связывающей молекулы. Соответствующим образом разработанные биспецифические препараты могут повышать общую эффективность ингибирования белка ACVR1 за счет повышения как специфичности, так и avidности связывания. Переменные области со специфичностью к отдельным доменам (например, сегменты N-концевого домена) или которые могут связываться с разными областями в пределах одного домена, объединяют в пары на

структурном каркасе, который позволяет каждой области одновременно связываться с отдельными эпитопами или с разными областями в пределах одного домена. В одном из примеров для получения биспецифичности переменные области тяжелой цепи (V_H) из связывающего вещества со специфичностью к одному домену воссоединяют с переменными областями легкой цепи (V_L) из нескольких связывающих веществ со специфичностью ко второму домену для идентификации неродственных партнеров V_L , которые могут быть спарены с исходным доменом V_H без нарушения исходной специфичности к этому V_H . Таким образом, один сегмент V_L (например, V_{L1}) может быть объединен с двумя разными доменами V_H (например, V_{H1} и V_{H2}) с получением биспецифичности, состоящей из двух связывающих «плеч» (V_{H1} - V_{L1} и V_{H2} - V_{L1}). Использование одного сегмента V_L уменьшает сложность системы и, таким образом, упрощает и повышает эффективность процессов клонирования, экспрессии и очистки, используемых для получения биспецифичности (см., например, US 2011/0195454 и US 2010/0331527).

[00150] Альтернативно, антитела, которые связывают более одного домена и вторую мишень, такую как, помимо прочего, например, второе отличное анти-ACVR1 антитело, можно получить в биспецифическом формате с помощью способов, описанных здесь, или другими способами, известными специалистам в данной области. Переменные области антитела, связывающиеся с отдельными областями, могут быть связаны вместе с переменными областями, которые связываются с релевантными сайтами, например, внеклеточного домена ACVR1, для придания двойной антигенной специфичности в пределах одной связывающей молекулы. Соответствующим образом разработанные биспецифичности такого рода выполняют двойную функцию. Переменные области со специфичностью к внеклеточному домену объединяют с переменной областью со специфичностью за пределами внеклеточного домена и спаривают на структурном каркасе, что позволяет каждой переменной области связываться с отдельными антигенами.

[00151] Иллюстративный формат биспецифического антитела, который можно использовать в контексте настоящего изобретения, включает использование первого домена C_{H3} иммуноглобулина (Ig) и второго домена C_{H3} Ig, где первый и второй домены C_{H3} Ig отличаются от друг друга по меньшей мере одной аминокислотой, и при этом по меньшей мере одно различие в аминокислотах уменьшает связывание биспецифического антитела с белком А по сравнению с биспецифическим антителом, которое не отличается аминокислотами. В одном из вариантов осуществления первый домен Ig C_{H3} связывается с белком А, а второй домен Ig C_{H3} содержит мутацию, которая уменьшает или отменяет связывание белка А, такую как модификация H95R (по нумерации экзонов IMGT; H435R по нумерации EU). Второй C_{H3} может дополнительно содержать модификацию Y96F (по IMGT; Y436F по EU). Дополнительные модификации, которые возможны во втором C_{H3} , включают: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M и V82I (по IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M и V422I по EU) в случае антител IgG1; N44S, K52N и V82I (IMGT; N384S,

K392N и V422I по EU) в случае антител IgG2; и Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q и V82I (по IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q и V422I по EU) в случае антител IgG4. Варианты формата биспецифического антитела, описанного выше, включены в объем настоящего изобретения.

[00152] Другие иллюстративные биспецифические форматы, которые можно использовать в контексте настоящего изобретения, включают, без ограничения, например, биспецифические форматы на основе scFv или диатела, слияния IgG-scFv, двойной переменный домен (DVD)-Ig, квадрому, выступы-во-впадинах, общую легкую цепь (например, общую легкую цепь с выступами-во-впадинах и т.д.), CrossMab, CrossFab, (SEED)тело, лейциновую молнию, Duobody, IgG1/IgG2, Fab двойного действия (DAF)-IgG и биспецифические форматы Mab2 (см., например, Klein et al. 2012, mAbs 4:6, 1-11 и приведенные там ссылки, в которых представлен обзор вышеприведенных форматов). Биспецифические антитела также могут быть получены путем конъюгации пептид/нуклеиновая кислота, например, где сайт-специфические конъюгаты антитело-олигонуклеотид создают с применением неприродных аминокислот с независимой химической активностью, которые затем подвергаются самосборке в мультимерные комплексы с определенным составом, валентностью и геометрией. (См., например, Kazane et al., J. Am. Chem. Soc. [Epub: 4 декабря 2012 г.]).

Терапевтическое введение и составы

[00153] Изобретение относится к терапевтическим композициям, содержащим анти-ACVR1 антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению. Терапевтические композиции по изобретению обычно вводят с подходящими носителями, вспомогательными веществами и другими агентами, которые включают в составы для улучшения переноса, доставки, переносимости и т.п. В формуляре, известном всем химикам-фармацевтам, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA, можно найти огромное количество подходящих составов. Эти составы включают, например, порошки, пасты, мази, желе, воски, масла, липиды, везикулы, содержащие липиды (катионные или анионные) (такие как LIPOFECTI™), конъюгаты ДНК, безводные абсорбирующие пасты, эмульсии масло-в-воде и вода-в-масле, эмульсионный карбовакс (полиэтиленгликоли различной молекулярной массы), полутвердые гели и полутвердые смеси, содержащие карбовакс. См. также Powell et al. «Compendium of excipients for parental formulations» PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311.

[00154] Доза антитела может меняться в зависимости от возраста и размера субъекта, которому назначено введение, целевого заболевания, состояния, пути введения и т.п. Когда антитело по настоящему изобретению используется для лечения заболевания или расстройства у взрослого пациента или для профилактики такого заболевания, предпочтительным является введение антитела по настоящему изобретению в виде однократной дозы от примерно 0,1 до примерно 100 мг/кг массы тела. В зависимости от тяжести состояния можно корректировать частоту и продолжительность лечения. В

некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению можно вводить в виде начальной дозы, составляющей по меньшей мере от примерно 0,1 мг до примерно 800 мг, от примерно 1 до примерно 600 мг, от примерно 5 до примерно 500 мг или от примерно 10 мг до примерно 400 мг. В некоторых вариантах осуществления за начальной дозой может следовать введение второй или множества последующих доз антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в количестве, которое может быть примерно таким же или меньшим, чем начальная доза, при этом последующие дозы разделены по меньшей мере 1-3 днями; по меньшей мере одной неделей, по меньшей мере 2 неделями; по меньшей мере 3 неделями; по меньшей мере 4 неделями; по меньшей мере 5 неделями; по меньшей мере 6 неделями; по меньшей мере 7 неделями; по меньшей мере 8 неделями; по меньшей мере 9 неделями; по меньшей мере 10 неделями; по меньшей мере 12 неделями; или по меньшей мере 14 неделями.

[00155] Известны различные системы доставки, которые могут быть использованы для введения фармацевтической композиции по изобретению, например, инкапсуляция в липосомы, микрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать мутантные вирусы, эндоцитоз, опосредованный рецептором (см., например, Wu et al. (1987) *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432). Способы введения включают, без ограничения, внутрикожный, трансдермальный, внутримышечный, внутрибрюшинный, внутривенный, подкожный, интраназальный, эпидуральный, интрацеребровентрикулярный и пероральный пути введения. Композицию можно вводить любым удобным способом, например, путем инфузии или болюсной инъекции, путем всасывания через эпителиальные или кожно-слизистые оболочки (например, слизистую оболочку полости рта, слизистую оболочку прямой кишки и кишечника и т.д.), ее также можно вводить вместе с другими биологически активными агентами. Введение может быть системным или местным. Фармацевтическая композиция также может быть доставлена в везикуле, в частности, в липосоме (см., например, Langer (1990) *Science* 249:1527-1533).

[00156] В настоящем описании также предусмотрено применение наночастиц для доставки антител по настоящему изобретению. Наночастицы, конъюгированные с антителами, могут использоваться как в терапевтических, так и в диагностических целях. Наночастицы, конъюгированные с антителами, и способы получения и применения подробно описаны Arruebo, M., et al. 2009 г. («Antibody-conjugated nanoparticles for biomedical applications» в *J. Nanomat.* Volume 2009, ID статьи 439389, 24 стр., doi: 10.1155/2009/439389), включенной в настоящее описание посредством ссылки. Наночастицы могут быть разработаны и конъюгированы с антителами, содержащимися в фармацевтических композициях, для воздействия на клетки. Наночастицы для доставки лекарственных веществ также описаны, например, в патентах США 8257740 или 8246995, каждый из которых полностью включен в настоящий документ.

[00157] В определенных ситуациях фармацевтическая композиция может доставляться в системе с контролируемым высвобождением. В одном из вариантов

осуществления может использоваться насос. В другом варианте осуществления можно использовать полимерные материалы. В еще одном варианте осуществления система с контролируемым высвобождением может быть размещена вблизи цели воздействия композицией, что требует лишь части системной дозы.

[00158] Инъекционные препараты могут включать лекарственные формы для внутривенных, подкожных, внутрочерепных, внутрибрюшинных и внутримышечных инъекций, капельных введений и т.д. Эти инъекционные препараты могут быть приготовлены общеизвестными способами.

[00159] Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может быть доставлена подкожно или внутривенно с помощью стандартной иглы и шприца. Кроме того, в случае подкожной доставки, можно просто использовать шприц-ручку для доставки фармацевтической композиции по настоящему изобретению. Такое устройство доставки как ручка может быть многоразовым или одноразовым. В многоразовом устройстве доставки шприц-ручка обычно используется сменный картридж, содержащий фармацевтическую композицию. После того как фармацевтической композиции в картридже полностью введена и картридж опорожнился, пустой картридж можно выбросить и заменить новым картриджем, содержащим фармацевтическую композицию. После этого устройство доставки, ручку, можно использовать повторно. Одноразовое устройство доставки шприц-ручка не содержит сменного картриджа. В этом случае, одноразовое устройство доставки, ручка, поставляется предварительно заполненным фармацевтической композицией, находящейся в резервуаре внутри устройства. После опорожнения резервуара с фармацевтической композицией устройство полностью выбрасывается.

[00160] При лечении DIPG можно столкнуться с необходимостью преодоления гематоэнцефалического барьера. В некоторых вариантах осуществления гематоэнцефалический барьер преодолевается с помощью одного или более подходов, описанных в данной области техники, например, Parodi et al. 2019, *Pharmaceutics* 11:245.

[00161] Предпочтительно фармацевтические композиции для перорального или парентерального применения, описанные выше, готовят в виде дозированных форм в единичной дозе, соответствующей дозе активных ингредиентов. Такие лекарственные формы в единичной дозе включают, например, таблетки, пилюли, капсулы, препараты для инъекций (ампулы), суппозитории и т.д. Количество содержащегося антитела обычно составляет от примерно 5 до примерно 500 мг на лекарственную форму в единичной дозе; в частности, случае инъекций, предпочтительно, чтобы количество антитела находилось в пределах от примерно 5 до примерно 300 мг, и для других лекарственных форм - от примерно 10 до примерно 300 мг.

Терапевтическое применение антител

[00162] Антитела по настоящему изобретению применимы для лечения и/или профилактики ACVR1-ассоциированного заболевания, расстройства или состояния и/или для облегчения по меньшей мере одного симптома, связанного с таким заболеванием,

расстройством или состоянием. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению можно вводить в терапевтической дозе пациенту с заболеванием, расстройством или состоянием, ассоциированным с ACVR1 или мутантным белком ACVR.

[00163] В некоторых вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению применимы для лечения или профилактики по меньшей мере одного симптома или признака заболевания или расстройства, ассоциированного с ACVR1 или мутантным белком ACVR1, выбранного из группы, состоящей из гетеротопической оссификации, эктопической оссификации, дисплазии костей, анемии и диффузной внутренней глиомы моста.

[00164] В настоящем описании также представлено профилактическое применение одного или более антител по настоящему изобретению у субъектов, подверженных риску развития ACVR1-ассоциированного заболевания или расстройства.

[00165] В одном из вариантов осуществления изобретения антитела по изобретению используют для приготовления фармацевтической композиции или лекарственного средства для лечения пациентов, страдающих заболеванием, расстройством или состоянием, раскрытыми в настоящем описании. В другом варианте осуществления изобретения антитела по изобретению применяют в качестве дополнительной терапии с любым другим агентом или любым другим видом терапии, известным специалистам в данной области, полезным для лечения или облегчения заболевания, расстройства или состояния, раскрытого в настоящем описании.

