

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202091891 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.10.29

(51) Int. Cl. C07K 16/22 (2006.01)
A61P 19/00 (2006.01)
A61P 19/10 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.02.14

(54) ИНГИБИТОР ГРЕМЛИНА-1 ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ПЕРЕЛОМА КОСТИ ИЛИ ДЕФЕКТА КОСТИ

(31) 1802486.9

(72) Изобретатель:

(32) 2018.02.15

Дэвис Гарет Чарльз Глиндур, Робертс
Скотт Джон (GB)

(33) GB

(86) PCT/EP2019/053726

(74) Представитель:

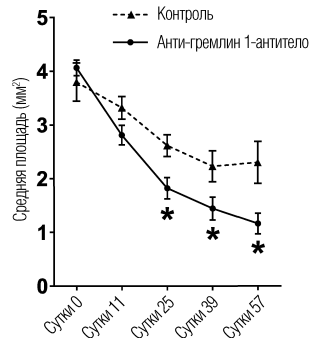
(87) WO 2019/158658 2019.08.22

Медведев В.Н. (RU)

(71) Заявитель:

ЮСБ БИОФАРМА СРЛ (BE)

(57) Настоящее изобретение относится к способам лечения перелома кости или дефекта кости. Изобретение раскрывает эффективное применение антигремлин 1-антитела для ускорения заживления и сращения костной ткани при дефектах сегментарного зазора; и демонстрирует, что ингибиторы активности гремлина-1 могут обеспечить усовершенствованную терапию для лечения или предупреждения несращения перелома.



202091891
A1

202091891
A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-563482EA/019

ИНГИБИТОР ГРЕМЛИНА-1 ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ПЕРЕЛОМА КОСТИ ИЛИ ДЕФЕКТА КОСТИ

Настоящее изобретение относится к способам лечения перелома кости или дефекта кости. Изобретение раскрывает эффективное применение анти-гремлин-1-антитела для ускорения заживления и соединения костной ткани при сегментарных дефектах разрыва; и демонстрирует, что ингибиторы активности гремлина-1 могут обеспечить усовершенствованную терапию для лечения или предупреждения несращения перелома.

Уровень техники

Перелом кости представляет собой разрыв или трещину в костной ткани и может быть результатом травматического повреждения, такого как падение или удар, но также может возникнуть в результате заболеваний, которые оказывают отрицательное влияние на целостность кости.

Нестабилизированные переломы костей заживают в процессе эндохондрального окостенения, которое инициируется образованием сгустка крови или гематомы. Это связано с воспалительным ответом, который модулирует иммунные клетки и популяции окружающих скелетных стволовых клеток. Впоследствии гематома заменяется минерализованной хрящевой мозолью благодаря действию различных ростовых факторов, включая трансформирующий фактор роста бета (TGF β) (Cho et al; 2002), факторы роста фибробластов (FGF) (Schmid et al; 2009) и костные морфогенные белки (BMP) (Yu et al; 2010). Под действием остеокластов и остеобластов минерализованная мозоль заменяется костной тканью. Заключительная стадия ремоделирования включает замену костной ткани пластинчатой костью. Завершение этого процесса может занять много лет в зависимости от возраста и состояния заболевания пациента.

В клинической практике переломы костей обычно лечат фиксацией, с использованием опоры, такой как шина, слепок или скоба. В экстремальных случаях, связанных со сложными переломами, может потребоваться хирургическое вмешательство и использование

внутренних и внешних фиксаторов, которые прикрепляются непосредственно к кости. Даже с этими мерами примерно у 10% пациентов процесс восстановления тканей является недостаточным (Einhorn et al; 2014), что приводит к замедленному сращению кости (неспособности достижения сращения через 6 месяцев после перелома) или отсутствию сращения. Несращение определяется как неполное заживление в течение 9 месяцев, в сочетании с отсутствием рентгенологических показателей, свидетельствующих о заживлении перелома, наблюдаемого в течение трех последовательных месяцев (Buza et al; 2016). Современные хирургические методы лечения несращенных переломов и критических дефектов кости часто ограничиваются с точки зрения количества и качества доступных материалов. Обычно используемые методы лечения включают аутологичный или аллогенный трансплантат, однако они несут дополнительный риск поражения донорных участков (Goulet et al; 1997) и развития инфекции (Bostrom et al; 2005), соответственно.

Костный дефект представляет потерю костной ткани в результате травмы или заболевания.

В настоящее время существует большая неудовлетворенная медицинская потребность в улучшенном лечении переломов костей и дефектов костей. Следовательно, целью настоящего изобретения является обеспечение новых способов лечения перелома кости или дефекта кости.

Настоящее изобретение обеспечивает ингибиторы активности гремлина-1 для применения в лечении перелома кости или дефекта кости. Изобретение раскрывает эффективное применение анти-гремлин-1-антитела для ускорения заживления и соединения костной ткани при дефектах сегментарного зазора; и демонстрирует, что ингибиторы активности гремлина-1 могут обеспечить усовершенствованную терапию для лечения или предупреждения несращения перелома.

Описание изобретения

Если не указано иное, то все научные и технические термины, используемые здесь, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в данной области. Все публикации, упомянутые здесь, включены посредством ссылки.

Понятно, что любой из описанных здесь вариантов осуществления

можно комбинировать.

Настоящее изобретение обеспечивает ингибитор активности гремлина-1 для применения в лечении перелома кости или дефекта кости. Изобретение также обеспечивает применение ингибитора активности гремлина-1 для производства лекарственного средства для лечения перелома кости или дефекта кости. Изобретение также относится к способу лечения перелома кости или дефекта кости, включающему введение терапевтически эффективного количества ингибитора активности гремлина-1.

Гремлин-1 (также известный как Drm и CKTSF1B1) представляет собой гликопротеин из 184 аминокислот, который входит в семейство DAN белков с секретируемым цистеиновым узлом (наряду с Cerberus и Dan, среди прочих). Гремлин связывается с и ингибирует способность BMP-2, 4 и 7 передавать сигналы наряду с установленной проангиогенной функцией, возможно, через агонизм с VEGFR2. Основная роль гремлина-1 проявляется в период развития, где он жизненно необходим при формировании почек и формировании зачатка конечностей.

Известно, что сигнальный путь с участием костного морфогенетического белка (BMP) контролирует образование эндохондральной кости, где гремлин-1 (GREM1) является одним из природных антагонистов этого пути за счет его связывания с BMP2, BMP4 и BMP7 (Hsu et al; 1998). Условная делеция GREM1 в остеобластах приводит к сенсбилизации сигнального пути/активности BMP и усилению формирования кости *in vivo* (Gazzerro et al; 2007), тогда как условная избыточная экспрессия в клетках того же типа вызывает остеопению и спонтанные переломы (Gazzerro et al; 2005). Кроме того, хотя полный нокаут является эмбриональным летальным на фоне BL6, 49% плодов выживали дольше 24 ч после рождения на смешанном генетическом фоне C57BL/6/FVB, и в то время как дефекты развития скелета присутствовали в большом количестве, повышенные скорости образования кости могли наблюдаться (Canalis et al; 2012). Несмотря на эту функцию GREM1 в период развития, отсутствуют данные, позволяющие предположить, что ингибирование только этого белка будет способствовать восстановлению перелома кости в постнатальном периоде жизни. Действительно, хотя формирование

эндохондральной кости является основным механизмом скелетогенеза на эмбриональных стадиях, механизмы, которые регулируют рекрутинг клеток, являются разными процессами по сравнению с восстановлением перелома в постнатальном периоде (Ferguson et al; 1999). Роль воспаления была указана в качестве ключевого фактора восстановления кости у взрослых, поэтому факторы развития, контролирующие процессы скелетогенеза, нельзя просто экстраполировать на механизмы восстановления в постнатальном периоде.

Как здесь используется, термин гремлин-1 обычно имеет последовательность с идентификационным номером UniProt O60565 (SEQ ID NO: 1). Термин гремлин-1 может также относиться к полипептиду гремлина-1, который:

(a) содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 с или без N-концевого сигнального пептида, т. е. может содержать или состоять из последовательности зрелого пептида, показанной в SEQ ID NO: 21; или

(b) представляет производное, имеющее одну или более аминокислотных замен, модификаций, делеций или инсерций относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 с или без N-концевого сигнального пептида (как показано в SEQ ID NO: 21), которое сохраняет активность гремлина-1, такую как аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 20;

(c) представляет его варианты, где такие варианты обычно сохраняют, по меньшей мере, примерно 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94% или 95% идентичность с SEQ ID NO: 1 (или SEQ ID NO: 20 или 21) (или даже примерно 96%, 97%, 98% или 99% идентичность). Другими словами, такие варианты могут сохранять примерно 60% - примерно 99% идентичность с SEQ ID NO: 1, предпочтительно примерно 80% - примерно 99% идентичность с SEQ ID NO: 1, более предпочтительно примерно 90% - примерно 99% идентичность с SEQ ID NO: 1 и наиболее предпочтительно примерно 95% - примерно 99% идентичность с SEQ ID NO: 1. Варианты дополнительно описаны ниже.

Как обсуждается далее ниже, номера остатков обычно указываются на основе нумерации в последовательности SEQ ID NO: 1. Однако специалист может легко экстраполировать нумерацию остатков

на последовательность производного или варианта, которые обсуждались выше. Там, где указаны номера остатков, изобретение также охватывает эти остатки в последовательности варианта или производного.

Заявители настоящего изобретения кристаллизовали человеческий гремлин-1 один и в комплексе с антителом, названным Ab 7326 (фрагменты Fab). Кристаллизация гремлина-1 позволила определить предполагаемые остатки в сайте связывания с BMP. Кроме того, кристаллизация с Ab 7326, которое является аллостерическим ингибирующим антителом, позволила определить остатки в эпитопе антитела (WO 2018/115017 A2). Антитела, связывающиеся с этим эпитопом, имеют потенциал применения в качестве терапевтических агентов в лечении перелома кости или дефекта кости.

Ингибиторы активности гремлина-1

Ингибитор активности гремлина-1 по настоящему изобретению представляет агент, который снижает или блокирует активность гремлина-1. Ингибиторы по настоящему изобретению могут частично или полностью ингибировать активность гремлина-1. Ингибиторы для применения в настоящем изобретении включают без ограничения ингибиторы, которые способны связываться с гремлином-1 или с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей гремлин-1, или способны ингибировать экспрессию гремлина-1. Такими ингибиторами могут быть, без ограничения, белки, полипептиды, пептиды, пептидомиметики, нуклеиновые кислоты (например, ДНК, РНК, антисмысловые РНК и миРНК), углеводы, липиды и небольшие молекулы.

В одном варианте осуществления ингибитор активности гремлина-1 представляет анти-гремлин-1-антитело или его функционально активный фрагмент, вариант или производное.

Термин «антитело» в контексте настоящего описания включает целые антитела и любой антигенсвязывающий фрагмент (т. е. «антигенсвязывающий участок») или их отдельные цепи. Антитело или иммуноглобулин обычно относится к гликопротеину, содержащему, по меньшей мере, две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные дисульфидными связями, или его антигенсвязывающему участку. Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области тяжелой цепи (сокращенно обозначенной здесь как HCVR или V_H) и

константной области тяжелой цепи. Каждая легкая цепь состоит из переменной области легкой цепи (сокращенно обозначенной здесь как LCVR или V_L) и константной области легкой цепи. Переменные области тяжелой и легкой цепей содержат домены связывания, который взаимодействует с антигеном. Области V_H и V_L могут быть дополнительно подразделены на области гиперпеременности, называемые определяющими комплементарность участками (CDR), чередующиеся с областями, которые являются более консервативными, называемыми каркасными областями (FR).

Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент (C1q) классической системы комплемента.

Антитело для применения в настоящем изобретении может представлять моноклональное антитело или поликлональное антитело, и обычно оно представляет моноклональное антитело. Антитело для применения в изобретении может представлять химерное антитело, CDR-привитое антитело, нанотело, человеческое или гуманизированное антитело, или антигенсвязывающий фрагмент любого из них.

Поликлональные антитела можно получить обычными методами, такими как иммунизация подходящего животного антигеном, представляющим интерес. Затем можно отобрать кровь у животного и выделить иммуноглобулиновую фракцию.

Анти-гремлин-1-антитела могут быть получены там, где необходима иммунизация животного, введением полипептидов животному, например, животному, отличному от человека, с использованием хорошо известных и рутинных протоколов, см., например, «Справочник по экспериментальной иммунологии», D.M. Weir (ed.), Vol. 4, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, Англия, 1986). Можно иммунизировать многих теплокровных животных, таких как кролики, мыши, крысы, овцы, козы, коровы, верблюды, ламы или свиньи. Однако кролики, мыши и крысы обычно являются наиболее подходящими.

Моноклональные антитела могут быть получены любым способом, известным в данной области, таким как метод гибридомы (Kohler & Milstein, 1975, Nature, 256: 495-497), метод триомы, метод

гибридомы В-клеток человека (Kozbor et al., 1983, *Immunology Today*, 4:72) и метод EBV-гибридомы (Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, pp.77-96, Alan R Liss, Inc., 1985).

Антитела для применения в изобретении также могут быть получены с использованием методов получения антител с одним лимфоцитом посредством клонирования и экспрессии кДНК вариабельной области иммуноглобулина, полученных из отдельных лимфоцитов, отобранных для продукции специфических антител, например, способами, описанными Babcock, J. et al., 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (15): 7843-78481; WO 92/02551; WO 2004/051268 и WO 2004/106377.

Антитела для применения в настоящем изобретении также можно получить с использованием различных методов фагового дисплея, известных в данной области, и они включают методы, раскрытые Brinkman et al. (*J. Immunol. Methods*, 1995, 182: 41-50), Ames et al. (*J. Immunol. Methods*, 1995, 184: 177-186), Kettleborough et al. (*Eur. J. Immunol.* 1994, 24: 952-958), Persic et al. (*Gene*, 1997, 187, 9-18), Burton et al. (*Advances in Immunology*, 1994, 57: 191-280) и в WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; и в патенте США № 5698426; патенте США № 5223409; патенте США № 5403484; патенте США № 5580717; патенте США № 5427908; патенте США № 5750753; патенте США № 5821047; патенте США № 5571698; патенте США № 5427908; патенте США № 5516637; патенте США № 5780225; патенте США № 5658727; патенте США № 5733743 и патенте США 5969108.

Полностью человеческие антитела представляют собой антитела, в которых вариабельные области и константные области (где они присутствуют) как тяжелой, так и легкой цепей являются человеческими или по существу идентичными человеческим последовательностям, но необязательно из одного и того же антитела. Примеры полностью человеческих антител могут включать антитела, полученные, например, способами фагового дисплея, описанными выше, и антитела, продуцированные мышами, где гены вариабельной области и, необязательно, гены константной области мышиногo иммуноглобулина заменены их человеческими аналогами, например, как, в общем, описано в EP 0546073, патентах США №

5545806, 5569825, 5625126, 5633425, 5661016, 5770429, EP 0438474 и EP 0463151.

Альтернативно, антитело по изобретению может быть получено способом, включающим иммунизацию млекопитающего, отличного от человека, иммуногеном гремлином-1; получение препарата антител от указанного млекопитающего; получение из них моноклональных антител, которые распознают гремлин-1.

Молекулы антител для применения в настоящем изобретении могут включать полную молекулу антитела, имеющую полноразмерные тяжелые и легкие цепи, или ее фрагмент или антигенсвязывающий участок. Термин «антигенсвязывающий участок» антитела относится к одному или более фрагментам антитела, которые сохраняют способность избирательно связываться с антигеном. Было показано, что антигенсвязывающая функция антитела может выполняться фрагментами полноразмерного антитела. Антитела и их фрагменты и их антигенсвязывающие участки могут представлять, не ограничиваясь этим, Fab, модифицированный Fab, Fab', модифицированный Fab', F(ab')₂, Fv, однодоменные антитела (например, VH или VL или VHH), scFv, би-, три- или тетравалентные антитела, Bis-scFv, диатела, триатела, тетратела и эпитоп-связывающие фрагменты любого из вышеуказанного (см., например, Holliger and Hudson, 2005, Nature Biotech. 23 (9): 1126- 1136; Adair and Lawson, 2005, Drug Design Reviews - Online 2 (3), 209-217). Способы создания и получения этих фрагментов антител хорошо известны в данной области (см., например, Verma et al., 1998, Journal of Immunological Methods, 216, 165-181). Другие фрагменты антител для применения в настоящем изобретении включают фрагменты Fab и Fab', описанные в международных заявках на патент WO 2005/003169, WO 2005/003170 и WO 2005/003171, и фрагменты Fab-dAb, описанные в международной заявке на патент WO 2009/040562. Поливалентные антитела могут иметь много специфичностей или могут быть моноспецифичными (см., например, WO 92/22853 и WO 2005/113605). Эти фрагменты антител можно получить с использованием обычных методик, известных специалистам в данной области техники, и фрагменты могут быть скринированы на пригодность таким же образом, как и интактные антитела.

В одном примере функционально активный фрагмент антитела для применения в настоящем изобретении представляет Fab, Fab', F(ab')₂, Fv или scFv.

Домены константной области молекулы антитела для применения в настоящем изобретении, если они присутствуют, могут быть выбраны с учетом эффекторных функций, которые могут быть необходимыми. Например, домены константной области могут представлять домены человеческих IgA, IgD, IgE, IgG или IgM. В частности, можно использовать домены константной области человеческого IgG, особенно изотипов IgG1 и IgG3, когда требуются эффекторные функции антител. Альтернативно, могут использоваться изотипы IgG2 и IgG4, когда эффекторные функции антитела не требуются. В одном примере изотипом является IgG4P, как описано в публикации Angal S. et al., Mol Immunol, Vol. 30 (1), p105-108, 1993.

Антитело для применения в изобретении может быть получено, экспрессировано, создано или выделено рекомбинантными способами, например (a) антитела, выделенные из животного (например, мыши), которое является трансгенным или трансхромосомным в отношении генов иммуноглобулина, представляющих интерес, или гибридомы полученной из них, (b) антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансформированные для экспрессии представляющего интерес антитела, например, из трансфектомы, (c) антитела, выделенные из комбинаторной библиотеки рекомбинантных антител, и (d) антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любым другим способом, который включает сплайсинг последовательностей гена иммуноглобулина с другими последовательностями ДНК.

Антитело для применения в изобретении может представлять собой человеческое антитело или гуманизированное антитело. Предусматривается, что термин «человеческое антитело» в контексте настоящего описания включает антитела, имеющие переменные области, в которых как каркасные, так и CDR-области получены из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Кроме того, если антитело содержит константную область, то константная область также происходит из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Человеческие антитела для применения в изобретении могут включать аминокислотные

остатки, не кодированные последовательностями человеческого иммуноглобулина зародышевой линии (например, мутации, введенные случайным или сайт-специфическим мутагенезом *in vitro*, или соматическая мутация *in vivo*). Однако термин «человеческое антитело», как здесь используется, не предназначен для включения антител, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии другого вида млекопитающих, таких как мышь, были привиты на каркасные последовательности человека.

Такое человеческое антитело может представлять человеческое моноклональное антитело. Такое человеческое моноклональное антитело может быть продуцировано гибридомой, которая включает В-клетку, полученную от трансгенного животного, отличного от человека, например, трансгенной мыши, имеющей геном, содержащий трансген тяжелой цепи и трансген легкой цепи человека, слитый с иммортализованной клеткой.

Человеческие антитела можно получить иммунизацией человеческих лимфоцитов *in vitro* с последующей трансформацией лимфоцитов вирусом Эпштейна-Барра.

Термин «производное» относится к любой модифицированной форме антитела, например, конъюгату антитела и другого агента или эффекторной молекулы.

Эффекторная молекула может включать одну эффекторную молекулу или две или более таких молекул, связанных таким образом, чтобы образовалась единая молекула, которая может быть присоединена к антителам для применения в настоящем изобретении. Когда желательно получить фрагмент антитела, связанный с эффекторной молекулой, то его можно получить стандартными химическими методами или методами рекомбинантной ДНК, в которых фрагмент антитела связывают либо напрямую, либо через связывающий агент с эффекторной молекулой. Способы конъюгирования таких эффекторных молекул с антителами хорошо известны в данной области (см. Hellstrom et al., *Controlled Drug Delivery*, 2nd Ed., Robinson et al., Eds., 1987, pp. 623-53; Thorpe et al., 1982, *Immunol. Rev.*, 62: 119-58 и Dubowchik et al., 1999, *Pharmacology and Therapeutics*, 83, 67-123). Конкретные химические процедуры включают, например, те, которые описаны в WO 93/06231, WO 92/22583, WO 89/00195, WO 89/01476 и WO 2003/031581.

Альтернативно, когда эффекторная молекула представляет собой белок или полипептид, то связь может быть достигнута с использованием процедур рекомбинантной ДНК, например, как описано в WO 86/01533 и EP 0392745.

Эффекторная молекула может увеличить период полураспада антитела *in vivo* и/или уменьшить иммуногенность антитела и/или усилить доставку антитела через эпителиальный барьер к иммунной системе. Примеры подходящих эффекторных молекул такого типа включают полимеры, альбумин, альбумин-связывающие белки или альбумин-связывающие соединения, такие как описаны в WO 2005/117984.

Термин «гуманизованное антитело» относится к молекулам CDR-привитых антител, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии других видов млекопитающих, таких как мышь, были привиты к человеческим каркасным последовательностям. Дополнительные модификации каркасной области могут быть сделаны в человеческих каркасных последовательностях.

Как здесь используется, термин «молекула CDR-привитого антитела» относится к молекуле антитела, в которой тяжелая и/или легкая цепь содержит один или более CDR (включая, если желательно, один или более модифицированных CDR) из донорного антитела (например, мышинового или крысиного моноклонального антитела), были привиты на каркас вариабельной области тяжелой и/или легкой цепи акцепторного антитела (например, человеческого антитела). Обзор смотри в публикации Vaughan et al., *Nature Biotechnology*, 16, 535-539, 1998. В одном варианте осуществления, вместо переноса всего CDR, только один или более определяющих специфичность остатков любого из CDR, описанных здесь выше, переносят на каркас человеческого антитела (см., например, Kashmiri et al., 2005, *Methods*, 36, 25-34). В одном варианте осуществления переносятся только определяющие специфичность остатки из одного или более CDR, описанных здесь выше, на каркас человеческого антитела. В еще одном варианте осуществления только остатки, определяющие специфичность, из каждого из CDR, описанных здесь выше, переносятся на каркас человеческого антитела.

Когда CDR или определяющие специфичность остатки привиты, то

может использоваться любая подходящая акцепторная каркасная последовательность вариабельной области с учетом класса/типа донорного антитела, из которого получены CDR, включая каркасные области мыши, приматов и человека. Следовательно, CDR-привитое антитело для применения в настоящем изобретении имеет вариабельный домен, включающий акцепторные каркасные области человека, а также один или более CDR или остатков, определяющих специфичность, описанных выше. Таким образом, в одном варианте осуществления обеспечивается нейтрализующее CDR-привитое антитело, в котором вариабельный домен включает акцепторные каркасные области человека и донорные CDR, отличные от человеческих.

Примерами человеческих каркасов, которые можно использовать в настоящем изобретении, являются KOL, NEWM, REI, EU, TUR, TEI, LAY и POM (Kabat et al., выше). Например, KOL и NEWM можно использовать для тяжелой цепи, REI можно использовать для легкой цепи, и EU, LAY и POM можно использовать как для тяжелой цепи, так и для легкой цепи. Альтернативно, можно использовать последовательности зародышевой линии человека; они доступны, например, на: <http://www.vbase2.org/> (см. Retter et al., Nucl. Acids Res. (2005) 33 (supplement 1), D671-D674).

В CDR-привитом антителе для применения в настоящем изобретении акцепторные тяжелая и легкая цепи необязательно должны быть получены из одного и того же антитела и могут, если желательно, включать составные цепи, имеющие каркасные области, полученные из разных цепей.

Также в CDR-привитом антителе для применения в настоящем изобретении каркасные области не должны иметь точно такую же последовательность, как последовательности акцепторного антитела. Например, необычные остатки могут быть заменены на более часто встречающиеся остатки для данного класса или типа акцепторной цепи. Альтернативно выбранные остатки в каркасных областях акцептора могут быть заменены так, чтобы они соответствовали остатку, обнаруженному в таком же положении в донорном антителе (см. Reichmann et al., 1998, Nature, 332, 323-324). Такие изменения должны быть сведены к минимуму, необходимому для восстановления аффинности донорного антитела. Протокол для выбора остатков в

акцепторных каркасных областях, которые, возможно, необходимо изменить, описан в WO 91/09967.

Специалисту в данной области также должно быть понятно, что антитела могут подвергаться различным посттрансляционным модификациям. Тип и степень этих модификаций часто зависят от линии клеток-хозяев, используемых для экспрессии антитела, а также от условий культивирования. Такие модификации могут включать вариации гликозилирования, окисления метионина, образования дикетопиперазина, изомеризации аспартата и дезамидирования аспарагина. Частой модификацией является потеря карбоксиконцевого основного остатка (такого как лизин или аргинин) в результате действия карбоксипептидаз (как описано в публикации Harris, RJ. *Journal of Chromatography* 705: 129-134, 1995).

В одном варианте осуществления тяжелая цепь антитела содержит домен CH1, и легкая цепь антитела содержит домен CL, либо каппа, либо лямбда.

Биологические молекулы, такие как антитела или фрагменты, содержат кислотные и/или основные функциональные группы, что придает молекуле суммарный положительный или отрицательный заряд. Количество суммарного «наблюдаемого» заряда будет зависеть от абсолютной аминокислотной последовательности молекулы, локального окружения заряженных групп в трехмерной структуре и условий окружающей среды молекулы. Изоэлектрическая точка (pI) представляет рН, при котором конкретная молекула или поверхность не несет суммарного электрического заряда. В одном варианте осуществления антитело или фрагмент по настоящему изобретению имеет изоэлектрическую точку (pI), равную, по меньшей мере, 7. В одном варианте осуществления антитело или фрагмент имеет изоэлектрическую точку, равную, по меньшей мере, 8, например, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8 или 9. В одном варианте осуществления pI антитела составляет 8. Программы, такие как ** ExPASy http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html (см. Walker, *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press (2005), 571 -607) можно использовать для прогнозирования изоэлектрической точки антитела или фрагмента.

Антитела для применения в изобретении могут включать, по

меньшей мере, одну, по меньшей мере, две или все три последовательности CDR тяжелой цепи SEQ ID NO: 4-6 (HCDR1/HCDR2/HCDR3 соответственно). Это последовательности HCDR1/HCDR2/HCDR3 антитела Ab7326 из примеров, как определено с использованием методологии Kabat.

Системы нумерации Kabat и Chothia для определения последовательностей CDR хорошо известны в данной области (так же как и другие системы). Последовательности CDR можно определить с использованием любого подходящего метода, и в настоящем изобретении, хотя обычно используется система нумерации по Kabat, можно также использовать другие методы. В данном случае SEQ ID NO: 3 представляет последовательность HCDR1 Ab7326, определенную с использованием комбинированного определения по системе Chothia & Kabat.

Антитела для применения в изобретении могут содержать, по меньшей мере, одну, по меньшей мере, две или все три последовательности CDR легкой цепи SEQ ID NO: 7-9 (LCDR1/LCDR2/LCDR3 соответственно). Это последовательности LCDR1/LCDR2/LCDR3 Ab7326 с использованием методологии Kabat.

В одном варианте осуществления антитело содержит, по меньшей мере, последовательность HCDR3 SEQ ID NO: 6.

Как правило, антитело содержит, по меньшей мере, одну последовательность CDR тяжелой цепи, выбранную из SEQ ID NO: 4-6, и, по меньшей мере, одну последовательность CDR легкой цепи, выбранную из SEQ ID NOS 7-9. Антитело может содержать, по меньшей мере, две последовательности CDR тяжелой цепи, выбранные из SEQ ID NO: 4-6 и, по меньшей мере, две последовательности CDR легкой цепи, выбранные из SEQ ID NO: 7-9. Антитело обычно включает все три последовательности CDR тяжелой цепи SEQ ID NO: 4-6 (HCDR1/HCDR2/HCDR3 соответственно) и все три последовательности CDR легкой цепи SEQ ID NO: 7-9 (LCDR1/LCDR2/LCDR3 соответственно). Антитела могут быть химерными, человеческими или гуманизированными антителами.

Антитело может содержать последовательность вариабельной области тяжелой цепи (HCVR) SEQ ID NO: 10 или 12 (HCVR вариантов 1 и 2 Ab7326). Антитело может содержать последовательность

вариабельной области легкой цепи (LCVR) SEQ ID NO: 11 или 13 (LCVR вариантов 1 и 2 Ab7326). Антитело предпочтительно содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 10 или 12 и последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 11 или 13 (в частности, пары HCVR/LVCR с SEQ ID NO: 10/11 или 12/13).

Варианты 1 и 2 Ab7326 различаются одной аминокислотой в вариабельной области тяжелой цепи и одной аминокислотой в вариабельной области легкой цепи следующим образом:

- вариант 1 вариабельной области тяжелой цепи содержит глутаминовую кислоту (E) в положении 6 (SEQ ID NO: 10)
- вариант 2 вариабельной области тяжелой цепи содержит глутамин (Q) в положении 6 (SEQ ID NO: 12)
- вариант 1 вариабельной области легкой цепи содержит серин (S) в положении 7 (SEQ ID NO: 11)
- вариант 2 вариабельной области легкой цепи содержит треонин (T) в положении 7 (SEQ ID NO: 13).

Таким образом, в одном варианте осуществления антитело содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи (HCVR) SEQ ID NO: 10, где остаток глутаминовой кислоты в положении 6 замещен остатком глутамина (E6Q); где нумерация остатков соответствует нумерации в SEQ ID NO: 10.

В одном варианте осуществления антитело содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи (HCVR) SEQ ID NO: 12, где остаток глутамина в положении 6 замещен остатком глутаминовой кислоты (Q6E); где нумерация остатков соответствует нумерации в SEQ ID NO: 12.

В одном варианте осуществления антитело содержит последовательность вариабельной области легкой цепи (LCVR) SEQ ID NO: 11, где остаток серина в положении 7 замещен остатком треонина (S7T); где нумерация остатков соответствует нумерации в SEQ ID NO: 11.

В одном варианте осуществления антитело содержит последовательность вариабельной области легкой цепи (LCVR) SEQ ID NO: 13, где остаток треонина в положении 7 замещен остатком серина (T7S); где нумерация остатков соответствует нумерации в SEQ ID NO:

13.

В одном варианте осуществления антитело содержит последовательность SEQ ID NO: 3 или 4 для HCDR1, последовательность SEQ ID NO: 5 для HCDR2, последовательность SEQ ID NO: 6 для HCDR3, последовательность SEQ ID NO: 7 для LCDR1, последовательность SEQ ID NO: 8 для LCDR2 и последовательность SEQ ID NO: 9 для LCDR3; и где переменная область тяжелой цепи включает последовательность, имеющую, по меньшей мере, 95% идентичность (например, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность), с последовательностью SEQ ID NO: 10, и переменная область легкой цепи содержит последовательность, имеющую, по меньшей мере, 95% идентичность (например, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность) с последовательностью SEQ ID NO: 11.

В одном варианте осуществления антитело содержит последовательность SEQ ID NO: 3 или 4 для HCDR1, последовательность SEQ ID NO: 5 для HCDR2, последовательность SEQ ID NO: 6 для HCDR3, последовательность SEQ ID NO: 7 для LCDR1, последовательность SEQ ID NO: 8 для LCDR2 и последовательность SEQ ID NO: 9 для LCDR3; и где переменная область тяжелой цепи содержит последовательность, имеющую, по меньшей мере, 95% идентичность (например, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность), с последовательностью SEQ ID NO: 12, и переменная область цепи содержит последовательность, имеющую, по меньшей мере, 95% идентичность (например, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность) с последовательностью SEQ ID NO: 13.

Антитело может содержать последовательность тяжелой цепи (H-цепи):

SEQ ID NO: 14 варианта 1 тяжелой цепи мышинового полноразмерного IgG1, или

SEQ ID NO: 28 варианта 2 тяжелой цепи мышинового полноразмерного IgG1, или

SEQ ID NO: 30 варианта 1 тяжелой цепи человеческого полноразмерного IgG1, или

SEQ ID NO: 16 варианта 2 тяжелой цепи человеческого полноразмерного IgG1, или

SEQ ID NO: 22 вариант 1 тяжелой цепи человеческого

полноразмерного IgG4P или

SEQ ID NO: 34 варианта 2 тяжелой цепи человеческого полноразмерного IgG4P, или

SEQ ID NO: 18 варианта 1 тяжелой цепи Fab, или

SEQ ID NO: 32 варианта 2 тяжелой цепи Fab.

Антитело может содержать последовательность легкой цепи (L-цепи):

SEQ ID NO: 15 варианта 1 легкой цепи мышинового полноразмерного IgG1, или

SEQ ID NO: 29 варианта 2 легкой цепи мышинового полноразмерного IgG1, или

SEQ ID NO: 31 варианта 1 легкой цепи человеческого полноразмерного IgG1, или

SEQ ID NO: 17 варианта 2 легкой цепи человеческого полноразмерного IgG1, или

SEQ ID NO: 23 варианта 1 легкой цепи человеческого полноразмерного IgG4P или

SEQ ID NO: 35 варианта 2 легкой цепи человеческого полноразмерного IgG4P, или

SEQ ID NO: 19 варианта 1 легкой цепи Fab, или

SEQ ID NO: 33 варианта 2 легкой цепи Fab.