Комбинированная терапия

[00166] Комбинированная терапия может включать антитело по настоящему изобретению и любой дополнительный терапевтический агент, который может быть успешно объединен с антителом по настоящему изобретению или с биологически активным фрагментом антитела по настоящему изобретению. Антитела по настоящему изобретению можно синергически комбинировать с одним или более лекарственными веществами или видами терапии, используемыми для лечения заболевания или расстройства, ассоциированного с ACVR1 или мутантным белком ACVR1. В некоторых вариантах осуществления антитела по изобретению можно комбинировать со вторым терапевтическим средством для облегчения одного или более симптомов указанного заболевания или состояния.

[00167] В зависимости от заболевания, расстройства или состояния антитела по настоящему изобретению можно использовать в комбинации с одним или более дополнительными терапевтическими агентами.

[00168] Примеры дополнительного терапевтического средства для лечения эктопической оссификации, которое можно вводить в комбинации с анти-ACVR1 антителом, могут включать, без ограничения, антитело к ингибитору активина А или его антигенсвязывающий фрагмент и анти-ACVR2 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, противовоспалительные средства, стероиды, бисфосфонаты, миорелаксанты и

агонисты гамма-рецептора ретиноевой кислоты (RAR).

[00169] Активины принадлежат к надсемейству трансформирующих факторов роста-бета (TGF- β) и оказывают широкий спектр биологических эффектов на клеточную пролиферацию, дифференцировку, метаболизм, гомеостаз и апоптоз, а также влияют на иммунный ответ и восстановление тканей. Активин А представляет собой дисульфидно-связанный гомодимер (две цепи бета-А), который связывается и активирует гетеромерные комплексы рецептора серин-треонинкиназы I типа (Act RI-A и Act RI-B) и II типа (Act RII-A и Act RII-B). Активин А может действовать в качестве лиганда к белкам ACVR1 или мутантным белкам ACVR1.

[00170] Примеры противовоспалительного лекарственного вещества могут включать аспирин, диклофенак, индометацин, ибупрофен, кетопрофен, напроксен, пироксикам, рофекоксиб, целекоксиб, азатиоприн, пеницилламин, метотрексат, сульфасалазин, лефлуномид, инфликсимаб и этанерцепт. Примеры стероида могут включать преднизолон, беклометазон, бетаметазон, флутиказон, дексаметазон и гидрокортизон. Примеры бисфосфоната могут включать алендронат, цимадронат, клодронат, этидронат, ибандронат, инкадронат, минодронат, неридронат, олпадронат, памидронат, пиридронат, ризедронат, тилудронат и золедронат. Примеры миорелаксантов могут включать циклобензаприн, метаксалон и баклофен. Примеры агонистов гамма-рецептора ретиноевой кислоты могут включать паловаротен. Примеры дополнительных терапевтических средств для лечения анемии могут включать рекомбинантный эритропоэтин (ЕРО) и добавки железа. Примеры дополнительных терапевтических методов лечения диффузной внутренней глиомы моста могут включать лучевую терапию или экспериментальную химиотерапию.

[00171] В контексте настоящего описания термин «в комбинации с» означает, что дополнительный(ые) терапевтически активный(ые) компонент(ы) можно вводить до, одновременно или после введения анти-ACVR1 антитела по настоящему изобретению. Термин «в комбинации с» также включает последовательное или одновременное введение анти-ACVR1 антитела и второго терапевтического средства.

[00172] Дополнительный(ые) терапевтически активный(ые) компонент(ы) можно вводить субъекту перед введением анти-ACVR1 антитела по настоящему изобретению. Например, первый компонент может считаться введенным «до» второго компонента, если первый компонент вводится за 1 неделю, за 72 часа, 60 часов, 48 часов, 36 часов, 24 часа, 12 часов, 6 часов, 5 часов, 4 часа, 3 часа, 2 часа, 1 час, 30 минут или менее чем за 30 минут до введения второго компонента. В других вариантах осуществления дополнительный(ые) терапевтически активный(ые) компонент(ы) можно вводить субъекту после введения анти-ACVR1 антитела по настоящему изобретению. Например, первый компонент может считаться введенным «после» второго компонента, если первый компонент вводится через 30 минут, 1 час, 2 часа, 3 часа, 4 часа, 5 часов, 6 часов, 12 часов, 24 часа, 36 часов, 48 часов, 60 часов, 72 часа и более после введения второго компонента. В других вариантах осуществления дополнительный(ые) терапевтически активный(ые) компонент(ы) можно

вводить субъекту одновременно с введением анти-ACVR1 антитела по настоящему изобретению. «Одновременное» введение для целей настоящего изобретения включает, например, введение субъекту анти-ACVR1 антитела и дополнительного терапевтически активного компонента в виде одной лекарственной формы или в виде отдельных лекарственных форм, вводимых субъекту друг за другом в пределах примерно 30 минут или менее. При введении в виде отдельных лекарственных форм каждую лекарственную форму можно вводить одним и тем же путем (например, оба, анти-ACVR1 антитело и дополнительный терапевтически активный компонент, могут быть введены внутривенно и т.д.); или альтернативно, пути введения каждой из лекарственных форм могут быть разными (например, анти-ACVR1 антитело может быть введено внутривенно, а дополнительный терапевтически активный компонент может быть введен перорально). В любом случае введение компонентов в одной лекарственной форме, в отдельных лекарственных формах одним и тем же путем или в отдельных лекарственных формах разными путями считается «одновременным введением» для целей настоящего изобретения. Для целей настоящего изобретения введение анти-ACVR1-антитела «до», «одновременно» или «после» (в соответствии с приведенным выше определением этих терминов) введения дополнительного терапевтически активного компонента считается введением анти-ACVR1 антитела «в комбинации с» дополнительным терапевтически активным компонентом.

[00173] Настоящее изобретение включает фармацевтические композиции, в которых анти-ACVR1 антитело по настоящему изобретению объединено с одним или более дополнительными терапевтически активными компонентами, как раскрыто в другом месте настоящего описания.

Диагностическое применение антител

[00174] Антитела по настоящему изобретению можно использовать для детектирования и/или измерения белка ACVR1 в образце, например, в диагностических целях. Некоторые варианты осуществления предусматривают применение одного или более антител по настоящему изобретению в анализах для выявления заболевания или расстройства, ассоциированного с ACVR1 или мутантным белком ACVR. Примеры диагностических анализов для ACVR1 могут включать, например, приведение образца, полученного от пациента, в контакт с анти-ACVR1 антителом по изобретению, где анти-ACVR1 антитело помечено детектируемой меткой или репортерной молекулой или используется в качестве лиганда захвата для селективного выделения ACVR1 из образцов пациентов. В качестве альтернативы, немеченое анти-ACVR1 антитело можно использовать в диагностических целях в комбинации со вторичным антителом, которое само является детектируемо меченым. Детектируемой меткой или репортерной молекулой может быть радиоизотоп, такой как ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S или ^{125}I ; флуоресцентный или хемилюминесцентный компонент, такой как изотиоцианат флуоресцеина или родамин; или фермент, такой как щелочная фосфатаза, β -галактозидаза, пероксидаза хрена или люцифераза. Конкретные иллюстративные анализы, которые можно использовать для

обнаружения или измерения ACVR1 в образце, включают твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммуноанализ (RIA) и сортировку клеток с активированной флуоресценцией (FACS).

[00175] Образцы, которые можно использовать в диагностических анализах для ACVR1 согласно настоящему изобретению, включают любой образец ткани или жидкости, полученный от пациента, который содержит определяемые количества либо белка ACVR1, либо его фрагментов в нормальных или патологических условиях. Как правило, уровни белка ACVR1 в конкретном образце, полученном от здорового пациента (например, от пациента, не страдающего ACVR1-ассоциированным заболеванием), измеряют для первоначального определения исходного, или стандартного, уровня ACVR1. Затем этот исходный уровень ACVR1 можно сравнить с уровнями ACVR1, измеренными в образцах, полученных от лиц, подозреваемых на наличие ACVR1-ассоциированного состояния или симптомов, ассоциированных с таким состоянием.

[00176] Антитела, специфичные к белку ACVR1, могут не содержать дополнительных меток или фрагментов или они могут содержать N-концевую или C-концевую метку или фрагмент. В одном из вариантов осуществления метка или фрагмент представляет собой биотин. В анализе связывания расположение метки (если она присутствует) может определять ориентацию пептида относительно поверхности, с которой связан пептид. Например, если поверхность покрыта авидином, пептид, содержащий N-концевой биотин, будет ориентирован таким образом, что C-концевая часть пептида будет удалена от поверхности.

ПРИМЕРЫ

[00177] Примеры ниже приведены для предоставления специалистам в данной области техники полного раскрытия и описания того, как можно реализовать и применить способы и композиции по изобретению, и они не предназначены для ограничения объема того, что авторы изобретения считают своим изобретением. Несмотря на предпринятые усилия по обеспечению точности используемых числовых значений (например, количеств, температуры и т.д.), следует учитывать наличие некоторых экспериментальных ошибок и отклонений. Если не указано иное, части представляют собой части по массе, молекулярная масса представляет собой среднюю молекулярную массу, температура выражена в градусах Цельсия, комнатная температура составляет примерно 25°C, и давление равно атмосферному или близко к нему.

Пример 1: Получение человеческих антител к рецептору 1 активина А (ACVR1)

[00178] Человеческие антитела к белку ACVR1 генерировали у мыши VELOCIMMUNE®, содержащей ДНК, кодирующую переменные области тяжелой цепи и легкой каппа-цепи человеческого иммуноглобулина. Мышей иммунизировали иммуногеном, содержащим внеклеточный домен человеческого белка ACVR1 (например, SEQ ID NO: 339).

[00179] Иммунный ответ антител контролировали с помощью ACVR1-

специфического иммунологического анализа. При достижении требуемого иммунного ответа спленоциты собирали и сливали с мышинными клетками миеломы для сохранения их жизнеспособности и получения гибридомных клеточных линий. Гибридомные клеточные линии подвергали скринингу и отбирали для идентификации клеточных линий, продуцирующих антитела, специфичные к ACVR1. Линии клеток использовали для получения нескольких химерных анти-ACVR1 антител (т.е. антител, обладающих человеческими вариабельными доменами и мышинными константными доменами).

[00180] Анти-ACVR1 антитела также выделяли непосредственно из мышинных антиген-позитивных В-клеток без слияния с клетками миеломы, как описано в патенте США 7582298, специально включенном в настоящее описание во всей своей полноте посредством ссылки. С помощью этого метода было получено несколько полностью человеческих анти-ACVR1 антител (т.е. антител, обладающих человеческими вариабельными доменами и человеческими константными доменами).

[00181] Иллюстративные антитела, сгенерированные как описано выше, обозначены как mAb27396, mAb27241, mAb27242, mAb27243, mAb27245, mAb27247, mAb27404, mAb27405, mAb27400, mAb22124, mAb22125, mAb22168, mAb29226, mAb29226, mAb29237, mAb29256, mAb29257, mAb29261, mAb29266, mAb22115.

[00182] Биологические свойства иллюстративных антител, полученных согласно способам этого примера, подробно описаны в изложенных ниже примерах.

Пример 2: Аминокислотные и нуклеотидные последовательности вариабельных областей тяжелой и легкой цепей

[00183] В таблице 1 представлены идентификаторы аминокислотных последовательностей вариабельных областей тяжелой и легкой цепей и CDR выбранных анти-ACVR1 антител по изобретению.

Таблица 1: Идентификаторы аминокислотных последовательностей

Обозначение антитела	SEQ ID NO:							
	HCV R	HCDR 1	HCDR 2	HCDR 3	LCV R	LCDR 1	LCDR 2	LCDR3
mAb27396	2	4	6	8	10	12	14	16
mAb27241	22	24	26	28	30	32	34	36
mAb27242	42	44	46	28	48	50	52	36
mAb27243	58	24	46	60	62	50	64	66
mAb27245	22	24	26	28	72	50	64	66
mAb27247	76	78	80	82	84	86	88	90
mAb27404	96	98	100	102	104	106	108	110
mAb27405	116	98	100	102	119	106	122	110
mAb27400	128	130	132	134	136	138	140	142

mAb22124	148	150	152	154	156	158	14	160
mAb22125	166	168	170	172	174	176	178	180
mAb22168	186	188	152	191	193	195	178	197
mAb29226	203	205	207	209	211	213	215	217
mAb29233	223	225	227	229	231	233	178	235
mAb29237	241	205	243	209	245	233	247	249
mAb29256	255	257	259	261	263	265	14	267
mAb29257	273	257	275	261	277	279	281	283
mAb29261	289	257	291	261	293	233	178	235
mAb29266	300	4	303	305	307	309	311	313
mAb22115	319	321	323	325	327	329	331	333

[00184] Соответствующие идентификаторы последовательностей нуклеиновых кислот представлены в Таблице 2.