В одном примере антитело содержит пару последовательностей тяжелой цепи/легкой цепи:

SEQ ID NO: 14/15 варианта 1 мышинового полноразмерного IgG1, или

SEQ ID NO: 28/29 варианта 2 мышинового полноразмерного IgG1, или

SEQ ID NO: 30/31 варианта 1 человеческого полноразмерного IgG1 или

SEQ ID NO: 16/17 варианта 2 человеческого полноразмерного IgG1, или

SEQ ID NO: 22/23 варианта 1 человеческого полноразмерного IgG1P, или

SEQ ID NO: 34/35 варианта 2 человеческого полноразмерного IgG1P, или

SEQ ID NO: 18/19 варианта легкой цепи 1 Fab или

SEQ ID NO: 32/33 варианта легкой цепи 2 Fab.

Вариантные формы соответствующих последовательностей могут быть взаимозаменяемыми. Например, антитело может содержать пару последовательностей тяжелой цепи/легкой цепи:

SEQ ID NO: 14/29 варианта 1 тяжелой цепи /варианта 2 легкой цепи мышиноного полноразмерного IgG1, или

SEQ ID NO: 28/15 варианта 2 тяжелой цепи/варианта 2 легкой цепи мышиноного полноразмерного IgG1, или

SEQ ID NO: 30/17 варианта 1 тяжелой цепи/варианта 2 легкой цепи человеческого полноразмерного IgG1, или

SEQ ID NO: 16/31 варианта 2 тяжелой цепи/варианта 1 легкой цепи человеческого полноразмерного IgG1, или

SEQ ID NO: 22/35 варианта 1 тяжелой цепи/варианта 2 легкой цепи человеческого полноразмерного IgG4P, или

SEQ ID NO: 34/23 варианта 2 тяжелой цепи/варианта 1 легкой цепи человеческого полноразмерного IgG4P, или

SEQ ID NO: 18/33 варианта 1 тяжелой цепи/варианта 2 легкой цепи Fab, или

SEQ ID NO: 32/19 варианта 2 тяжелой цепи/варианта 1 легкой цепи Fab.

Антитела могут быть химерными, человеческими или гуманизированными антителами.

Альтернативно антитело может представлять собой или может включать вариант одной из конкретных последовательностей, указанных выше. Например, вариант может представлять вариант замены, делеции или добавления любой из вышеуказанных аминокислотных последовательностей.

Вариантное антитело может содержать 1, 2, 3, 4, 5, до 10, до 20 или более (обычно максимум до 50) аминокислотных замен и/или делеций из специфических последовательностей, указанных выше. «Делеционные» варианты могут включать делецию отдельных аминокислот, делецию небольших групп аминокислот, например, 2, 3, 4 или 5 аминокислот, или делецию более крупных аминокислотных областей, таких как делеция определенных аминокислотных доменов, или другие свойства. Варианты «замены» обычно включают замену одной или более аминокислот одним и тем же числом аминокислот и

проведение консервативных аминокислотных замен. Например, аминокислота может быть замещена альтернативной аминокислотой, имеющей сходные свойства, например, другой основной аминокислотой, другой кислой аминокислотой, другой нейтральной аминокислотой, другой заряженной аминокислотой, другой гидрофильной аминокислотой, другой гидрофобной аминокислотой, другой полярной аминокислотой, другой ароматической аминокислотой или другой алифатической аминокислотой. Некоторые свойства 20 основных аминокислот, которые можно использовать для выбора подходящих заместителей, представляют следующие:

Таблица 1

Свойства аминокислот

Ala	алифатическая, гидрофобная, нейтральная	Met	гидрофобная, нейтральная
Cys	полярная, гидрофобная, нейтральная	Asn	полярная, гидрофильная, нейтральная
Asp	полярная, гидрофильная, заряженная (-)	Pro	гидрофобная, нейтральная
Glu	полярная, гидрофильная, заряженная (-)	Gln	полярная, гидрофильная, нейтральная
Phe	ароматическая, гидрофобная, нейтральная	Arg	полярная, гидрофильная, заряженная (+)
Gly	алифатическая, нейтральная	Ser	полярная, гидрофильная, нейтральная
His	ароматическая, полярная, гидрофильная, заряженная (+)	Thr	полярная, гидрофильная, нейтральная
Ile	алифатическая, гидрофобная,	Val	алифатическая,

	нейтральная		гидрофобная, нейтральная
Lys	полярная, заряженная (+)	Trp	ароматическая, гидрофобная, нейтральная
Leu	алифатическая, нейтральная	Tyr	ароматическая, полярная, гидрофобная

«Производные» или «варианты», как правило, включают такие, в которых вместо встречающейся в природе аминокислоты находится аминокислота, которая представляет ее структурный аналог. Аминокислоты, используемые в последовательностях, также могут быть дериватизированы или модифицированы, например, помечены, обеспечивая тем самым функцию антителя, которая существенно не изменилась.

Производные и варианты, описанные выше, можно получить во время синтеза антителя или посредством модификации после его получения, или когда антители находятся в рекомбинантной форме с использованием известных методик сайт-направленного мутагенеза, случайного мутагенеза или ферментативного расщепления и/или лигирования нуклеиновых кислот.

Вариантные антители могут иметь аминокислотную последовательность, которая имеет более чем примерно 60% или более чем примерно 70%, например, 75% или 80%, обычно более чем примерно 85%, например, более чем примерно 90% или 95% идентичность аминокислот с аминокислотными последовательностями, раскрытыми здесь (в частности, последовательности HCVR/LCVR и последовательности Н- и L-цепей). Кроме того, антители могут представлять вариант, который имеет более чем примерно 60% или более чем примерно 70%, например, 75% или 80%, обычно более чем примерно 85%, например, более чем примерно 90% или 95% идентичность аминокислот с последовательностями HCVR/LCVR и последовательностями Н- и L-цепей, раскрытыми здесь, при сохранении точных CDR, раскрытых для этих последовательностей. Варианты могут сохранять, по меньшей мере, примерно 90%, 91%, 92%,

93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность с последовательностями HCVR/LCVR и с последовательностями Н- и L-цепей, раскрытыми здесь (в некоторых обстоятельствах при сохранении точных CDR).

Варианты обычно сохраняют примерно 60% - примерно 99% идентичность, примерно 80% - примерно 99% идентичность, примерно 90% - примерно 99% идентичность или примерно 95% - примерно 99% идентичность. Такой уровень идентичности аминокислот можно наблюдать по всей длине соответствующей последовательности SEQ ID NO или по части последовательности, такой как примерно 20, 30, 50, 75, 100, 150, 200 или более аминокислот, в зависимости от размера полипептида полной длины.

В отношении аминокислотных последовательностей «идентичность последовательности» относится к последовательностям, которые имеют указанное значение при оценке с использованием ClustalW (Thompson et al., 1994, выше) со следующими параметрами:

параметры попарного выравнивания - метод: точный, матрица: PAM, штраф за открытие разрыва: 10,00, штраф за продолжение разрыва: 0,10;

параметры множественного выравнивания - матрица: PAM, штраф за открытие разрыва: 10,00, % идентичности за задержку: 30, штраф разрывы конца: вкл., расстояние разделения разрыва: 0, отрицательная матрица: нет, штраф за продолжение разрыва: 0,20, штраф за разрывы для остатков: включено, штрафы за гидрофильный разрыв: включено, гидрофильные остатки: GPSNDQEKR. Предполагается, что идентичность последовательности в конкретном остатке включает идентичные остатки, которые были просто дериватизированы.

Антитела, имеющие конкретные последовательности и производные и варианты, которые сохраняют функцию или активность этих цепей, следовательно, предназначены для применения в настоящем изобретении.

Предполагается, что «производные» в контексте настоящего описания включают реакционноспособные производные, например, тиол-селективные реакционноспособные группы, такие как малеимиды и т.п. Реакционноспособная группа может быть связана непосредственно или через линкерный сегмент с полимером. Должно быть понятно, что

остаток такой группы будет в некоторых случаях образовывать часть продукта в виде связывающей группы между фрагментом антитела и полимером.

Полимер может быть синтетическим или встречающимся в природе полимером, например, необязательно замещенным полиалкиленовым, полиалкениленовым или полиоксиалкиленовым полимером с прямой или разветвленной цепью или разветвленным или неразветвленным полисахаридом, например, гомо- или гетерополисахаридом.

Конкретные необязательные заместители, которые могут присутствовать в синтетическом полимере, включают одну или более гидроксигрупп, метильных групп или метоксигрупп. Конкретные примеры синтетических полимеров включают необязательно замещенный поли(этиленгликоль) с прямой или разветвленной цепью, поли(пропиленгликоль), поли(виниловый спирт) или его производные, особенно необязательно замещенный поли(этиленгликоль), такой как метоксиполи(этиленгликоль) или его производные. Конкретные встречающиеся в природе полимеры включают лактозу, амилозу, декстран, гликоген или их производные.

Размер полимера может варьироваться, если желательно, но обычно он находится в диапазоне средней молекулярной массы от 500 до 50000 Да, например, от 5000 до 40000 Да, например, от 20000 до 40000 Да. Размер полимера, в частности, может быть выбран на основе предполагаемого применения продукта, например, способности локализоваться в определенных тканях или для увеличения периода полураспада в кровотоке (для обзора см. Chapman, 2002, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, 531-545). Таким образом, например, когда продукт предназначен для того, чтобы выходить из кровотока и проникать в ткани, то может быть выгодным использовать полимер с небольшой молекулярной массой, например, с молекулярной массой примерно 5000 Да. Для применений, где продукт остается в кровотоке, может быть выгодным использовать полимер с более высокой молекулярной массой, например, имеющий молекулярную массу в диапазоне от 20000 Да до 40000 Да.

Подходящие полимеры включают полиалкиленовый полимер, такой как поли(этиленгликоль) или, особенно, метоксиполи(этиленгликоль) или его производное, и особенно с молекулярной массой в диапазоне

примерно от 15000 Да до примерно 40000 Да.

В одном примере антитела для применения в настоящем изобретении присоединены к поли(этиленгликолевые) (ПЭГ) группам. В одном конкретном примере антитело представляет собой фрагмент антитела, и молекулы ПЭГ могут быть присоединены через любую доступную аминокислотную боковую цепь или концевую аминокислотную функциональную группу, расположенную во фрагменте антитела, например, любую свободную аминокислоту, иминогруппу, тиоловую, гидроксильную или карбоксильную группу. Такие аминокислоты могут встречаться в природе во фрагменте антитела или могут быть встроены во фрагмент с использованием методов рекомбинантной ДНК (см., например, патент США 5219996; патент США 5667425; WO98/25971, WO2008/038024). В одном примере молекула антитела представляет модифицированный Fab-фрагмент, где модификация представляет добавление к С-концу его тяжелой цепи одной или более аминокислот для обеспечения возможности присоединения эффекторной молекулы. Соответственно, дополнительные аминокислоты образуют модифицированную шарнирную область, содержащую один или более остатков цистеина, к которым может быть присоединена эффекторная молекула. Для присоединения двух или более молекул ПЭГ можно использовать несколько сайтов.

Антитела могут конкурировать за связывание с гремлином-1 или связываться с тем же эпитопом, что и те, которые определены выше в отношении последовательностей Н-цепи/Л-цепи, HCVR/LCVR или CDR. В частности, антитело может конкурировать за связывание с гремлином-1 или связываться с тем же эпитопом, что и антитело, которое содержит комбинацию последовательностей HCDR1/HCDR2/HCDR3/LCDR1/LCDR2/LCDR3 из SEQ ID NO: 4/5/6/7/8/9. Антитело может конкурировать за связывание с гремлином-1 или связываться с тем же эпитопом, что и антитело, которое содержит пару последовательностей HCVR и LCVR SEQ ID NO: 10/11 или 12/13 или полноразмерных цепей SEQ ID NO: 14/15 или 16/17.

«Эпитоп» представляет собой область антигена, которая связывается антителом. Эпитопы можно определить как структурные или функциональные. Функциональные эпитопы, как правило, представляют подмножество структурных эпитопов и имеют остатки,

которые непосредственно обеспечивают аффинность взаимодействия. Эпитопы также могут быть конформационными, т. е. состоять из нелинейных аминокислот. В некоторых вариантах осуществления эпитопы могут включать детерминанты, которые представляют химически активные поверхностные группы молекул, такие как аминокислоты, боковые сахарные цепи, фосфорильные группы или сульфонильные группы, и, в некоторых вариантах осуществления, могут иметь конкретные трехмерные структурные характеристики и/или характеристики удельного заряда.

Можно легко определить, связывается ли антитело с тем же эпитопом, что связывается референсное антитело или конкурирует с ним, используя обычные способы, известные в данной области. Например, чтобы определить, связывается ли тестируемое антитело с тем же эпитопом, что и референсное антитело, для применения в изобретении, референсному антителу дают возможность связываться с белком или пептидом в условиях насыщения. Затем оценивают способность тестируемого антитела связываться с белком или пептидом. Если тестируемое антитело связывается с белком или пептидом после насыщающего связывания с референсным антителом, то можно сделать вывод, что тестируемое антитело связывается с другим эпитопом, чем референсное антитело. С другой стороны, если тестируемое антитело не связывается с белком или пептидом после насыщающего связывания с референсным антителом, то тогда тестируемое антитело может связываться с тем же эпитопом, что и эпитоп, связанный с референсным антителом по изобретению.

Для того, чтобы определить, конкурирует ли антитело за связывание с референсным антителом, описанная выше методика связывания выполняется в двух ориентациях. В первой ориентации референсному антителу дают возможность связываться с белком/пептидом в условиях насыщения с последующей оценкой связывания тестируемого антитела с молекулой белка/пептида. Во второй ориентации тестируемому антителу дают возможность связываться с белком/пептидом в условиях насыщения с последующей оценкой связывания референсного антитела с белком/пептидом. Если в обеих ориентациях только первое (насыщающее) антитело связывается с белком/пептидом, то делается вывод, что тестируемое

антитело и референсное антитело конкурируют за связывание с белком/пептидом. Как будет понятно специалисту в данной области, антитело, которое конкурирует за связывание с референсным антителом, необязательно может связываться с идентичным эпитопом, что и референсное антитело, но может стерически блокировать связывание референсного антитела посредством связывания перекрывающегося или смежного эпитопа.

Два антитела связываются с одним и тем же или перекрывающимся эпитопом, если каждое конкурентно ингибирует (блокирует) связывание другого антитела с антигеном. То есть 1-, 5-, 10-, 20- или 100-кратный избыток одного антитела ингибирует связывание другого антитела, по меньшей мере, на 50%, 75%, 90% или даже 99%, как измерено 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 мутации аминокислот в антигене, которые уменьшают или элиминируют связывание одного антитела, уменьшают или элиминируют связывание другого. Два антитела имеют перекрывающиеся эпитопы, если некоторые мутации аминокислот, которые снижают или элиминируют связывание одного антитела, уменьшают или элиминируют связывание другого.

Затем можно провести дополнительное рутинное экспериментирование (например, мутации пептидов и анализы связывания), чтобы подтвердить, действительно ли наблюдаемое отсутствие связывания тестируемого антитела связано со связыванием с тем же эпитопом, что и у референсного антитела, или стерическое блокирование (или другой феномен) ответственено за отсутствие наблюдаемого связывания. Эксперименты такого рода можно выполнить с использованием ELISA, RIA, поверхностного плазмонного резонанса, проточной цитометрии или любого другого количественного или качественного анализа связывания антител, доступного в данной области.

Было обнаружено, что анти-гремлин-1-антитело из примеров, т.е. антитело Ab7326, связывается со следующими остатками гремлина-1: Ile131, Lys147, Lys148, Phe149, Thr150, Thr151, Arg169, Lys174 и Gln175; где Lys147, Lys148, Phe149, Thr150,

Thr151, Arg169, Lys174 и Gln175, которые присутствуют на одном мономере гремлина-1, и Ile131, который присутствует на втором мономере гремлина-1. Нумерация основана идентификационным номере последовательности SEQ ID NO: 1 UniProt O60565. Как обсуждается в разделе «Примеры», эти остатки эпитопа были идентифицированы с использованием анализа NCONT при 4 Å из комплекса гремлин-1-Ab7326 Fab.

Следовательно, антитела для применения в изобретении могут связываться с эпитопом, который содержит, по меньшей мере, один остаток, выбранный из Ile131, Lys147, Lys148, Phe149, Thr150, Thr151, Arg169, Lys174 и Gln175 (с нумерацией остатков на основе нумерации в SEQ ID NO: 1). Антитела для применения в изобретении могут связываться с эпитопом, который содержит 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или все 9 из этих остатков (предпочтительно, по меньшей мере, 5 остатков).

Антитела для применения в изобретении могут также распознавать эпитоп, где Ile131 присутствует на другом мономере гремлина-1 с другими остатками.

Несмотря на то, что эти остатки представлены для конкретной последовательности человеческого гремлина-1, специалист в данной области может экстраполировать положения этих остатков на другие соответствующие последовательности гремлина, используя обычные методы. Поэтому антитела, связывающиеся с эпитопами, содержащими соответствующие остатки в этих других последовательностях гремлина, также предусматриваются для применения в настоящем изобретении.

Для скрининга антител, которые связываются с конкретным эпитопом, можно провести обычный анализ перекрестного блокирования, такой как описан в «Antibodies, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY). Другие методы включают аланиновое сканирование мутантов, пептидный блоттинг (Reineke (2004) Methods Mol Biol 248:443-63) или анализ расщепления пептидов. Кроме того, могут быть использованы методы, такие как вырезание эпитопа, экстракция эпитопа и химическая модификация антигенов (Tomer (2000) Protein Science: 9: 487-496). Такие методы хорошо известны в данной области.

Эпитопы антител также можно определить с помощью рентгеновской кристаллографии. Следовательно, антитела для применения в настоящем изобретении можно оценить с помощью рентгеновской кристаллографии антитела, связанного с гремлином-1. Эпитопы, в частности, могут быть идентифицированы определением остатков на гремлин-1 в пределах 4Å от остатка паратопа антитела.

Антитела можно тестировать на связывание с гремлином-1, например, стандартным анализом ELISA или вестерн-блоттингом. Анализ ELISA также можно использовать для скрининга гибридом, которые показывают положительную реактивность с белком-мишенью. Селективность связывания антитела также можно определить мониторингом связывания антитела с клетками, экспрессирующими белок-мишень, например, проточной цитометрией. Таким образом, способ скрининга может включать стадию идентификации антитела, способного связываться с гремлином-1, проведением ELISA или вестерн-блоттинга или проточной цитометрии.

Антитела могут избирательно (или специфически) распознавать гремлин-1. Антитело или другое соединение «селективно связывает» или «избирательно распознает» белок, когда он связывается с преимущественной или высокой аффинностью к белку, для которого оно селективно, но по существу не связывается или связывается с низкой аффинностью с другими белками. Селективность антитела может быть дополнительно исследована определением того, связывается ли антитело с другими родственными белками, как обсуждалось выше, или насколько оно различает их. Антитела для применения в изобретении обычно распознают человеческий гремлин-1.

Антитела также могут обладать перекрестной реактивностью для родственных белков или человеческого гремлина-1 и гремлина-1 других видов.

Под термином «специфическое (или селективное)» антитело следует понимать, что антитело связывается с белком, представляющим интерес, без существенной перекрестной реактивности с какой-либо другой молекулой. Перекрестная реактивность может быть оценена любым подходящим способом, описанным здесь. Перекрестная реактивность антитела может считаться значительной, если антитело связывается с другой молекулой, по меньшей мере,

примерно на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 100% так сильно, как оно связывается с интересующим белком. Антитело, которое является специфическим (или селективным), может связываться с другой молекулой менее чем на 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25% или 20% от силы, с которой оно связывается с интересующим белком. Антитело может связываться с другой молекулой с силой менее чем примерно 20%, менее чем примерно 15%, менее чем примерно 10% или менее чем примерно 5%, менее чем примерно 2% или менее чем примерно 1%, с которой оно связывается с представляющим интерес белком.

Таким образом, антитела, подходящие для применения в настоящем изобретении, могут иметь высокую аффинность связывания с (человеческим) гремлином-1. Антитело может иметь константу диссоциации (K_D) ниже <1 нМ и предпочтительно <500 пМ. В одном примере антитело имеет константу диссоциации (K_D) ниже 200 пМ. В другом примере антитело имеет константу диссоциации (K_D) ниже 100 пМ. Для определения аффинности связывания антитела с его антигеном-мишенью можно использовать различные методы, такие как анализ поверхностным плазмонным резонансом, анализ насыщения или иммуноанализы, такие как ELISA или RIA, которые хорошо известны специалистам в данной области. Примерным методом определения аффинности связывания является поверхностный плазмонный резонансный анализ на приборе BIAcore™ 2000 (Biacore AB, Фрайбург, Германия) с использованием сенсорных чипов CM5, как описано Krinner et al., (2007) Mol. Immunol. February; 44 (5): 916-25. (Epub 2006 11 May)).

Анти-гремлин-1-антитело из примеров, т.е. Ab7326, является аллостерическим ингибитором активности гремлина-1, которое связывается с эпитопом, удаленным от сайта связывания с BMP (WO 2018/115017 A2). Ab7326 связывается с гремлином-1 с исключительно высокой аффинностью со значением $K_d < 100$ пМ, и полагается, что оно будет особенно пригодным для применения в настоящем изобретении.

Ингибитор активности гремлина-1 может оказывать влияние на любую из функций гремлина-1, но обычно уменьшает связывание гремлина-1 с BMP (BMP 2, 4 и/или 7). Гремлин-1 является негативным

регулятором BMP и, таким образом, пониженное связывание повышает передачу сигналов через BMP.

Связывание и передачу сигналов BMP можно детектировать любым способом, известным в данной области. В примерах настоящей заявки описываются два функциональных анализа для тестирования того, насколько агент уменьшает связывание гремлина-1 с BMP. В примере 3 описан анализ репортерного гена *Id1*, где ген *Id1* является геном-мишенью сигнального пути BMP. Повышение сигнала в данном анализе можно использовать для определения того, насколько агент уменьшает связывание гремлина-1 с BMP. В примере 5 описан анализ фосфорилирования SMAD. SMAD 1, 5 и 8 фосфорилируются на сигнальном пути BMP. Следовательно, повышение фосфорилирования SMAD можно использовать для определения того, насколько агент уменьшает связывание гремлина-1 с BMP.