Таблица 2: Идентификаторы последовательностей нуклеиновых кислот

	SEQ ID NO:							
Обозначение антитела	HCV R	HCDR1	HCDR 2	HCDR3	LCV R	LCDR 1	LCDR 2	LCDR 3
mAb27396	1	3	5	7	9	11	13	15
mAb27241	21	23	25	27	29	31	33	35
mAb27242	41	43	45	27	47	49	51	35
mAb27243	57	23	45	59	61	49	63	65
mAb27245	21	23	25	27	71	49	63	65
mAb27247	75	77	79	81	83	85	87	89
mAb27404	95	97	99	101	103	105	107	109
mAb27405	115	117	99	101	118	120	121	109
mAb27400	127	129	131	133	135	137	139	141
mAb22124	147	149	151	153	155	157	13	159
mAb22125	165	167	169	171	173	175	177	179
mAb22168	185	187	189	190	192	194	177	196
mAb29226	202	204	206	208	210	212	214	216
mAb29233	222	224	226	228	230	232	177	234
mAb29237	240	204	242	208	244	232	246	248
mAb29256	254	256	258	260	262	264	13	266
mAb29257	272	256	274	260	276	278	280	282

mAb29261	288	256	290	260	292	232	177	294
mAb29266	299	301	302	304	306	308	310	312
mAb22115	318	320	322	324	326	328	330	332

[00185] Антитела, упомянутые в настоящем описании, как правило содержат полностью человеческие переменные области, но могут иметь человеческие или мышиные константные области. Как будет понятно специалистам в данной области техники, антитело, имеющее конкретный изотип Fc, может быть преобразовано в антитело с другим изотипом Fc (например, антитело с Fc мышиного IgG1 может быть преобразовано в антитело с человеческим IgG4 и т.д.), но в любом случае переменные домены (включая CDR), которые указаны числовыми идентификаторами, приведенными в таблицах 1 или 2, остаются такими же, и ожидается, что свойства связывания с антигеном будут идентичными или по существу аналогичными независимо от природы Fc-домена. В некоторых вариантах осуществления выбранные антитела с Fc мышиного IgG1 преобразуют в антитела с Fc человеческим IgG4. В одном из вариантов осуществления Fc-домен IgG4 содержит 2 или более аминокислотных замен, как описано в US 20100331527. В одном из вариантов осуществления Fc человеческого IgG4 содержит мутацию серина на пролин в шарнирной области (S108P) для стабилизации димера. Если не указано иное, все антитела, использованные в приведенных ниже примерах, содержат человеческий изотип IgG4.

[00186] В таблице 3 представлены идентификаторы последовательностей нуклеиновых кислот (ДНК) и аминокислотные последовательности (PEP) тяжелой и легкой цепей (HC и LC) выбранных анти-ACVR1 антител по изобретению.

Таблица 3. Идентификаторы последовательностей тяжелых и легких цепей

Обозначение антитела	SEQ ID NO:			
	ДНК HC	HC PEP	ДНК LC	LC PEP
mAb27396	17	18	19	20
mAb27241	37	38	39	40
mAb27242	53	54	55	56
mAb27243	67	68	69	70
mAb27245	37	38	73	74
mAb27247	91	92	93	94
mAb27404	111	112	113	114
mAb27405	123	124	125	126
mAb27400	143	144	145	146
mAb22124	161	162	163	164
mAb22125	181	182	183	184

mAb22168	198	199	200	201
mAb29226	218	219	220	221
mAb29233	236	237	238	239
mAb29237	250	251	252	253
mAb29256	268	269	270	271
mAb29257	284	285	286	287
mAb29261	295	296	297	298
mAb29266	314	315	316	317
mAb22115	334	335	336	337

Пример 3. Связывание анти-ACVR1 антитела, определенное с помощью поверхностного плазмонного резонанса.

Экспериментальная процедура

[00187] Константы равновесной диссоциации (K_D) для связывания ACVR1 с очищенными моноклональными анти-ACVR1 антителами определяли с помощью биосенсора поверхностного плазмонного резонанса в реальном времени (SPR-Biacore), Biacore 4000. Все исследования связывания выполняли в рабочем буфере 10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, 3 мМ ЭДТА и 0,05% об./об. поверхностно-активного вещества Твин-20, pH 7,4 (HBS-ET) при 25°C и 37°C. Поверхность сенсора Biacore CM5 сначала дериватизировали путем связывания амина с моноклональным мышинным антителом к человеческому Fc (GE, # BR-1008-39 или REGN2567) для захвата моноклональных анти-ACVR1 антител. Различные концентрации реагентов ACVR1, внеклеточный домен человеческого ACVR1, экспрессированный с С-концевой тус-тус-гексагистидиновой меткой (hACVR1-MMH; SEQ ID NO: 338), внеклеточный домен мышинового ACVR1, экспрессированный с С-концевой тус-тус-гексагистидиновой меткой (mACVR1-MMH; SEQ ID NO: 340), внеклеточный домен человеческого ACVR1, экспрессированный с С-концевой меткой Fc мышинового IgG2a (hACVR1-mFc; SEQ ID NO: 339), сначала получали в рабочем буфере HBS-ET (900 нМ - 3,7 нМ; серийное разбавление в 3 раза). Затем реагенты ACVR1 инъецировали на поверхность захваченного моноклонального анти-ACVR1 антитела к человеческому Fc в течение 2,5-3 минут со скоростью потока 30 мкл/мин, в то время как диссоциацию реагента ACVR1, связанного с моноклональным антителом, отслеживали в течение 10-15 минут в рабочем буфере HBS-ET. Константу скорости кинетической ассоциации (k_a) и константу скорости диссоциации (k_d) определяли путем подгонки сенсограмм в реальном времени к модели связывания 1:1 с помощью программного обеспечения для подгонки кривой Scrubber 2.0с. Константы равновесной диссоциации связывания (K_D) и период полураспада за счет диссоциации ($t^{1/2}$) вычисляли из кинетических констант скорости следующим образом:

$$K_D(M) = \frac{k_d}{k_a}, \text{ и } t^{1/2}(\text{мин}) = \frac{\ln(2)}{60 \cdot k_d}$$

Результаты

[00188] Параметры кинетики связывания различных реагентов ACVR1 с моноклональными анти-ACVR1 антителами по изобретению при 25°C и 37°C показаны в таблицах с 4 по 9.

Таблица 4: Параметры кинетики связывания hACVR1-ММН, связывающегося с моноклональными анти-ACVR1 антителами при 25°C

mAb захваченное	уровень захвата mAb (RU)	900 нМ или 100 нМ Ag, связанный (RU)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (М)	t_{1/2} (мин)
mAb29257	350 ± 4.6	47	6.18E+04	5.21E-04	8.43E-09	22
mAb27396	349 ± 4.5	23	2.56E+05	7.45E-02	2.91E-07	0.16
mAb29226	344 ± 3.4	57	1.13E+05	9.37E-04	8.27E-09	12
MAB27405	366 ± 2.2	37	6.99E+04	1.47E-03	2.10E-08	8
H4H27247	349 ± 2.8	52	1.15E+05	1.19E-03	1.04E-08	10
mAb27404	366 ± 1.1	46	9.92E+04	4.46E-04	4.49E-09	26
mAb27242	363 ± 1.9	63	8.68E+04	1.35E-04	1.56E-09	86
mAb27243	353 ± 2.8	51	5.41E+04	1.60E-04	2.96E-09	72
mAb27245	364 ± 3	35	2.58E+04	2.07E-04	8.01E-09	56
mAb27241	346 ± 2	34	1.89E+04	1.23E-04	6.52E-09	94
mAb29266	351 ± 3	44	6.21E+04	6.79E-03	1.09E-07	1.7
mAb27400	352 ± 3.4	2	NB*	NB*	NB*	NB*
mAb22125	687 ± 2.1	44	4.13E+05	4.20E-01	1.02E-06	0.03
mAb22124	641 ± 1.8	21	6.61E+05	1.30E+00	1.97E-06	0.01
mAb22168	646 ± 0.9	36	7.98E+05	8.43E-01	1.06E-06	0.01
mAb29233	370 ± 1.1	1	NB*	NB*	NB*	NB*
mAb29237	305 ± 3.2	0	NB*	NB*	NB*	NB*
mAb29256	332 ± 2.3	-2	NB*	NB*	NB*	NB*
mAb29261	332 ± 3.6	0	NB*	NB*	NB*	NB*
mAb22115	630 ± 1.5	93	3.34E+04	4.85E-03	1.45E-07	2.4
mAb изотипическо го контроля	637 ± 0.5	1	NB*	NB*	NB*	NB*

*NB указывает на то, что в текущих экспериментальных условиях связывание не наблюдалось.

Таблица 5: Параметры кинетики связывания hACVR1-ММН, связывающегося с моноклональными анти-ACVR1 антителами при 37°C

mAb захваченное	уровень захвата mAb (RU)	900 нМ или 100 нМ Ag, связанный (RU)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (М)	t_{1/2} (мин)
mAb29257	431 ± 1.5	64	1.53E+05	3.26E-03	2.14E-08	3.5
mAb27396	451 ± 4.6	22	4.96E+05	1.80E-01	3.62E-07	0.06
mAb29226	397 ± 1.8	68	1.82E+05	4.56E-03	2.50E-08	2.5
mAb27405	440 ± 1.3	52	1.19E+05	5.28E-03	4.44E-08	2.2
mAb27247	404 ± 2.4	67	2.09E+05	4.04E-03	1.93E-08	2.9
mAb27404	453 ± 4	67	2.40E+05	1.83E-03	7.63E-09	6
mAb27242	441 ± 1.1	82	1.44E+05	8.30E-04	5.77E-09	14
mAb27243	412 ± 1.8	71	1.23E+05	1.16E-03	9.41E-09	10
mAb27245	448 ± 2.2	66	5.39E+04	1.73E-03	3.22E-08	7
mAb27241	430 ± 0.9	66	4.32E+04	8.52E-04	1.97E-08	14
mAb29266	418 ± 3.8	38	1.56E+05	2.99E-02	1.91E-07	0.39
mAb27400	430 ± 2.9	15	9.71E+03	4.76E-04	4.90E-08	24
mAb22125	892 ± 3.1	25	IC [#]	IC [#]	IC [#]	IC [#]
mAb22124	831 ± 1.3	14	IC [#]	IC [#]	IC [#]	IC [#]
mAb22168P	842 ± 0.8	27	IC [#]	IC [#]	IC [#]	IC [#]
mAb29233	453 ± 7.4	3	NB*	NB*	NB*	NB*
mAb29237	330 ± 23	1	NB*	NB*	NB*	NB*
mAb29256	371 ± 5.1	0	NB*	NB*	NB*	NB*
mAb29261	405 ± 3.9	5	NB*	NB*	NB*	NB*
mAb22115	835 ± 1.9	86	7.04E+04	3.08E-02	4.38E-07	0.37
mAb изотипического контроля	879 ± 1.3	0	NB*	NB*	NB*	NB*

*NB указывает на то, что в текущих экспериментальных условиях связывание не наблюдалось.

#IC указывает на то, что данные по связыванию являются неоднозначными.

Таблица 6: Параметры кинетики связывания hACVR1-mFc, связывающегося с моноклональными анти-ACVR1 антителами при 25°C

mAb захваченное	уровень захвата mAb (RU)	100 нМ Ag, связанный (RU)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (М)	t_{1/2} (мин)
mAb29257	350 ± 2	157	1.29E+05	1.21E-04	9.36E-10	95
mAb27396	351 ± 1.7	170	3.24E+05	4.93E-04	1.52E-09	23

mAb29226	341 ± 0.9	188	2.10E+05	1.61E-04	7.67E-10	72
mAb27405	363 ± 1.9	142	1.06E+05	2.01E-04	1.90E-09	57
mAb27247	346 ± 0.7	186	2.29E+05	1.80E-04	7.87E-10	64
mAb27404	363 ± 1.1	160	1.98E+05	8.76E-05	4.44E-10	132
mAb27242	362 ± 1.5	199	1.44E+05	2.90E-05	2.02E-10	398
mAb27243	349 ± 4.7	170	1.13E+05	3.63E-05	3.18E-10	318
mAb27245	362 ± 2	145	3.81E+04	5.06E-05	1.34E-09	228
mAb27241	345 ± 2.1	135	3.49E+04	3.20E-05	9.18E-10	361
mAb29266	353 ± 1.7	178	1.14E+05	6.20E-04	5.43E-09	19
mAb27400	348 ± 1.4	24	1.19E+04	1.42E-04	1.19E-08	81
mAb22125	685 ± 3.2	268	6.52E+05	8.02E-03	1.23E-08	1.4
mAb22124	637 ± 1.2	172	7.39E+05	4.09E-02	5.54E-08	0.28
mAb22168	645 ± 0.7	264	8.37E+05	9.28E-03	1.11E-08	1.2
mAb29233	368 ± 0.6	2	NB*	NB*	NB*	NB*
mAb29237	279 ± 2.9	-2	NB*	NB*	NB*	NB*
mAb29256	315 ± 1.9	-1	NB*	NB*	NB*	NB*
mAb29261	334 ± 2.4	0	NB*	NB*	NB*	NB*
mAb22115	629 ± 1.1	264	6.69E+04	7.65E-04	1.14E-08	15
mAb изотипического контроля	638 ± 0.9	-2	NB*	NB*	NB*	NB*

*NB указывает на то, что в текущих экспериментальных условиях связывание не наблюдалось.