Как только подходящее антитело идентифицировано и выбрано, то может быть идентифицирована аминокислотная последовательность антитела методами, известными в данной области. Гены, кодирующие антитело, могут быть клонированы с использованием вырожденных праймеров. Антитело можно получить рекомбинантным путем с использованием обычных методов.

Примеры последовательностей ДНК, кодирующих полноразмерные тяжелые цепи и легкие цепи Ab7326, представлены в списке последовательностей:

SEQ ID NO: 24 (вариант 1 тяжелой цепи человеческого IgG1)

SEQ ID NO: 25 (вариант ДНК легкой цепи человеческого IgG1)

SEQ ID NO: 26 (вариант 1 тяжелой цепи ДНК человеческого IgG4P)

SEQ ID NO: 27 (вариант 1 легкой цепи человеческого IgG4P).

Фармацевтические композиции, дозы и режимы дозирования

Ингибитор активности гремлина-1 для применения в настоящем изобретении может находиться в фармацевтической композиции. Фармацевтическая композиция обычно должна быть стерильной и обычно будет включать фармацевтически приемлемый носитель и/или адъювант. Фармацевтическая композиция для применения в изобретении может дополнительно содержать фармацевтически приемлемый адъювант и/или носитель.

Фармацевтические композиции для применения в изобретении

могут включать одну или более фармацевтически приемлемых солей. «Фармацевтически приемлемая соль» относится к соли, которая сохраняет желаемую биологическую активность исходной молекулы и не оказывает каких-либо нежелательных токсикологических эффектов. Примеры таких солей включают аддитивные соли кислоты и аддитивные соли основания.

Как здесь используется, термин «фармацевтически приемлемый носитель» включает любые и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и замедляющие всасывание агенты и тому подобное, которые являются физиологически совместимыми. Носитель может быть подходящим для парентерального введения, например внутривенного, внутримышечного, внутрикожного, внутриглазного, внутрибрюшинного, подкожного, интраспинального или другого парентерального пути введения, например, путем инъекции или инфузии. Альтернативно, носитель может быть подходящим для непарентерального введения, такого как местный, эпидермальный или мукозальный путь введения. Носитель может быть пригоден для перорального введения. В зависимости от пути введения ингибитор может быть покрыт материалом, защищающим его от действия кислот и других естественных условий, которые могут инактивировать ингибитор.

Фармацевтически приемлемые носители включают водные носители или разбавители. Примеры подходящих водных носителей, которые можно использовать в фармацевтических композициях для применения в изобретении, включают воду, забуференную воду и физиологический раствор. Примеры других носителей включают этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и тому подобное) и их подходящие смеси, растительные масла, такие как оливковое масло, и инъеклируемые органические сложные эфиры, такие как этилолеат. Во многих случаях желательно включить в композицию изотонические агенты, например сахара, полиспирты, такие как маннит, сорбит или хлорид натрия.

Фармацевтические композиции обычно должны быть стерильными и стабильными в условиях производства и хранения. Композиция может быть формулирована в виде раствора, микроэмульсии, липосомы или другой упорядоченной структуры, подходящей для обеспечения высокой

концентрации лекарственного средства.

Фармацевтические композиции для применения по изобретению могут содержать дополнительные активные ингредиенты.

Также обеспечиваются наборы, содержащие ингибитор активности гремлина-1 и инструкции по применению в способе лечения согласно изобретению.

Агенты для применения в изобретении или их составы или композиции можно вводить для терапевтического и/или профилактического лечения.

В терапевтических применениях агенты вводят субъекту, уже страдающему расстройством или патологическим состоянием, в количестве, достаточном для излечения, облегчения или частичного купирования состояния или одного или более его симптомов. Такое терапевтическое лечение может привести к уменьшению выраженности симптомов или увеличению частоты или продолжительности бессимптомных периодов. Количество, достаточное для достижения этого, определяется как «терапевтически эффективное количество».

В профилактических применениях агенты вводят субъекту, подверженному риску развития расстройства или патологического состояния, в количестве, достаточном для предупреждения или ослабления последующих негативных эффектов патологического состояния или одного или более его симптомов. Количество, достаточное для достижения этого, определяется как «профилактически эффективное количество». Эффективные количества для каждой цели будут зависеть от тяжести заболевания или травмы, а также от массы тела и общего состояния субъекта.

Субъектом, которому проводят введение, может представлять человека или животное, отличное от человека. Термин «животное, отличное от человека» включает всех позвоночных животных, например млекопитающих и не млекопитающих, таких как приматы, отличные от человека, собаки, кошки, лошади, овцы, коровы, цыплята, амфибии, рептилии и т. п. Типичным является введение людям.

Агент или фармацевтическую композицию для применения в изобретении можно вводить одним или несколькими путями введения, используя один или более из множества способов, известных в данной области. Как будет понятно специалисту в данной области, путь и/или

способ введения будут варьироваться в зависимости от желаемых результатов. Примеры путей введения агентов или фармацевтических композиций для применения в изобретении включают парентеральные пути, такие как внутривенный, внутримышечный, внутрикожный, внутриглазный, внутрибрюшинный, подкожный или интраспинальный пути введения, например, путем инъекции или инфузии. Альтернативно, агент или фармацевтическую композицию можно вводить непарентеральным путем, таким как местный, эпидермальный или мукозальный путь введения. Агент или фармацевтическая композиция могут быть формулированы для перорального введения.

Подходящую дозу ингибирующего агента или фармацевтической композиции для применения в изобретении может определить квалифицированный практикующий врач. Фактические уровни доз активных ингредиентов в фармацевтических композициях для применения в настоящем изобретении могут варьироваться таким образом, чтобы получить количество активного ингредиента, эффективное для достижения желаемого терапевтического ответа для конкретного пациента, композиции и способа введения, не будучи токсичным для пациента. Выбранный уровень доз будет зависеть от многих фармакокинетических факторов, включая активность конкретных используемых композиций, путь введения, время введения, скорость выведения конкретного используемого соединения, продолжительность лечения, возраст, пол, массу тела, состояние, общее состояние здоровья и предшествующая история болезни пациента, который подвергается лечению, и подобные факторы, хорошо известные в медицине.

Подходящая доза может находиться, например, в диапазоне примерно от 0,01 мкг/кг до примерно 1000 мг/кг массы тела, обычно примерно от 0,1 мкг/кг до примерно 100 мг/кг массы тела пациента, который подвергается лечению. Например, подходящая дозировка может составлять примерно от 1 мкг/кг до примерно 10 мг/кг массы тела в день или примерно от 10 мкг/кг до примерно 5 мг/кг массы тела в день.

Режимы дозирования можно корректировать для обеспечения получения оптимального желаемого ответа (например, терапевтического ответа). Например, может быть введена одна доза,

несколько разделенных доз можно ввести во времени, или дозу можно пропорционально снизить или повысить, что диктуется терапевтической ситуацией. Как здесь используется, разовая лекарственная форма относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве единичных доз для субъектов, подлежащих лечению; где каждая единица содержит заданное количество активного агента, рассчитанное для получения желаемого терапевтического эффекта в сочетании с необходимым фармацевтическим носителем.

Введение может проводиться в одной или многократных дозах. Многократные дозы можно вводить одним и тем же или разными путями и в одинаковые или разные места введения. Альтернативно, дозы могут быть обеспечены с помощью композиции с замедленным высвобождением, и в этом случае требуется менее частое введение. Дозировка и частота введения могут варьироваться в зависимости от периода полувыведения ингибирующего агента у пациента и желаемой продолжительности лечения.

Агенты, составы или фармацевтические композиции для применения в изобретении можно вводить совместно с одним или более другими терапевтическими агентами. Комбинированное введение двух или более агентов может быть достигнуто различными способами. Оба можно вводить вместе в одной композиции, или они могут быть введены в отдельных композициях в виде части комбинированной терапии. Например, один может быть введен до, после или одновременно с другим.

Терапевтические показания

Ингибиторы активности гремлина-1 по настоящему изобретению обеспечены для лечения перелома кости или дефекта кости. Перелом кости представляет собой разрыв или трещину в костной ткани и может быть результатом травматического повреждения, такого как падение или удар, но также может возникать в результате заболеваний, которые отрицательно влияют на целостность кости. Костный дефект представляет потерю костной ткани вследствие травмы или заболевания.

Перелом может представлять перелом любой кости в организме.

Дефект кости может быть костным дефектом в любой кости тела.

В одном варианте осуществления перелом кости представляет

собой перелом с замедленным или несращенным соединением. Перелом с замедленным сращением определяется как перелом, который не достигает сращения в течение 6 месяцев после перелома. Несращенный перелом определяется как неполное заживление в течение 9 месяцев, в сочетании с отсутствием рентгенологических показателей, свидетельствующих о заживлении перелома, наблюдаемого в течение трех последовательных месяцев. (Einhorn et al; 2014; Buza et al; 2016). Примеры переломов, которые склонны к развитию с замедленным или несращенным соединением, включают перелом большеберцовой кости, дистального радиуса, шейки бедра и ладьевидной кости.

В одном варианте осуществления перелом кости или дефект кости происходит в результате заболевания, которое оказывает отрицательное влияние на целостность кости. Примеры заболеваний, которые негативно влияют на целостность кости, включают, не ограничиваясь этим, остеопороз, несовершенный остеогенез, диабет, болезнь Педжета, ревматоидный артрит, анкилозирующий спондилит, множественную миелому, первичный рак кости (например, остеосаркома, саркома Юинга и хондросаркома), рак с метастазами в кости (например, рак молочной железы, рак предстательной железы и рак легкого), диффузный идиопатический гиперостоз скелета, остеомиелит, почечную недостаточность, мышечную дистрофию Дюшенна и талассемию.

Краткое описание фигур

На фиг.1 показано процентное восстановление сигнала для антител, полученных иммунизацией, в анализе репортерного гена HEK-ID1.

На фиг.2 показано процентное восстановление сигнала для антител, полученных из библиотеки, в анализе репортерного гена HEK-ID1.

На фиг.3 приведены результаты анализа репортерного гена HEK-ID1 с титрованием человеческого гремлина (фиг.3А) и мышинового гремлина (фиг.3В), и влияние антитела 7326 (показано как антитело PB376) в восстановлении передачи сигналов с участием BMP.

На фиг.4 показана структурная модель комплекса гремлин-Fab с выделением возможных областей связывания BMP и эпитопа Fab.

На фиг. 5 показано исследование области, лишенной костной

мозоли/костной ткани, во время восстановления перелома на полученных рентгеновских снимках. Область внутри дефекта, которая была лишена ткани, определяли количественно с использованием анализа изображений и затем сравнением контрольной группы и группы, обработанной анти-гремлином 1-антителом. Результаты представлены в виде среднего значения \pm SD для 10 крыс/группе. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$, как измерено U-критерием Манна-Уитни.

На фиг. 6 показано исследование LMB (кость с низким содержанием минералов; новообразованная кость) и HMB (кость с высоким содержанием минералов; зрелая кость) в пределах 3 мм дефекта бедренной кости. Панель А: 3D микро-КТ анализ области дефекта бедренной кости для выявления новообразованной или зрелой кости. Измеряли процент объема кости/объема ткани и сравнивали всех субъектов (в целом) в контрольной группе и группе, обработанной анти-гремлин 1-антителом. Также сравнивали контрольную группу с опытной группой, обработанной анти-гремлин 1-антителом, у животных, разделенных на респондеры с низким уровнем ответа (неполное соединение LR) и респондеры с высоким уровнем ответа (полное соединение HR). Результаты представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$, как измерено U-критерием Манна-Уитни. Панель В: репрезентативная микро-КТ, показывающая 3D изображения объема кости в группах LR и HR в контроле и после обработки анти-гремлин 1-антителом.

На фиг. 7 приведены результаты гистоморфометрического анализа дефекта бедренной кости. Процентное соотношение объема кости/объема ткани (BV/TV (%)), трабекулярное число (Tb.N) и трабекулярное разделение (Tb.Sp) сравнивали между контрольной группой и группой, обработанной анти-гремлин 1-антителом. Результаты представлены в виде среднего значения \pm SD для 10 крыс / группа. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$, как измерено U-критерием Манна-Уитни.

На фиг. 8 показана корреляция 3D микро-КТ анализа и 2D гистоморфометрического анализа общего BV/TV%. Корреляции проводили в обеих группах на LMB (кость с низким содержанием минералов;

новообразованная кость) и НМВ (кость с высоким содержанием минералов; зрелая кость) в пределах 3 мм дефекта бедренной кости и по сравнению с данными оценки 2D гистоморфометрии ($n = 20$). Оценка анализом Пирсона указывает на наличие достоверной корреляции BV/TV% между данными 3D микро-КТ анализа и 2D гистоморфометрического анализа.

Следующие примеры иллюстрируют изобретение.

Примеры

Пример 1. Экспрессия, очистка, рефолдинг и определение структуры белка.

Экспрессия белка и получение телец включения

Усеченную кодирующую последовательность человеческого гремлина-1 (SEQ ID NO: 20), оптимизированную для экспрессии в *E. coli*, клонировали в модифицированный вектор pET32a (Merck Millipore) с использованием BamHI/XhoI, с получением вектора, кодирующего последовательность гремлина с N-концевой меткой 6His-TEV (pET-hGremlin1).

Экспрессированная последовательность:

*MGSSHHHHHHSSGENLYFQGSAMPGEEVLESSQEALHVTERKYLKRDWCKTQPLKQTIHE
EGCNSRTIINRFCYGQCNSFYIPRHIRKEEGSFQSCSFCKPKKFTTMMVTLNCPQLPPTKKKR
VTRVKQCRCSIDL*; SEQ ID NO: 2 (с остатками, не относящимися к остаткам гремлина, меткой 6His-TEV, выделенной курсивом). Нумерация последовательностей основана на UniProt O60565 и SEQ ID NO: 1.

ДНК-плазмиду pET-hGremlin1 использовали для трансформации клеток BL21 (DE3). Единственную колонию, резистентную к ампициллину, собирали с чашки с агаром LB/Amp и использовали для инокуляции 100 мл стартовой культуры LB/Amp. После встряхивания (200 об/мин) в течение 16 ч при 37°C 25 мл стартовой культуры использовали для инокуляции 500 мл среды 2xTY/Amp. Культуру встряхивали (250 об/мин) при 37°C до достижения OD 600, равной 3. Затем к культуре добавляли 20 мл питательной смеси MOPS + глицерин (1M MOPS pH 7,4, 40% глицерин, 0,5% MgSO₄, 0,42% MgCl₂), индуцировали 300 мкМ IPTG и затем инкубировали при 17°C, 180 об/мин в течение 16 ч. Клетки собирали центрифугированием (4000 г в

течение 20 мин при 4°C).

Клеточные осадки после центрифугирования ресуспендировали в буфере для лизиса (PBS pH 7,4, 0,35 мг/мл лизоцима, 10 мкг/мл ДНКазы и 3 мМ MgCl₂) при 4°C, и нерастворимую фракцию собирали центрифугированием при 3500 г в течение 30 мин при 4°C. Отцентрифугированные тельца включения трижды промывали ресуспендированием в промывочном буфере (50 мМ Трис, 500 мМ NaCl, 0,5% Тритон X-100, pH 8,0) с последующим центрифугированием при 21000 г в течение 15 мин. Два дополнительных промывания выполняли с использованием промывочного буфера без тритона X-100.

Солюбилизация

Тельца включения ресуспендировали в денатурирующем буфере (8 М мочевины, 100 мМ Трис, 1 мМ ЭДТА, 10 мМ Na₂S₄O₆ и 100 мМ Na₂SO₃, pH 8,5), перемешивали в течение 16 ч при комнатной температуре и осветляли центрифугированием при 21000 г в течение 15 мин.

Очистка перед рефолдингом

Солюбилизованные тельца включения наносили на колонку с Sephacryl S-200 26/60 (120 мл), уравновешенную буфером из 8 М мочевины, 50 мМ MES, 200 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, pH 6,0. Фракции, содержащие белок гремлин-1, разбавляли 6 М мочевиной, 20 мМ MES, pH 6,0 и загружали на катионообменные колонки HiTrap SP HP и элюировали в градиенте 1 М NaCl 10 объемами колонки (10 CV). Фракции, содержащие очищенный денатурированный белок hGremlin-1, объединяли.

Рефолдинг

Денатурированный очищенный белок гремлин-1 добавляли по каплям в буфер для рефолдинга (50 мМ Трис, pH 8,5, 150 мМ NaCl, 5 мМ GSH и 5 мМ GSSG, 0,5 мМ цистеина, 5 мМ ЭДТА, 0,5 М аргинина) до конечной концентрации 0,1 мг/мл и инкубировали при 4°C при постоянном перемешивании в течение 5 суток. Через 5 суток белок гремлин-1 подвергали диализу против 20 мМ HEPES, 100 мМ NaCl, pH 7,5.

После диализа белок наносили на колонку с гепарином HiTrap и элюировали, используя градиент 0-100% буфера для элюирования с гепарином (20 мМ HEPES, 1 М NaCl, pH 7,5) с использованием 20 CV.

Правильно свернутый белок элюируется при 1 М NaCl, тогда как любой неправильно свернутый белок элюируется при более низких концентрациях соли.

Белок, элюированный при 1 М NaCl, концентрировали и дополнительно очищали на колонке S75 26/60, уравновешенной 20 mM Hepes, pH 7,5, 1 М NaCl.

Белок характеризовали SDS-PAGE (сдвиг в геле), было показано, что он имеет ожидаемую молекулярную массу и правильное расположение дисульфидных связей с использованием жидкостной хроматографии, масс-спектрометрии (LC-MS) и активен в клеточном анализе (репортерный анализ ID1).

Определение структуры гремлина-1

Кристаллы белка гремлина-1 выращивали, используя метод «висячей капли», смешивая раствор гремлина-1 в концентрации 6,6 мг/мл и 0,1 М лимонной кислоты при pH 4, 1 М хлорида лития и 27% полиэтиленгликоля (PEG) 6000 в соотношении 1:1. Перед сбором данных, кристаллы подвергались криопротекции добавлением 20% глицерина в буфер для кристаллизации. Данные дифракции собирали на алмазном источнике света Diamond Light Source и обрабатывали с использованием XDS (Kabsch, Wolfgang (2010) Acta Crystallographica Section D 66, 125-132). Данные дифракционной статистики обобщены в таблице ниже:

Таблица 2

Данные дифракционной статистики

Дифракционная статистика	
Длина волны (Å)	0,97949
Спейсерная группа	C2
Размеры ячейки	a=84,55 Å, b=107,22 Å, c=77,09 Å; $\alpha=90,00^\circ$, $\beta=120,43^\circ$, $\gamma=90,00^\circ$
Диапазон разрешения* (Å)	26,19-2,72 (2,79-2,72)
Полнота (%)	98,5 (99,0)
Множественность	3,4 (3,4)

I/sigma	9,6 (2,0)
Rmerge	0,095 (0,622)
Статистика уточнения	
Диапазон разрешения (Å)	26,19-2,72
R _{cryst}	0,24
R _{free}	0,29
R.m.s.d. связи (Å)**	0,013
R.m.s.d. углы (°)	1,782

* значения в скобках соответствуют оболочке с самым высоким разрешением

**r.m.s.d среднеквадратичное отклонение

Структура гремлина-1 была разрешена посредством молекулярного замещения с использованием Phaser (McCoy et al., J Appl Cryst (2007), 40, 658-674) и модели гремлина-1, доступной из определенных координат комплекса гремлин-1/Fab. Полученная модель гремлина-1 содержала четыре копии мономера гремлина-1, организованные в виде двух димеров. Модельные корректировки делали с использованием Coot (Emsley et al. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography 66 (4), 486-501), и координаты уточняли с помощью Refmac (Murshudov et al REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography. 2011;67(Pt4):355-367). Конечные координаты подтверждали с помощью Molprobity (Chen et al. (2010) MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. Acta Crystallographica D66:12-21). Обобщение статистики модели уточнения приведено в таблице 2 выше.

Пример 2. Остатки на гремлин-1, связывающиеся с BMP

Как обсуждалось выше, гремлин-1 относится к семейству белков-антагонистов костного морфогенного белка (BMP) в подгруппе, известной как семейство DAN. В семействе DAN гремлин-1 разделяет наибольшую гомологию с гремлином-2 (PRDC).

Структура гремлина-1 человека 2,7 Å, разрешенная в примере 1, имеет много признаков, общих с опубликованной структурой гремлина-2 мыши (Nolan et al (2013), Structure, 21, 1417-1429). Общий фолдинг очень похож: две копии гремлина-1 образуют антипараллельный нековалентный димер, расположенный в изгибе. Каждый мономер имеет характерное расположение «палец-запястье-палец» с мотивом цистинового узла в направлении к концу «пальца», противоположном «запястью». Идентичность последовательности между белками составляет от 52% до 67% в последовательности, видимой в двух структурах. Наиболее высоко консервативная область находится на обширной поверхности раздела димера, где все ключевые контактные остатки сохранены на 100%.

Остатки, вовлеченные в связывание BMP 2, 4 и 7 с мышинным гремлином-2 (PRDC) и DAN (NBL1), были идентифицированы с использованием мутагенеза (Nolan et al. (2013), Structure, 21, 1417-1429 и Nolan et al (2014). J. Biol. Chem. 290, 4759-4771). Предсказанный эпитоп связывания BMP включает гидрофобный участок, охватывающий оба мономера на выпуклой поверхности димера. С использованием мутагенеза было идентифицировано шесть остатков; Trp72, Phe96, Tyr98, Phe104, Tyr105 и Phe117 и являются на 100% консервативными в человеческом гремлин-1 (нумерация основана на нумерации последовательности мышинного гремлина-2). Степень гомологии распространяется на расположение боковых цепей, которые принимают одинаковую конформацию в обоих белках.

Нумерация аминокислот, используемая в файле Gremlin PDB, соответствует нумерации в опубликованной структуре мышинного гремлина-2 на основе структурного выравнивания. Это позволяет проводить одинаковое сравнение аминокислот при описании структур. Однако для ясности ключевые остатки, идентифицированные как играющие важную роль в связывании с BMP, показаны ниже с нумерацией на основе файла PDB и файла UniProt с SEQ ID NO: 1 в скобках:

Trp72 (93), Phe96 (117), Tyr98 (119), Phe104 (125), Tyr105 (126) и Phe117 (138).