Таблица 7: Параметры кинетики связывания hACVR1-mFc, связывающегося с моноклональными анти-ACVR1 антителами при 37°C

mAb захваченное	уровень захвата mAb (RU)	100 нМ Ag, связанный (RU)	k _a (1/Мс)	k _d (1/с)	K _D (М)	t _{1/2} (мин)
mAb29257	425 ± 1.9	201	3.14E+05	4.95E-04	1.58E-09	23
mAb27396	448 ± 3.5	197	4.54E+05	1.96E-03	4.31E-09	6
mAb29226	387 ± 1.5	212	3.40E+05	5.21E-04	1.53E-09	22
mAb27405	434 ± 1.9	185	2.33E+05	7.42E-04	3.18E-09	16
mAb27247	393 ± 2.3	219	3.71E+05	5.15E-04	1.39E-09	22
mAb27404	449 ± 1.2	216	3.03E+05	3.38E-04	1.11E-09	34
mAb27242	437 ± 1	250	2.82E+05	1.89E-04	6.69E-10	61
mAb27243	409 ± 1.3	228	2.36E+05	2.59E-04	1.10E-09	45
mAb27245	444 ± 2	222	9.17E+04	3.35E-04	3.65E-09	34
mAb27241	426 ± 1.7	216	8.22E+04	2.01E-04	2.44E-09	57

mAb29266	411 ± 2.8	205	2.35E+05	9.11E-04	3.88E-09	13
mAb27400	418 ± 2.5	68	1.27E+04	1.63E-04	1.28E-08	71
mAb22125	885 ± 2.4	243	7.29E+05	5.77E-02	7.92E-08	0.20
mAb22124	825 ± 2.7	158	8.23E+05	1.19E-01	1.45E-07	0.10
mAb22168	838 ± 0.8	278	8.12E+05	4.58E-02	5.64E-08	0.25
mAb29233	445 ± 1	3	NB*	NB*	NB*	NB*
mAb29237	263 ± 6	5	NB*	NB*	NB*	NB*
mAb29256	350 ± 2.6	3	NB*	NB*	NB*	NB*
mAb29261	394 ± 5.4	11	IC #	IC #	IC #	IC #
mAb22115	830 ± 1.5	317	8.33E+04	2.50E-03	3.01E-08	4.6
mAb изотипического контроля	875 ± 1.1	-1	NB*	NB*	NB*	NB*

*NB указывает на то, что в текущих экспериментальных условиях связывание не наблюдалось.

#IC указывает на то, что данные по связыванию являются неоднозначными.

Таблица 8: Параметры кинетики связывания mACVR1-mmh, связывающегося с моноклональными анти-ACVR1 антителами при 25°C

mAb захваченное	уровень захвата mAb (RU)	900 нМ или 100 нМ Ag, связанный (RU)	k _a (1/Mc)	k _d (1/c)	K _D (M)	t½ (мин)
mAb29257	353 ± 1.3	-2	NB*	NB*	NB*	NB*
mAb27396	353 ± 1.4	1	NB*	NB*	NB*	NB*
mAb29226	342 ± 0.5	2	NB*	NB*	NB*	NB*
mAb27405	364 ± 1.2	0	NB*	NB*	NB*	NB*
mAb27247	347 ± 0.8	3	NB*	NB*	NB*	NB*
mAb27404	364 ± 1.1	1	NB*	NB*	NB*	NB*
mAb27242	362 ± 1.8	6	2.38E+05	1.44E-	6.02E-	0.08
mAb27243	349 ± 2	6	1.48E+05	1.31E-	8.83E-	0.09
mAb27245	363 ± 1	1	NB*	NB*	NB*	NB*
mAb27241	347 ± 0.8	1	NB*	NB*	NB*	NB*
mAb29266	353 ± 1.4	5	IC #	IC #	IC #	IC #
mAb27400	349 ± 1.4	-3	NB*	NB*	NB*	NB*
mAb22125	686 ± 2.8	41	6.88E+05	5.75E-	8.36E-	0.02
mAb22124	640 ± 1	18	7.08E+05	1.50E+	2.13E-	0.01
mAb22168	647 ± 0.3	33	1.25E+06	1.08E+	8.65E-	0.01
mAb29233	369 ± 0.7	1	NB*	NB*	NB*	NB*
mAb29237	292 ± 5.1	-3	NB*	NB*	NB*	NB*

mAb29256	323 ± 3.3	-3	NB*	NB*	NB*	NB*
mAb29261	338 ± 1.4	-1	NB*	NB*	NB*	NB*
mAb22115	629 ± 1.2	94	2.80E+04	4.78E-	1.71E-	2.4
mAb изотипического контроля	638 ± 0.4	-2	NB*	NB*	NB*	NB*

*NB указывает на то, что в текущих экспериментальных условиях связывание не наблюдалось.

#IC указывает на то, что данные по связыванию являются неоднозначными.

Таблица 9: Параметры кинетики связывания mACVR1-mmh, связывающегося с моноклональными анти-ACVR1 антителами при 37°C

mAb захваченное	уровень захвата mAb (RU)	900 нМ или 100 нМ Ag, связанный (RU)	k _a (1/Мс)	k _d (1/с)	K _D (М)	t _{1/2} (мин)
mAb29257	430 ± 3	2	NB*	NB*	NB*	NB*
mAb27396	451 ± 4.4	4	NB*	NB*	NB*	NB*
mAb29226	392 ± 1.9	2	NB*	NB*	NB*	NB*
mAb27405	438 ± 1.1	2	NB*	NB*	NB*	NB*
mAb27247	398 ± 1.4	4	NB*	NB*	NB*	NB*
mAb27404	452 ± 1.9	4	NB*	NB*	NB*	NB*
mAb27242	439 ± 1.2	4	NB*	NB*	NB*	NB*
mAb27243	410 ± 1.8	5	IC #	IC #	IC #	IC #
mAb27245	446 ± 2.6	2	NB*	NB*	NB*	NB*
mAb27241	428 ± 1.1	2	NB*	NB*	NB*	NB*
mAb29266	407 ± 17.4	5	NB*	NB*	NB*	NB*
mAb27400	423 ± 3	2	NB*	NB*	NB*	NB*
mAb22125	887 ± 1.6	23	IC #	IC #	IC #	IC #
mAb22124	828 ± 1.1	14	IC #	IC #	IC #	IC #
mAb22168	840 ± 0.8	23	IC #	IC #	IC #	IC #
mAb29233	447 ± 1.1	1	NB*	NB*	NB*	NB*
mAb29237	287 ± 9	-1	NB*	NB*	NB*	NB*
mAb29256	358 ± 3.4	0	NB*	NB*	NB*	NB*
mAb29261	399 ± 5	2	NB*	NB*	NB*	NB*
mAb22115	834 ± 1.4	85	5.89E+	2.97E-	5.04E-	0.39
mAb изотипического контроля	877 ± 1.8	0	NB*	NB*	NB*	NB*

*NB указывает на то, что в текущих экспериментальных условиях связывание не наблюдалось.

#IC указывает на то, что данные по связыванию являются неоднозначными.

[00189] При 25°C моноклональные анти-ACVR1 антитела, которые связывались с hACVR1-ММН, имели значения K_D в диапазоне от 1,56 нМ до 1,97 мкМ, как показано в Таблице 4. При 37°C моноклональные анти-ACVR1 антитела, которые связывались с hACVR1-ММН, имели значения K_D в диапазоне от 5,77 нМ до 438 нМ, как показано в таблице 5.

[00190] При 25°C моноклональные анти-ACVR1 антитела, которые связывались с hACVR1-mFc, имели значения K_D в диапазоне от 0,20 нМ до 55,4 нМ, как показано в Таблице 6. При 37°C моноклональные анти-ACVR1 антитела, которые связывались с hACVR1-mFc, имели значения K_D в диапазоне от 0,67 нМ до 145 нМ, как показано в таблице 7.

[00191] При 25°C моноклональные анти-ACVR1 антитела, которые связывались с mACVR1-ММН, имели значения K_D в диапазоне от 171 нМ до 2,13 мкМ, как показано в Таблице 8. При 37°C только одно моноклональное анти-ACVR1 антитело связывалось с mACVR1-ММН со значением K_D , равным 504 нМ, как показано в таблице 9.

Пример 4: Перекрестная конкуренция между различными моноклональными анти-ACVR1 антителами

Экспериментальная процедура

[00192] Конкуренцию за связывание в группе моноклональных анти-ACVR1 антител определяли в анализе методом биослойной интерферометрии без метки в режиме реального времени на биосенсорной платформе Octet HTX (Pall ForteBio Corp.). Весь эксперимент проводили при 25°C в буфере 10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, 3 мМ ЭДТА и 0,05% об./об. поверхностно-активного вещества Твин-20, 1 мг/мл BSA, pH 7,4 (HBS-EBT) при встряхивании планшета со скоростью 1000 об/мин. Для оценки, способны ли два антитела конкурировать друг с другом за связывание с соответствующими им эпитопами, внеклеточный домен человеческого ACVR1, экспрессированный с С-концевой мус-мус-гексагистиридиновой меткой (hACVR1-ММН; SEQ ID NO: 338), сначала захватывали путем погружения на 40 секунд наконечников биосенсора Octet, покрытых анти-His-антителом (ForteBio Inc, № 18-5079), в лунки, содержащие 10 мкг/мл hACVR1-ММН. Затем наконечники биосенсора с захваченным антигеном насыщали первым моноклональным анти-ACVR1 антителом (обозначенным как mAb-1) путем погружения в лунки, содержащие 50 мкг/мл раствора mAb-1, на 4 минуты. Затем наконечники биосенсора погружали в лунки, содержащие 50 мкг/мл раствора второго моноклонального анти-ACVR1 антитела (обозначенного как mAb-2), на 3 минуты. Перед каждым этапом эксперимента наконечники биосенсоров промывали буфером HBS-EBT. Реакцию связывания в реальном времени отслеживали на протяжении всего эксперимента, и реакцию связывания в конце каждого этапа регистрировали. Сравнивали реакцию связывания mAb-2 с hACVR1-ММН в комплексе с mAb-1 и определяли

конкурентное/неконкурентное поведение различных моноклональных анти-ACVR1 антител, как показано в таблице 10.

Результаты

Таблица 10. Перекрестная конкуренция между моноклональными анти-ACVR1 антителами

mAb-1	mAb-2, конкурирующее с mAb-1
mAb29257	mAb27396
	mAb27242
	mAb27243
	mAb27241
	mAb27245
	mAb27247
	mAb27404
	mAb27405
mAb27396	mAb29257
	mAb27242
	mAb27243
	mAb27241
	mAb27245
	mAb27247
	mAb27404
	mAb27405
mAb27242	mAb29257
	mAb27396
	mAb27243
	mAb27241

	mAb27245
	mAb27247
	mAb27404
	mAb27405
mAb27243	mAb29257
	mAb27396
	mAb27242
	mAb27241
	mAb27245
	mAb27247
	mAb27404
	mAb27405
mAb27241	mAb29257
	mAb27396
	mAb27242
	mAb27243
	mAb27245
	mAb27247
	mAb27404
	mAb27405
mAb27245	mAb29257
	mAb27396
	mAb27242

	mAb27243
	mAb27241
	mAb27247
	mAb27404
	mAb27405
mAb27247	mAb29257
	mAb27396
	mAb27242
	mAb27243
	mAb27241
	mAb27245
	mAb27404
	mAb27405
mAb27404	mAb29257
	mAb27396
	mAb27242
	mAb27243
	mAb27241
	mAb27245
	mAb27247
	mAb27405
mAb27405	mAb29257
	mAb27396

	mAb27242
	mAb27243
	mAb27241
	mAb27245
	mAb27247
	mAb27404

[00193] В Таблице 10 показана перекрестная конкуренция между выбранными анти-ACVR1 антителами.

Пример 5: Связывание клеток с клетками HEK293/hACVR1-wt и HEK293/hACVR1-R206H методом проточной цитометрии

[00194] Для оценки связывания клеток анти-hACVR1 с антителами создавали две клеточные линии для стабильной сверхэкспрессии полноразмерного hACVR1 в клетках HEK293 вместе с BMP-ответным элементом, слитым с репортером люциферазы светлячка (BRE-Luc). Одна клеточная линия содержала версию hACVR1 дикого типа (аминокислоты 1-509 регистрационного номера Q04771) и была названа HEK293/BRE-luc/hACVR1-дикий тип. Далее она упоминается как HEK293/hACVR1-wt. Другая линия содержала hACVR1(R206H). Был выделен единственный клон этой клеточной линии, и полученная клеточная линия была названа HEK293/BRE-luc/hACVR1-R206H-клон H2. Далее он упоминается как HEK293/hACVR1-R206H.

[00195] Для оценки связывания анти-ACVR1 антител по изобретению с рецептором, экспрессированным на клеточной поверхности, либо 66,6 нМ, либо 70 нМ антител инкубировали с $0,5 \times 10^6$ клеток/лунку при 4°C в течение 30 минут в PBS (без кальция и магния), содержащем 2% FBS. После инкубации с первичными антителами клетки окрашивали 3,2 мкг/мл конъюгированного вторичного антитела Alexa Fluor®-647 (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., античеловеческие № 109-607-003) при 4°C в течение 25 или 30 минут. Клетки фиксировали с помощью BD CytoFix™ (Becton Dickinson, № 554655) и анализировали на проточных цитометрах Hypercyt® или IQue® (Intellicyt®). Неокрашенные контроли и контроли только вторичных антител также тестировали для всех клеточных линий. Результаты анализировали с помощью программного обеспечения ForeCyt® (IntelliCyt®) для определения среднего геометрического значения флуоресценции жизнеспособных клеток, и коэффициенты связывания рассчитывали путем нормализации среднего геометрического значения, полученного в тестируемых условиях, по среднему геометрическому значению соответствующих неокрашенных клеток.

Таблица 11: Связывание анти-hACVR1 антител с клетками HEK293/BRE-luc/hACVR1

PID mAb	Значение MFI - нормализованное относительно неокрашенного контроля				
	66.6 нМ антитело			70 нМ антитело	
	родительски е HEK293	HEK293/ hACVR1-wt	HEK293/ hACVR1- R206H	родительски е HEK293	HEK293/ hACVR1- R206H
mAb22115	6	4	4	Не тестировали	Не тестировал
mAb22124	2	41	116	Не тестировали	Не тестировал
mAb22125	1	183	235	Не тестировали	Не тестировал
mAb22168	1	116	213	Не тестировали	Не тестировал
mAb29226	Не тестировали	Не тестировал	Не тестировал	23	1900
mAb29233	Не тестировали	Не тестировал	Не тестировал	3	5
mAb29237	Не тестировали	Не тестировал	Не тестировал	9	10
mAb29256P	Не тестировали	Не тестировал	Не тестировал	3	3
mAb29257	Не тестировали	Не тестировал	Не тестировал	26	1662
mAb29261	Не тестировали	Не тестировал	Не тестировал	2	2
mAb29266	Не тестировали	Не тестировал	Не тестировал	13	1642
mAb27396	Не тестировали	Не тестировал	Не тестировал	2	954
mAb27241	Не тестировали	Не тестировал	Не тестировал	19	1165
mAb27242	Не тестировали	Не тестировал	Не тестировал	23	1734
mAb27243	Не тестировали	Не тестировал	Не тестировал	18	1570
mAb27245	Не тестировали	Не тестировал	Не тестировал	21	1662
mAb27247	Не тестировали	Не тестировал	Не тестировал	7	1659

mAb27404	He тестировали	He тестировал	He тестировал	18	1872
mAb27405	He тестировали	He тестировал	He тестировал	11	1563
mAb27400	He тестировали	He тестировал	He тестировал	7	840
Изотипический контроль hIgG4	1	3	1	1	3
Только античеловеческо	1	1	1	1	1

[00196] Как показано в Таблице 11, четыре из 20 анти-hACVR1 антител по изобретению продемонстрировали 4-183-кратное увеличение связывания с клетками HEK293/hACVR1-wt. Все двадцать анти-hACVR1 антител по изобретению тестировали на их способность связываться с клетками HEK293/hACVR1-R206H, и они показали 2-1900-кратное увеличение связывания с клетками. Анти-hACVR1 антитела по изобретению продемонстрировали 1-26-кратное увеличение связывания с родительскими клетками HEK293. Образцы контрольных изотипических антител и вторичных антител по отдельности продемонстрировали 1-3-кратное увеличение связывания.

Пример 6: Функциональное ингибирование ACVR1 в клеточном биоанализе, в котором использовали клетки HEK293/BRE-luc/hACVR1-R206H-клон H2, активированные hBMP7 или hActivin A

[00197] Рецептор активина A типа I, ACVR1 (также известный как ActRI, ACVR1A или Alk2), представляет собой однопроходный трансмембранный рецептор и является членом рецепторов BMP типа I суперсемейства рецепторов TGF- β . При связывании лиганда ACVR1 вместе с рецептором типа II инициирует нисходящий сигнальный каскад, ведущий к активации специфического для рецептора белка R-SMAD (SMAD1, SMAD5 или SMAD8), с участием SMAD, SMAD4, а также приводит к регуляции транскрипции генов (Massagué J., TGF-beta Signal Transduction, Annu Rev. Biochem., 1998. 67:753-91, PMID: 9759503; Massagué et al., Smad transcription factors, Genes Dev. 2005 19: 2783-2810, PMID: 16322555). Чтобы оценить ингибирование ACVR1(R206H) мутацию, обнаруженную в FOP (Shore et al., Nat Genet. 2006 May; 38(5):525-7. Epub 2006 Apr 23. PMID: 16642017), анти-ACVR1 антителом выполняли биоанализ в клетках HEK293 (эмбриональной почки человека, ATCC). Клетки HEK293 эндогенно экспрессируют ACVR1, необходимые рецепторы типа II, белки SMAD и другие компоненты, формирующие функциональный сигнальный путь BMP. Для запуска передачи сигналов через ACVR1, создавали клеточную линию, которая стабильно сверхэкспрессирует полноразмерный человеческий ACVR1 (аминокислоты 1-509, R206H, номер доступа Q04771) вместе с BMP-ответным элементом, слитым с репортером люциферазы светлячка (BRE-Luc). Выделяли один клон клеточной линии, и полученная клеточная линия была названа HEK293/BRE-luc/hACVR1-R206H-клон H2. Далее она упоминается как

HEK293/BRE-luc/hACVR1-R206H.

[00198] Для биоанализа клетки HEK293/BRE-luc/hACVR1-R206H высевали по 10000 клеток/лунку в 96-луночный планшет в буфере для анализа (DMEM High Glucose+10% FBS+Pen/Strep/L-глутамин) и инкубировали в течение 5 часов при 37°C в 5% CO₂. После 5-часовой инкубации к клеткам добавляли анти-ACVR1 антитела или антитело изотипического контроля, которые серийно разбавляли в буфере для анализа либо от 300 нМ до 73,2 пМ, либо от 173,3 нМ до 42,3 пМ (плюс образец, содержащий только буфер без тестируемой молекулы) и инкубировали при 25°C в течение 30 минут. Через 30 минут к клеткам добавляли 3 нМ человеческого активина А (hActivin A, R&D System 338-AC), 2 нМ человеческого костного морфогенетического белка 7 (hBMP7, R&D System 354-BP/C) или 3 нМ hBMP7. Для получения дозозависимой активации лигандами hActivin A или hBMP7 серийно разбавляли либо от 200 нМ до 3,4 пМ, либо от 100 нМ до 1,7 пМ в буфере для анализа (плюс образец, содержащий только буфер без тестируемой молекулы) и добавляли к клеткам, не обработанным антителами. После инкубации в течение ночи при 37°C в 5% CO₂ активность люциферазы измеряли с помощью реагента OneGloTM (Promega, #E6031) и планшетных ридеров VictorX или Envision (Perkin Elmer). Результаты анализировали, используя нелинейную регрессию (4-параметрическая логистическая кривая) с помощью программного обеспечения Prism (GraphPad) для получения значений EC₅₀ и IC₅₀. Процент ингибирования вычисляли по значениям RLU с помощью следующего уравнения:

$$\% \text{ Inhibition} = 100 \times \frac{RLU_{Baseline} - RLU_{Inhibition}}{RLU_{Baseline} - RLU_{Background}}$$

[00199] В этом уравнении «RLU_{Baseline}» представляет собой значение люминесценции клеток, обработанных постоянным количеством лиганда (hActivin A или hBMP7) без антител, «RLU_{Inhibition}» представляет собой значение люминесценции при максимальной концентрации конкретного антитела с конкретной концентрацией лиганда, и «RLU_{Background}» представляет собой значение люминесценции клеток без каких-либо лигандов или антител.

[00199] Двадцать антител к человеческому ACVR1 по изобретению тестировали на их способность ингибировать активацию клеток HEK293/BRE-luc/hACVR1-R206H. Результаты представлены в таблице 12.

Таблица 12: Ингибирование анти-hACVR1 антител в присутствии лигандов hACVR1 в клетках HEK293/BRE-luc/hACVR1-R206H

Лиганд	hActivin A		hBMP7			
EC ₅₀ [M]	3.33E-10		2.97E-10		1.22E-09	
Постоянная концентрация лиганда	3 нМ hActivin A		3 нМ hBMP7		2 нМ hBMP7	
mAb PID	IC ₅₀ [M]	% ингибирования	IC ₅₀ [M]	% ингибирования	IC ₅₀ [M]	% ингибирования
mAb22115	Нет	Нет	Нет	Нет	Не	Не

	ингиби- рования	ингиби- рования	ингиби- рования	ингиби- рования	тестиров.	тестиров.
mAb22124	1.8E-08	51	>1.0E-07	46	Не тестиров.	Не тестиров.
mAb22125	1.9E-08	78	1.6E-08	51	Не тестиров.	Не тестиров.
mAb22168	2.3E-08	75	>1.0E-07	52	Не тестиров.	Не тестиров.
mAb29226	Не тестиров.	Не тестиров.	Не тестиров.	Не тестиров.	7.3E-10	70
mAb29233	Не тестиров.	Не тестиров.	Не тестиров.	Не тестиров.	Нет ингиби- рования	Нет ингиби- рования
mAb29237	Не тестиров.	Не тестиров.	Не тестиров.	Не тестиров.	Нет ингиби- рования	Нет ингиби- рования
mAb29256	Не тестиров.	Не тестиров.	Не тестиров.	Не тестиров.	Нет ингиби- рования	Нет ингиби- рования
mAb29257	Не тестиров.	Не тестиров.	Не тестиров.	Не тестиров.	1.4E-10	62
mAb29261	Не тестиров.	Не тестиров.	Не тестиров.	Не тестиров.	Нет ингиби- рования	Нет ингиби- рования
mAb29266	Не тестиров.	Не тестиров.	Не тестиров.	Не тестиров.	1.9E-09	93
mAb27396	Не тестиров.	Не тестиров.	Не тестиров.	Не тестиров.	5.8E-10	90
mAb27241	Не тестиров.	Не тестиров.	Не тестиров.	Не тестиров.	1.8E-09	110
mAb27242	Не тестиров.	Не тестиров.	Не тестиров.	Не тестиров.	1.2E-09	109
mAb27243	Не тестиров.	Не тестиров.	Не тестиров.	Не тестиров.	1.3E-09	112
mAb27245	Не тестиров.	Не тестиров.	Не тестиров.	Не тестиров.	1.5E-09	110
mAb27247	Не тестиров.	Не тестиров.	Не тестиров.	Не тестиров.	7.6E-10	111
mAb27404	Не тестиров.	Не тестиров.	Не тестиров.	Не тестиров.	8.8E-10	109
mAb27405	Не тестиров.	Не тестиров.	Не тестиров.	Не тестиров.	7.6E-10	107
mAb27400	Не тестиров.	Не тестиров.	Не тестиров.	Не тестиров.	2.0E-09	96
hIgG4 изотип (REGN1945)	Нет ингиби- рования	Нет ингиби- рования	Нет ингиби- рования	Нет ингиби- рования	Нет ингиби- рования	Нет ингиби- рования

[00200] Как показано в таблице 12, десять антител по изобретению продемонстрировали по меньшей мере 90% ингибирование 2 нМ hBMP7, при этом значения IC₅₀ для ингибирующих антител находились в диапазоне от 580 пМ до 2,0 нМ.

Пять антител по изобретению показали ингибирование от 46% до 78% либо 3 нМ hActivin A, либо 2 нМ или 3 нМ hBMP7, при этом значения IC_{50} для ингибирующих антител находились в диапазоне от 140 пМ до >100 нМ. Пять антител по изобретению не продемонстрировали ингибирование ни одного из протестированных лигандов. Антитело изотипического контроля не продемонстрировало какого-либо измеримого ингибирования клеток HEK293/BRE-luc/hACVR1-R206H, активированных либо hActivin A, либо hBMP7. Лиганды активировали клетки HEK293/BRE-luc/hACVR1-R206H со значениями EC_{50} 297 пМ или 1,22 нМ для hBMP7 и 333 пМ для hActivin A.

Пример 7: Тестирование анти-ACVR1 антитела *in vivo*; анализ сыворотки мышей Acvr1hu/hu на уровне гепсидина и железа

[00201] Уровни гепсидина и железа тестировали у мышей Acvr1hu/hu после обработки анти-ACVR1 антителами mAb27242; mAb27243; mAb27247; и антителом изотипического контроля hIgG4 (REGN1945).

[00202] BMP6-опосредованная активация ACVR1 напрямую активирует транскрипцию *Hamp*, гена, который кодирует гепсидин. Гепсидин является негативным регулятором уровня железа, вызывая интернализацию ферропортина (*slc40a1*), единственного известного экспортера железа. Ингибирование сигнального каскада BMP6-ACVR1 приводит к снижению транскрипции *Hamp*, что приводит к снижению уровня циркулирующего гепсидина. Снижение циркулирующего гепсидина приводит к повышению уровня ферропортина, что позволяет увеличить поглощение железа из тонкого кишечника, тем самым повышая уровень циркулирующего железа.

[00203] Таким образом, для определения эффектов анти-ACVR1 антител по изобретению на сывороточный гепсидин и железо выполняли эксперимент *in vivo* на мышах. Для эксперимента использовали мышей, экспрессирующих человеческий ACVR1 вместо мышиного аллеля (называемых мышами Acvr1hu/hu). Сорока двум самкам мышей Acvr1hu/hu (в возрасте 12-15 недель) вводили 10 мг/кг либо изотипического контроля, либо mAb27242, mAb27243, либо mAb27247 в дни 1 и 5 эксперимента. Мышей умерщвляли для сбора сыворотки в день 8. Сыворотку анализировали на уровне белка гепсидин с помощью набора Hepcidin-Murine Complete ELISA (Intrinsic Lifesciences, кат. № HMC-001) и на уровне железа с помощью набора для анализа железа QuantiChrom (BioAssay Systems, кат. № DIFE-250). Результаты представлены в таблице 13.

Таблица 13. Уровни гепсидина и железа в сыворотке мышей Acvr1hu/hu

Тестируемое антитело	Уровень гепсидина в сыворотке		Уровень железа в сыворотке	
	Среднее значение	Стандартное отклонение	Среднее значение	Стандартное отклонение
Изотипический контроль	288.3	71.92	206.6	64.74
mAb27242	140.0	78.86	462.1	70.77
mAb27243	123.7	34.58	513.1	140.0

mAb27247	220.1	58.66	332.1	159.7
----------	-------	-------	-------	-------

[00204] Как показано в Таблице 13, анти-ACVR1 антитела по изобретению, mAb27242 и mAb27243, снижали уровень гепсидина в сыворотке и повышали уровни железа в сыворотке у мышей *Acvr1^{hu/hu}*, тогда как mAb27247 не оказывало никакого влияния на уровни гепсидина в сыворотке или уровни железа в сыворотке у мышей *Acvr1^{hu/hu}*. Это указывает на то, что mAb27242 и mAb27243 могут ингибировать передачу сигналов ACVR1 дикого типа.

Пример 8: Тестирование анти-ACVR1 антитела *in vivo*; модель посттравматической гетеротопической оссификации

[00205] В настоящем исследовании оценивали эффекты анти-ACVR1 антитела по изобретению, mAb27242, и антитела к активину А в модели посттравматической НО *in vivo* у мышей.

[00206] Гетеротопическая оссификация (НО), образование эктопической кости в мягких тканях, встречается в двух основных формах: посттравматическая НО (tНО), обычно обнаруживаемая у пациентов, перенесших скелетно-мышечную или нейрогенную травму, и генетически обусловленная прогрессирующая оссифицирующая фибродисплазия (FOP), возникающая в результате точечной мутации, известной как R206H в рецепторе ACVR1. Оба заболевания подвергаются процессу эндохондральной оссификации с образованием эктопической кости.

[00207] Принципиальным лечением НО остается хирургическое иссечение, которое часто осложняется рецидивом, почти всегда при FOP. Хотя было продемонстрировано, что как посттравматические, так и FOP-варианты НО отражают aberrантность воспаления, которое запускает эндохондральную оссификацию, согласно существующей литературе, предшествующие сигналы для этого конвергентного программирования, судя по всему, являются разными. В обоих вариантах патология, по-видимому, зависит от передачи сигналов от определенного подмножества рецепторов, чувствительных к лигандам суперсемейства трансформирующего фактора роста бета (TGFβ), включающего *Alk2/ACVR1*, *Alk3/BMPR1A*, *Alk4/ACVR1B*, *Alk5/TGFBRI*, *Alk6/BMPR1B* и *Alk7/ACVR1C*.

[00208] Активин А обнаружен в фибробластах FOP. Секвестрация активина А в проверенных моделях FOP на мышцах продемонстрировала практически полную ликвидацию последующих поражений. Повреждение мышц в мышечной модели FOP (*Acvr1*[R206H]) приводит к НО, которая может быть полностью подавлено с помощью антитела, блокирующего активин А (Hatsell et al. *Sci Transl Med.* 2 сентября 2015 г.; 7(303):303ra137). Также было продемонстрировано эффективное ослабление НО, вызванное FOP, путем фармакологического ингибирования активина А с помощью нейтрализующего антитела к активину А REGN2477 (Upadhyay et al., 2017, *J Bone Mineral Res* 32(12):2489-2499).

[00209] Однако в недавней литературе было выявлено различие между tНО и FOP, а именно ген ACVR1, обеспечивающий общее усиление функции и новую активацию

активинном А в качестве основного инициатора, вызывающего поражения FOP.

[00210] В настоящем эксперименте оценивали эффект анти-ACVR1 антитела по изобретению и антитела к активину А в модели посттравматической НО *in vivo* у мышей. В частности, посттравматическую гетеротопическую оссификацию измеряли в анализе с помощью микроКТ у мышей после лечения анти-ACVR1 антителом mAb27242.

[00211] *Дозирование рекомбинантных белков и антител у мышей*

[00212] Использовали человеческое антитело Acvr1 (mAb27242 по настоящему изобретению и нейтрализующее антитело, полученное к человеческому активину А (патентная заявка США 20150037339). Также применяли ALK3-Fc при посттравматическом образовании НО для изучения потенциального ингибирующего эффекта в результате ингибирования нескольких остеогенных BMP. Alk3-Fc получали в лаборатории, используя клетки CHO, и очищали. Alk3-Fc состояло из внеклеточного домена Alk3 (Swiss Prot# P27037 Q24-R152), связанного с Fc-доменом человеческого IgG1 (D104-K330).

[[00213] Для исследования процесса лечения мышей разделяли таким образом, чтобы в группах соблюдалось возрастное соответствие, лечение начинали в тот же день, когда было вызвано повреждение. Мышам (n=15/группа) еженедельно подкожно (п/к) вводили 25 мг/кг антитела, блокирующего активин А, или антитела изотипического контроля. Для второго эксперимента мышам (n=12/группа) вводили подкожно 10 мг/кг блокирующего антитела Acvr1, Alk3-Fc или антитела изотипического контроля. Образование НО контролировали с помощью микроКТ *in vivo* в течение как минимум 13 недель.

[00214] *Модель травмы ожога/тенотомии*

[00215] Мыши, оцениваемые на наличие эктопической кости, были мышами дикого типа (WT) C57BL/6J (Jackson Laboratories). Вкратце, мышам дикого типа вводили тамоксифен в течение 5 дней по 40 мг/кг внутривентально, чтобы иницировать поражение согласно модели. Все мыши получали предоперационную анестезию, состоящую из 0,06 мг·кг⁻¹ бупренорфина в течение 48 часов, с последующей анестезией ингаляционным изофлураном и тщательным послеоперационным наблюдением с введением анальгетиков. Мыши получали неполный ожог, 30% общей площади поверхности тела, на выбритой спине с последующим рассечением левого ахиллова сухожилия. Ожог спины вызывали с помощью металлического блока, нагретого до 60°C на водяной бане и непрерывно прикладываемого к спине в течение 18 с. Закладку НО наблюдали на 3-й неделе, и образование зрелой кости визуализировали с помощью микроКТ через 9 недель.

[00216] *Результаты*

[00217] Антитела, блокирующие Acvr1, или Alk3-Fc ослабляли НО в посттравматической модели НО у мышей; однако ингибирование активина А не влияло на образование НО.

[00218] Мышам вводили либо изотипический контроль (n=12), либо анти-ACVR

антитела ($n=12$), либо Alk3-Fc ($n=12$), начиная одновременно с индукцией повреждения в модели tHO. На фиг. 1A-C показаны результаты микроКТ-анализа у мышей, которым вводили антитело изотипического контроля (кружки, $n=12$), ALK3-Fc (квадраты, $n=12$) или антитело Acvrl (треугольники, $n=12$) (mAb27242), начиная одновременно с индукцией повреждения. Общий объем HO (фиг. 1A), прикрепленной HO (фиг. 1B) и неприкрепленной HO (фиг. 1C) измеряли в анализе с помощью микроКТ через 3, 6, 9 и 13 недель после травмы.

[00219] У мышей дикого типа с индуцированным ожогом/тенотомическим повреждением ингибирование ACVR1 блокирующим антителом снижало образование HO на 40% ($3,92 \text{ мм}^3$ против $2,4 \text{ мм}^3$ общего HO на неделе 13), свидетельствующее о том, что по меньшей мере часть сигналов BMP, ответственных за образование и рост HO, передается через ACVR1 (фиг. 1A-C). Антитела, блокирующие Acvrl, в значительной степени ослабляли общую HO (фиг. 1A) и прикрепленную HO (фиг. 1B) по сравнению с изотипическим контролем через 9 недель после операции ($p<0,05$). Антитела, блокирующие Acvrl, в значительной степени ослабляли неприкрепленную HO (фиг. 1C) по сравнению с изотипическим контролем через 13 недель после операции ($p<0,01$).

[00220] У мышей дикого типа с индуцированным ожогом/тенотомическим повреждением ALK3-Fc снижало HO на 60% ($3,92 \text{ мм}^3$ против $1,63 \text{ мм}^3$ общей HO на 13-й неделе), но ингибировало не полностью, что согласуется с ранее опубликованными данными (Agarwal et al., Mol Ther., 2 августа 2017 г.; 25(8):1974-87) (рис. 1A). Alk3-Fc в значительной степени ослабляло общую HO (фиг. 1A) и прикрепленную HO (фиг. 1B) по сравнению с изотипическим контролем через 6 недель после операции ($p<0,05$). Alk3-Fc также в значительной степени ослабляло неприкрепленную HO (фиг. 1C) по сравнению с изотипическим контролем через 13 недель после операции ($p<0,0001$).

[00221] Изображения объема HO в поврежденной задней конечности у мышей WT, измеренного по объему общей HO, прикрепленной HO (обведены пунктирными белыми линиями) или неприкрепленной HO (обведены короткими пунктирными белыми линиями), показаны на фиг. 2A-C. Объемы HO, определенные с помощью микроКТ, в значительной степени уменьшились через 13 недель у мышей, получавших ALK3-Fc (фиг. 2B) и антитело Acvrl (фиг. 2C), по сравнению с изотипическим контролем (фиг. 2A). Объем общей HO и объем прикрепленной HO в значительной степени уменьшились через 6 или 9 недель после травмы в группах, получавших лечение антителами Alk3-Fc и Acvrl, соответственно.

[00222] Кроме того, мышам дикого типа вводили либо антитела к активину A ($n=15$), либо изотипический контроль ($n=15$), начиная одновременно с индукцией повреждения в модели ожога/тенотомического повреждения. Объем HO измеряли в анализе с помощью микроКТ через 9 недель после повреждения. Объем HO в поврежденной задней конечности, измеренный по объему общей HO, прикрепленной HO или неприкрепленной HO, не имел значимых отличий между группами лечения. Ингибирование активина A не уменьшало образования или роста HO. Дальнейшая

стратификация плавающей и ассоциированной с костью НО также не продемонстрировала различий между группой животных, получавшей активин А, и группой животных, получавшей носитель (данные не показаны).

[00223] Этот пример показывает, что антитела, блокирующие Acvr1, в значительной степени ослабляют НО в модели посттравматической НО *in vivo*; однако антитело к активину А не дало значимого эффекта.

[00224] Объем настоящего изобретения не ограничивается конкретными вариантами осуществления, представленными в настоящем описании. Действительно, из вышеприведенного описания специалистам в данной области техники станут очевидными различные модификации изобретения в дополнение к тем, которые приведены в описании. Такие модификации следует рассматривать как входящие в объем прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с белком рецептора активина А типа 1 (ACVR1) и/или его мутантом, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент взаимодействует с одной или более аминокислотами, содержащимися во внеклеточном домене ACVR1 (аминокислоты 21-123 SEQ ID NO: 341), и где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с клетками, экспрессирующими полноразмерный белок ACVR1 и/или его мутант.

2. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где полноразмерный белок ACVR1 или его мутант представляет собой полноразмерный человеческий белок ACVR или его мутант.

3. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.2, где полноразмерный человеческий белок ACVR1 содержит аминокислоты 21-509 SEQ ID NO: 341.

4. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1 или п.2, где мутантный белок ACVR1 содержит мутацию, выбранную из группы, состоящей из ACVR1 L196P, delP197_F198insL, R202I, R206H, Q207E, R258S, R258G, G325A, G328E, G328R, G328W, G356D и R375P SEQ ID NO: 341.

5. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.4, которое связывается с белком ACVR1(R206H) и ингибирует ACVR1(R206H)-опосредованную передачу сигнала костного морфогенетического белка (BMP).

6. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с белком ACVR1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент: (i) связывается с клетками, экспрессирующими человеческий ACVR1; и/или (ii) связывается с ACVR1 и ингибирует ACVR1-опосредованную передачу сигнала костного морфогенетического белка (BMP).

7. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-6, где антитело представляет собой полностью человеческое моноклональное антитело.

8. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-6, где антитело обладает одним или более свойствами, выбранными из группы, состоящей из: (a) является полностью человеческим моноклональным антителом; (b) связывается с внеклеточным доменом человеческого ACVR1, слитым с Fc (например, SEQ ID NO: 339), при 25°C с константой диссоциации (K_D) менее 60 нМ, менее 12 нМ, менее 2 нМ, менее 1 нМ или менее 0,5 нМ, измеренной в анализе методом поверхностного плазмонного резонанса; (c) связывается с внеклеточным доменом человеческого ACVR1, слитым с mFc (SEQ ID NO: 339), при 37°C с константой диссоциации (K_D) менее 150 нМ, менее 15 нМ, менее 5 нМ, менее 1,5 нМ или менее 1 нМ, измеренной в анализе методом поверхностного плазмонного резонанса; (d) связывается с внеклеточным доменом человеческого ACVR1, слитым с тус-тус-гексагистидиновой меткой (например, SEQ ID NO: 338), при 25°C с K_D менее 300 нМ, менее 150 нМ, менее 25 нМ, менее 10 нМ, менее 5 нМ, менее 3 нМ или

менее 2 нМ, измеренной в анализе методом поверхностного плазмонного резонанса; (e) связывается с внеклеточным доменом человеческого ACVR1, слитым с тус-тус-гексагистидиновой меткой (например, SEQ ID NO: 338), при 37°C с K_D менее 500 нМ, менее 50 нМ, менее 25 нМ, менее 10 нМ, измеренной в анализе методом поверхностного плазмонного резонанса; (f) не связывается с мышинным ACVR1 или связывается с внеклеточным доменом мышинного ACVR1, слитым с тус-тус-гексагистидиновой меткой (например, SEQ ID NO: 340), при 25°C с K_D более 500 нМ, измеренной в анализе методом поверхностного плазмонного резонанса; (g) не связывается с мышинным ACVR1 или связывается с внеклеточным доменом мышинного ACVR1, слитым с тус-тус-гексагистидиновой меткой (например, SEQ ID NO: 340), при 37°C с K_D более 500 нМ, измеренной в анализе методом поверхностного плазмонного резонанса; (k) связывается с клетками, экспрессирующими человеческий белок ACVR1 или человеческий белок ACVR(R206H); (l) ингибирует активацию клеток, экспрессирующих человеческий ACVR1(R206H), человеческим активинном A с IC_{50} менее 25 нМ, измеренной в клеточном биологическом анализе; (m) ингибирует активацию клеток, экспрессирующих человеческий ACVR1(R206H), человеческим BMP7 с IC_{50} менее 20 нМ, менее 5 нМ, менее 3 нМ или менее 1 нМ или менее, измеренной в клеточном биологическом анализе; (m) в значительной степени снижает уровень гепсидина в сыворотке при введении мышам, экспрессирующим человеческий ACVR1 вместо мышинного аллеля; (n) в значительной степени повышает уровень железа в сыворотке при введении мышам, экспрессирующим человеческий ACVR1 вместо мышинного аллеля; и/или (o) ингибирует передачу сигналов ACVR1 дикого типа при введении мышам, экспрессирующим человеческий ACVR1 вместо мышинного аллеля; и (p) содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей HCVR, перечисленных в таблице 1, и LCVR, содержащую аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из последовательностей LCVR, перечисленных в таблице 1.

9. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-8, содержащее три определяющих комплементарность области тяжелой цепи (CDR) (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в варибельной области тяжелой цепи (HCVR); и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в варибельной области легкой цепи (LCVR), где HCVR имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей HCVR, перечисленных в таблице 1.

10. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.9, содержащее LCVR с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из последовательностей LCVR, перечисленных в таблице 1.

11. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.9 или п.10, содержащее:

(a) домен HCDR1 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 24, 44, 78, 98, 130, 150, 168, 188, 205, 225, 257 и 321;

(b) домен HCDR2 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 26, 46, 80, 100, 132, 152, 170, 207, 227, 243, 259, 275, 291, 303 и 323;

(c) домен HCDR3 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 28, 60, 82, 102, 134, 154, 172, 191, 209, 229, 261, 305 и 325;

(d) домен LCDR1 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 32, 50, 86, 106, 138, 158, 176, 195, 213, 233, 265, 279, 309 и 329;

(e) домен LCDR2 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 34, 52, 64, 88, 108, 122, 140, 178, 215, 247, 281, 311 и 331; и

(f) домен LCDR3 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 36, 66, 90, 110, 142, 160, 180, 197, 217, 235, 249, 267, 283, 313 и 333.

12. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.11, содержащее пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 22/30, 22/72, 42/48, 58/62, 76/84, 96/104, 116/119, 128/136, 148/156, 166/174, 186/193, 203/211, 223/231, 241/245, 255/263, 273/277, 289/293, 300/307 и 319/327.

13. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.12, содержащее CDR, выбранные из группы, состоящей из: (a) SEQ ID NO: 44, 46, 28, 50, 52 и 36; и (b) SEQ ID NO: 24, 46, 60, 50, 64 и 66.

14. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.13, содержащее пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 42/48 и 58/62.

15. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с ACVR1, содержащее три CDR тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в HCVR, и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в LCVR; где HCVR содержит:

(i) аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 22, 42, 58, 76, 96, 116, 128, 148, 166, 186, 203, 223, 241, 255, 273, 289, 300 и 319;

(ii) аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 22, 42, 58, 76, 96, 116, 128, 148, 166, 186, 203, 223, 241, 255, 273, 289, 300 и 319;

(iii) аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 22, 42, 58, 76, 96, 116, 128, 148, 166, 186, 203, 223, 241, 255, 273, 289, 300 и 319; или

(iv) аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 22, 42, 58, 76, 96, 116, 128, 148, 166, 186, 203, 223, 241, 255, 273, 289, 300 и 319, где указанная аминокислотная последовательность имеет не более 12 аминокислотных замен,

и LCVR содержит:

(a) аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 30, 48, 62, 72, 84, 104, 119, 136, 156, 174, 193, 211, 231, 245, 263, 277, 293, 307 и 327;

(b) аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 30, 48, 62, 72, 84, 104, 119, 136, 156, 174, 193, 211, 231, 245, 263, 277, 293, 307 и 327;

(c) аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 30, 48, 62, 72, 84, 104, 119, 136, 156, 174, 193, 211, 231, 245, 263, 277, 293, 307 и 327; или

(d) аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 30, 48, 62, 72, 84, 104, 119, 136, 156, 174, 193, 211, 231, 245, 263, 277, 293, 307 и 327, где указанная аминокислотная последовательность имеет не более 10 аминокислотных замен.

16. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.15, содержащее HCVR с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 22, 42, 58, 76, 96, 116, 128, 148, 166, 186, 203, 223, 241, 255, 273, 289, 300 и 319.

17. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.15, содержащее LCVR с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 30, 48, 62, 72, 84, 104, 119, 136, 156, 174, 193, 211, 231, 245, 263, 277, 293, 307 и 327.

18. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.15-17, содержащее три CDR, содержащиеся в HCVR, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 22, 42, 58, 76, 96, 116, 128, 148, 166, 186, 203, 223, 241, 255, 273, 289, 300 и 319; и три CDR, содержащиеся в LCVR, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 30, 48, 62, 72, 84, 104, 119, 136, 156, 174, 193, 211, 231, 245, 263, 277, 293, 307 и 327.

19. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.15-18, содержащее пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 22/30, 22/72, 42/48, 58/62, 76/84, 96/104, 116/119, 128/136, 148/156, 166/174, 186/193, 203/211, 223/231, 241/245, 255/263, 273/277, 289/293, 300/307 и 319/327.

20. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.15, содержащее:

(a) домен HCDR1 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 24, 44, 78, 98, 130, 150, 168, 188, 205, 225, 257 и 321;

(b) домен HCDR2 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 26, 46, 80, 100, 132, 152, 170, 207, 227, 243, 259, 275, 291, 303 и 323;

(c) домен HCDR3 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 28, 60, 82, 102, 134, 154, 172, 191, 209, 229, 261, 305 и 325;

(d) домен LCDR1 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 32, 50, 86, 106, 138, 158, 176, 195, 213, 233, 265, 279, 309 и 329;

(e) домен LCDR2 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 34, 52, 64, 88, 108, 122, 140, 178, 215, 247, 281, 311 и 331; и

(f) домен LCDR3 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 36, 66, 90, 110, 142, 160, 180, 197, 217, 235, 249, 267, 283, 313 и 333.

21. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.20, содержащее CDR, выбранные из группы, состоящей из: (a) SEQ ID NO: 44, 46, 28, 50, 52 и 36; и (b) SEQ ID NO: 24, 46, 60, 50, 64 и 66.

22. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.21, содержащее пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 42/48 и 58/62.

23. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое ингибирует ACVR-опосредованную и/или ACVR1(R206H)-опосредованную передачу сигнала костного морфогенетического белка (BMP), содержащее три CDR HCVR, где HCVR имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 22, 42, 58, 76, 96, 116, 128, 148, 166, 186, 203, 223, 241, 255, 273, 289, 300 и 319; и три CDR LCVR, где LCVR имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 30, 48, 62, 72, 84, 104, 119, 136, 156, 174, 193, 211, 231, 245, 263, 277, 293, 307 и 327.

24. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конкурирующие за связывание ACVR1 с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп.1-23.

25. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с тем же эпитопом, что и антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-23.

26. Фармацевтическая композиция, содержащая выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с ACVR1 по любому из пп.1-25, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

27. Выделенная полинуклеотидная молекула, содержащая полинуклеотидную последовательность, которая кодирует HCVR антитела по любому из пп.1-25.

28. Выделенная полинуклеотидная молекула, содержащая полинуклеотидную последовательность, кодирующую LCVR антитела по любому из пп.1-25.

29. Вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность по п.27 и/или полинуклеотидную последовательность по п.27.

30. Клетка-хозяин, экспрессирующая вектор по п.29.

31. Способ получения анти-ACVR1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, включающий выращивание клетки-хозяина по п.30 в условиях, позволяющих продуцировать антитело или его фрагмент, и выделение полученного таким образом

антитела или его фрагмента.

32. Способ по п.31, дополнительно включающий приготовление антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в виде фармацевтической композиции, содержащей приемлемый носитель.

33. Способ лечения, профилактики или облегчения по меньшей мере одного симптома или признака ACVR-ассоциированного заболевания или расстройства, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-25.

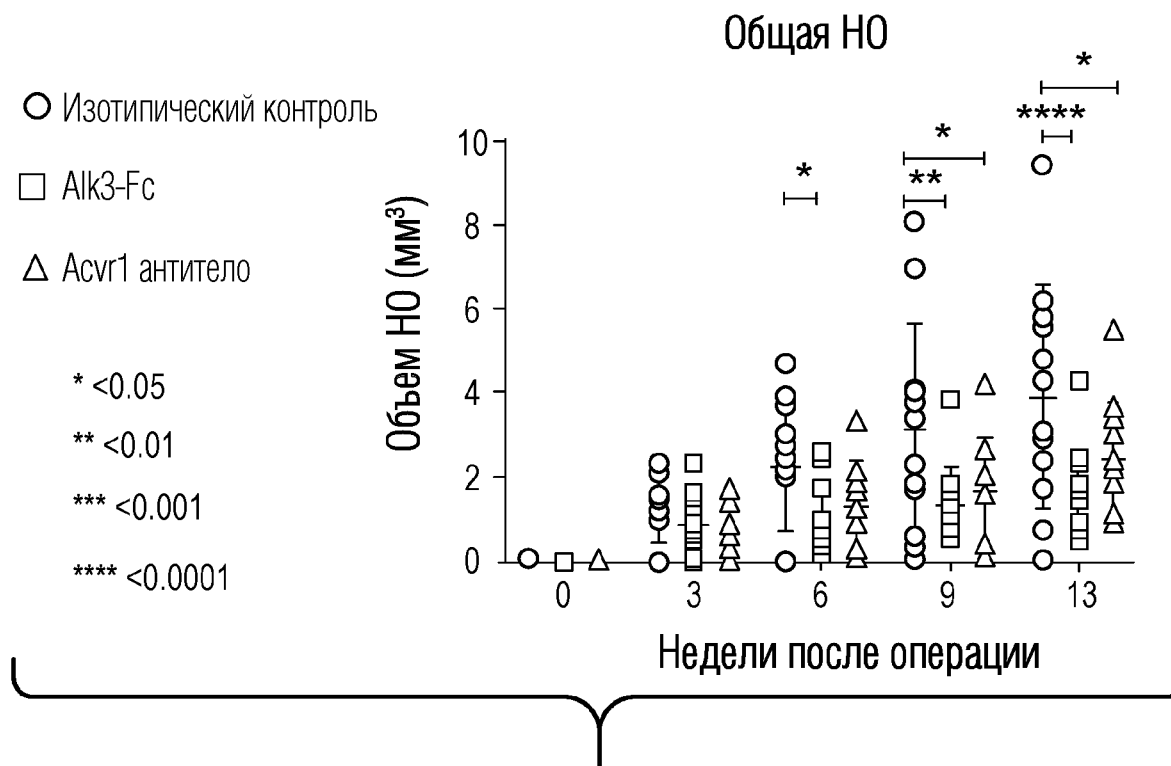
34. Способ по п.33, где ACVR1-ассоциированное заболевание или расстройство, выбирают из группы, состоящей из гетеротопической оссификации, эктопической оссификации, дисплазии костей, анемии и диффузной внутренней глиомы моста.

35. Способ по п.33 или п.34, где фармацевтическую композицию вводят с целью профилактики или терапии нуждающегося в этом субъекта.

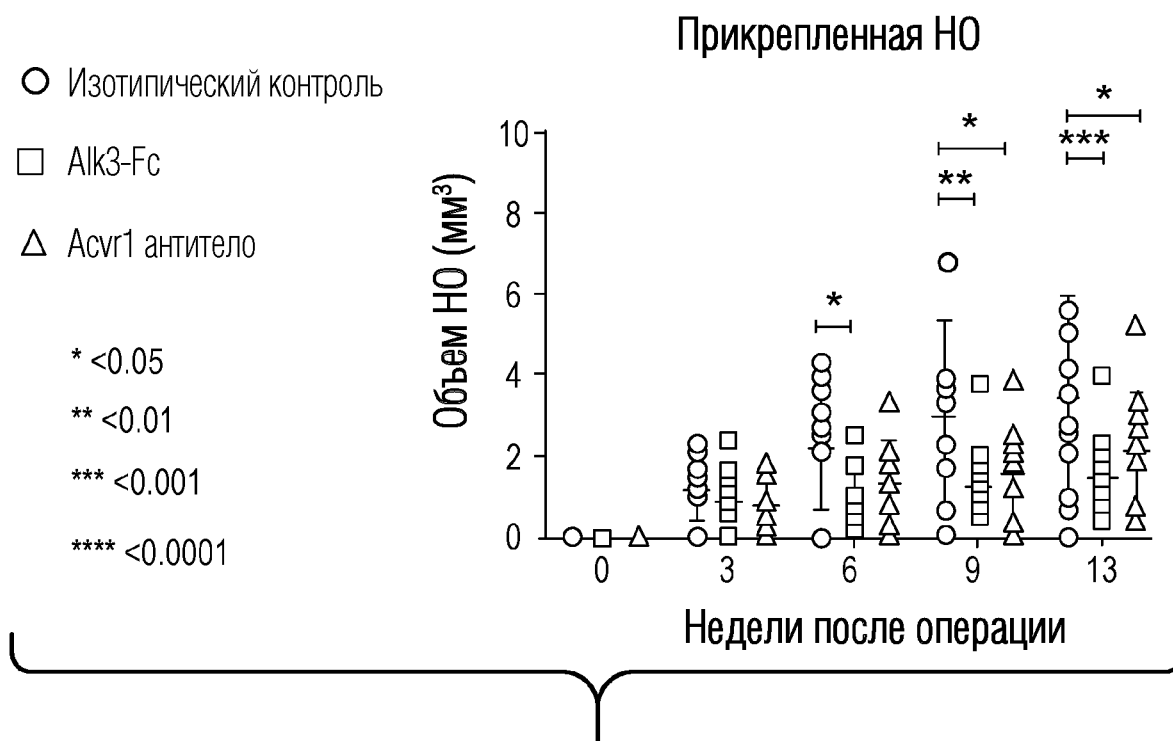
36. Способ по любому из пп.33-35, где фармацевтическую композицию вводят в комбинации со вторым терапевтическим средством.

37. Способ по п.36, где второе терапевтическое средство выбирают из группы, состоящей из антитела к ингибитору активина А, анти-BMP7 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, анти-ACVR2 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, противовоспалительных лекарственных веществ, стероидов, бисфосфонатов, миорелаксантов и агонистов гамма-рецептора ретиноевой кислоты (RAR), модификации образа жизни и пищевой добавки.

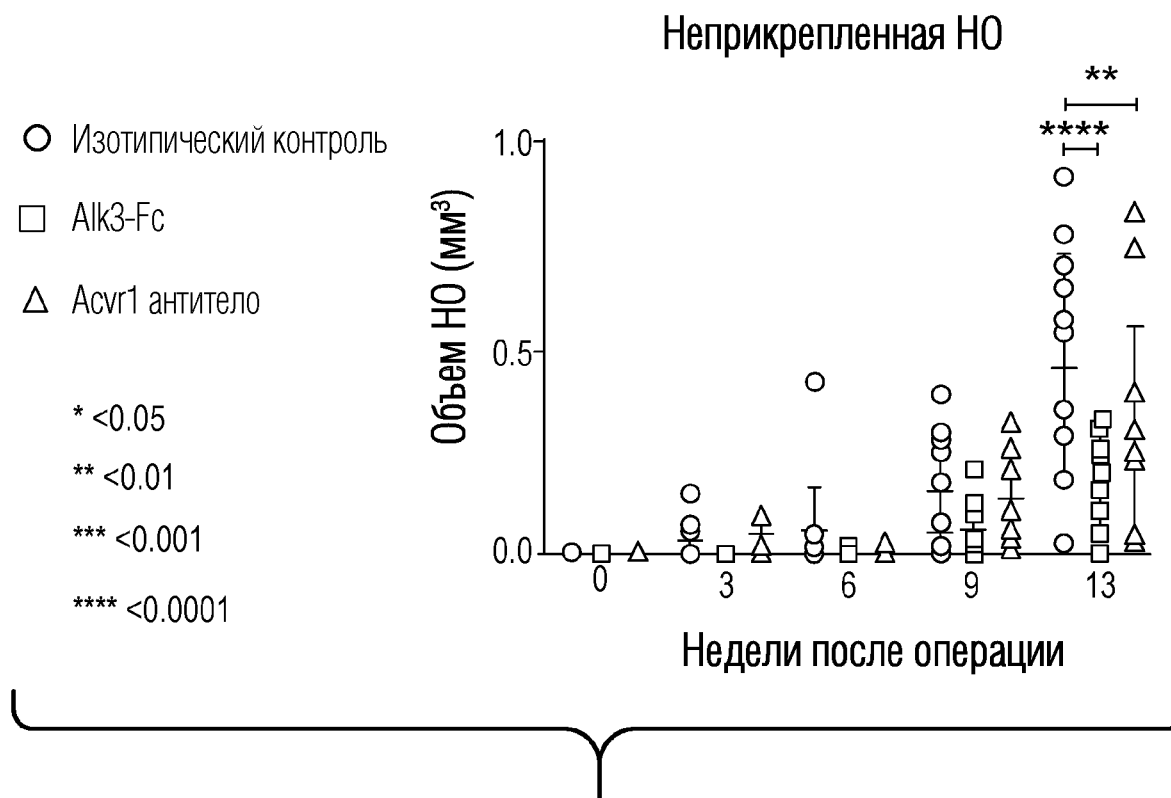
38. Способ по любому из пп.33-37, где фармацевтическую композицию вводят подкожно, внутривенно, внутрикочно, внутрибрюшинно, внутримышечно или интрацеребровентрикулярно.



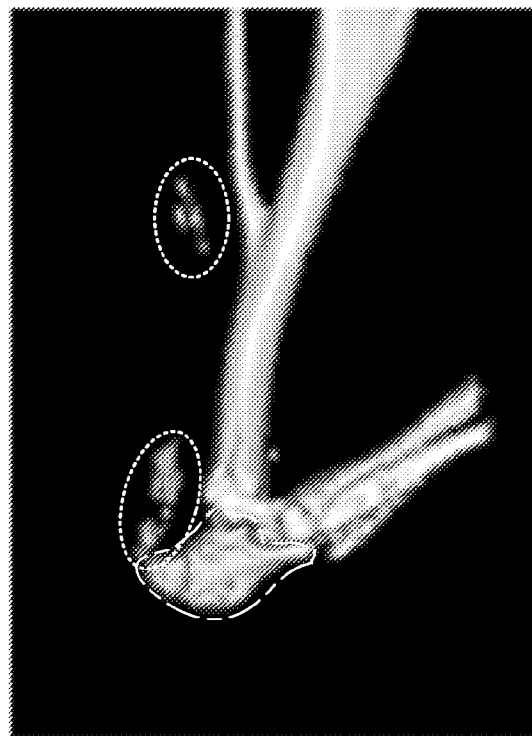
ФИГ. 1А



ФИГ. 1В



Изотипический контроль



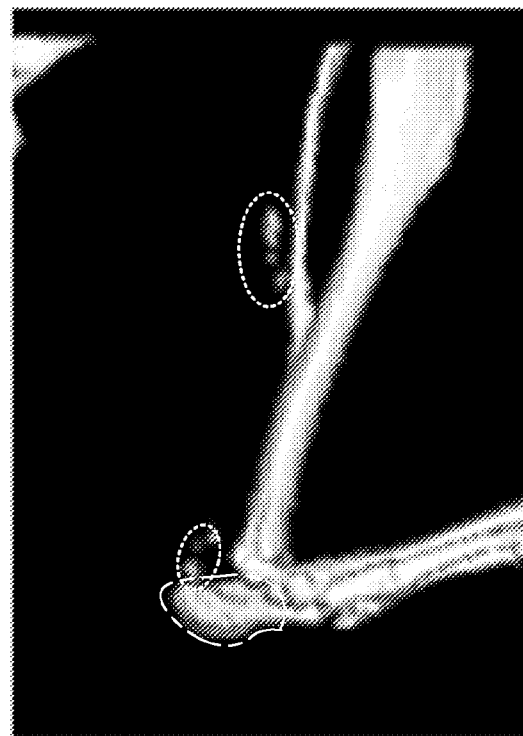
ФИГ. 2А

Alk3-Fc



ФИГ. 2В

Acvr1 Ab



ФИГ. 2С