Как в мышинном гремлин-2, так и в человеческом гремлин-1 гидрофобный связывающий эпитоп BMP частично находится под альфа-спиралью, образованной N-концевыми остатками каждого белка. Была

предложена модель связывания BMP, посредством которой N-конец может изгибаться, обнажая полную поверхность связывания BMP (Nolan et al (2013), Structure, 21, 1417-1429). В настоящем анализе N-концевые остатки удаляли из структур человеческого гремлина-1 и мышинового гремлина-2 перед визуализацией поверхности, для выявления сходства поверхностей, связывающих BMP, на каждой белке.

В литературе описан мутагенез только шести остатков, которые влияют на связывание BMP. Возможно, что фактический эпитоп BMP охватывает большую площадь поверхности, включающую соседние аминокислоты. Выделив все остатки, в пределах 6Å от тех, которые мутировали, на поверхности гремлина-1, обнаружена большая область гремлина-1, на которую потенциально может быть нацелено терапевтическое средство. Этот более обширная область охватывает следующие аминокислоты человеческого гремлина-1:

Asp92-Leu99

Arg116-His130

Ser137-Ser142

Cys176-Cys178

(нумерация основана на нумерации SEQ ID NO: 1)

Сочетая опубликованную информацию с информацией о кристаллической структуре человеческого гремлина-1, были идентифицированы области человеческого гремлина-1, которые предположительно можно рассматривать в качестве потенциального пути для терапевтического вмешательства, блокирующего его взаимодействие с BMP.

Пример 3. Анализ репортерного гена Нек Id1.

Основа

В анализе репортерного гена Нек Id1 используются репортерные клетки клона 12 Нек293-Id1. Эту клеточную линию стабильно трансфектировали транскрипционным фактором Id1. Id1 является транскрипционным фактором в сигнальном пути BMP. Гремлин, как известно, связывается с BMP, предотвращая связывание с их рецепторами, уменьшая сигнал люциферазы из репортерного гена. Следовательно, используя этот репортерный анализ, можно проводить скрининг антител против гремлина и выявить антитела, которые блокируют взаимодействие гремлина с BMP. В этих клетках

наблюдается восстановление сигнала люциферазы, если происходит блокирование этого взаимодействия.

Метод

Клон 12 клеток культивировали в среде DMEM, содержащей 10% FCS, 1× L-глутамин и 1× NEAA. Клетки также культивировали в присутствии гигромицина В (200 мкг/мл) для гарантии того, что клетки не теряют экспрессию гена Id1. Клетки анализировали в DMEM, содержащей 0,5% FCS, 1× L-глутамин и 1× NEAA. Гигромицин В не требуется в течение короткого периода времени, когда клетки находятся в анализе.

Клетки промывали с использованием PBS, снимали с использованием буфера для диссоциации клеток, центрифугировали и подсчитывали перед посевом из расчета 5×10^4 /лунку в 70 мкл (плотность $7,14 \times 10^5$ /мл). Используемые планшеты представляли 96-луночные стерильные, покрытые поли-D-лизином непрозрачные планшеты белого цвета. Клетки помещали в термостат примерно на 3-4 ч для оседания. Гетеродимеры BMP восстанавливали до 200 мкг/мл в 4 мМ HCl. BMP разбавляли до 10 мкг/мл в среде для анализа, используя стеклянный флакон для получения нового рабочего стокового запаса.

В полипропиленовой планшете гремлин-1 разводили 1:2 для получения 8-точечной кривой доза-ответ с максимальной конечной дозой 1 мкг/мл.

Добавляли дополнительный объем 20 мкл среды на лунку и планшеты инкубировали при 37°C в течение 45 мин.

BMP, полученный при 100×, добавляли во все лунки, кроме лунок, содержащих только клетки. Содержимое всех лунок доводили до 60 мкл аналитической средой и инкубировали в течение еще 45 мин при 37°C.

После инкубации 30 мкл образца переносили в лунку планшета для анализа и инкубировали в течение 20-24 ч перед измерением сигнала люминесценции.

Реагент Cell Steady Glo оттаивали заранее при комнатной температуре. Планшеты для анализа охлаждали до комнатной температуры в течение примерно 10-15 мин перед добавлением реагента. Сигнал люциферазы детектировали добавлением реагента Cell Steady Glo (100 мкл) в течение 20 мин на шейкере при комнатной

температуре и измерением люминесценции с использованием протокола определения титра клеток на Synergy 2.

Максимальный сигнал генерировался из лунок, содержащих ВМР, и минимальный сигнал генерировался из лунок, содержащих только клетки.

Результаты

Полноразмерные и усеченные формы гремлина-1 тестировали в анализе репортерного гена Нек-Id1, чтобы подтвердить блокирующую активность против ВМР4/7.

Процент ингибирования в анализе доза-ответ рассчитывали на основе максимальных и минимальных сигналов в анализе и данных, подобранных с использованием 4-параметрической логистической модели. Значение IC₅₀ рассчитывали на точке перегиба кривой.

Таблица 3

Результаты эффективности для полноразмерного гремлина-1 и усеченного гремлина-1 в анализе репортерного гена Нек-Id1

Анализ репортерного гена Нек-Id1	N	Геометрическое среднее (нМ)	95% CI (или диапазон где N=<4)
Полноразмерный гремлин-1	2	1,6	1,3-1,9
Усеченный гремлин-1	2	1,7	1,1-2,5

Заключение

Гремлин-1 был способен ингибировать сигнальный путь ВМР 4/7 в анализе репортерного гена Нек-Id1.

Пример 4. Получение анти-гремлин-1-антитела

Анти-гремлин-1-антитела получали иммунизацией с использованием очищенного гремлина-1, как описано в примере 1, и посредством пэннинга библиотеки. Библиотека была создана на месте в виде наивной человеческой библиотеки с V-областями, амплифицированными из предоставленной крови.

В результате иммунизации было получено 26 различных антител, связывающихся с гремлином-1, из первого раунда иммунизации. Эти

антитела были масштабированы и очищены для тестирования в скрининговых анализах.

25 перекрестно-реактивных антител человека и мыши из библиотеки подвергали пэннингу с использованием рекомбинантного человеческого гремлина от R & D Systems. 10 антител были отобраны для масштабирования и выделены в виде scFv для тестирования в скрининговых анализах.

Пример 5. Скрининг анти-гремлин-1 антител

Антитела подвергали скринингу с использованием анализа репортерного гена *Nek-Id1*, описанного в примере 3, и измерением фосфорилирования SMAD. SMAD 1, 5 и 8 фосфорилируются на сигнальном пути BMP. Следовательно, ингибиторы гремлина-1 повышают фосфорилирование SMAD.

Анализ фосфорилирования SMAD проводили на клетках A549 или на фибробластах легких человека. Уровни фосфорилирования определяли с использованием MSD.

Результаты

В анализе репортерного гена *Nek-Id1* отсутствовали видимые попадания с антителами, полученными в результате иммунизации (с 10-кратным избытком антител, протестированных против гетеродимера BMP4/7). Результаты показаны на фиг. 1.

Напротив, ряд антител, полученных из библиотеки, был способен восстанавливать сигнал в анализе репортерного гена *Nek-Id1* (50-кратный избыток антител с 50% дозой гремлина) (фиг. 2). Из них Ab2416 и Ab2417 содержали высокие уровни эндотоксина. Ab7326 поддерживало блокирующую способность при 10-кратном избытке и 80% ингибировании концентрации гремлина-1.

Дополнительные результаты представлены на фиг. 3А (человеческий гремлин) и 3В (мышиный гремлин). На этих фигурах показано титрование Ab7326 (обозначено как PB376) до 15 нМ. Было показано, что Ab7326 восстанавливает передачу сигналов BMP при блокировании человеческим (IC_{50} 1,3 нМ) или мышиным (IC_{50} 0,2 нМ гремлина). Антитело функционирует в виде человеческого и мышинового IgG1.

Последовательности полноразмерного мышинового и человеческого IgG1 представлены ниже. Для синтеза полноразмерных IgG1 белков

мышь и человека переменные области Ab7326, полученные из библиотеки, повторно клонировали в векторы, содержащие соответствующие константные домены антител.

Поскольку Ab7326 было получено из наивной человеческой библиотеки, где Ab клонировали в виде scFvs, для повторного клонирования переменных областей 7326 в виде полноразмерных Ab или Fab, было необходимо провести ПЦР-амплификацию VH и VK с использованием пулов праймеров/вырожденных праймеров. Затем продукты, амплифицированные ПЦР, расщепляли и клонировали одновременно в векторы мыши и человека. Поскольку VH и VK были амплифицированы пулами праймеров/вырожденных праймеров, то получали две формы продуктов, отличающихся одним аминокислотным остатком, полученным в результате несколько различного отжига праймеров во время процесса ПЦР.

Две варианты формы переменной области тяжелой цепи отличались одной аминокислотой в положении 6, и две варианты формы переменной области легкой цепи отличались одной аминокислотой в положении 7, как показано ниже:

- вариант 1 переменной области тяжелой цепи содержит глутаминовую кислоту (E) в положении 6;
- вариант 2 переменной области тяжелой цепи содержит глутамин (Q) в положении 6;
- вариант 1 переменной области легкой цепи имеет серин (S) в положении 7;
- вариант 2 переменной области легкой цепи содержит треонин (T) в положении 7.

Мышиный полноразмерный IgG1 - вариант 1 тяжелой цепи (SEQ ID NO: 14)

QVQLVESGAE VKKPGATVKI SCKVSGYTF**T** **DYYMH**WVQQA PGKGLEWMGL **VDPEDGETIY**
AEKFQGRVTI TADTSTDYAY MELSSLRSED TAVYYCAT**DA** **RGSGSYYPNH** **FDYWGQ**TLV
TVSSAKTTPP SVYPLAPGSA AQTNSMVTLG CLVKGYFPEP VTVTWNSGSL SSGVHTFPAV
LQSDLYTLSS SVTVPSSWTP SETVTCNVAH PASSTKVDK IVPRDCGCKP CICTVPEVSS
VFIFPPKPKD VLTITLTPKV TCVVVDISKD DPEVQFSWFV DDVEVHTAQT QPREEQFNST
FRSVSELPIM HQDWLNGKEF KCRVNSAAFP APIEKTISK TGRPKAPQVY TIPPPKEOMA
KDKVSLTCMI TDFFPEDITV EWQWNGQPAE NYKNTQPI MD TDGSYFVYSK LNVOKSNWEA
GNTFTCSVLH EGLHNNHTEK SLSHSPGK

Мышиный полноразмерный IgG1 - вариант 1 тяжелой цепи (SEQ ID NO: 15)

DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSVL **YSSNNKNYLA** WYQQKPGQPP KLLIYWASTR
ESGVPDRFSG SSGTDFTLT INSLQAEDVA VYFCQQYYDT **PTFGQGRLE** IKRTDAAPTV
SIFPPSSEQL TSGGASVCF LNNFYPKDIN VKWKIDGSER QNGVLNSWTD QDSKDSTYSM
SSTLTTLTKDE YERHNSYTCE ATHKTSTSPI VKSFNRNEC

Мышиный полноразмерный IgG1 - вариант 2 тяжелой цепи (SEQ ID NO: 28)

QVQLVQSGAE VKKPGATVKI SCKVSGYTFT **DYYMHWVQQA** PGKGLEWMGL **VDPEDGETIY**
AEKFQGRVTI TADTSTDYAY MELSSLRSED TAVYYCATDA **RSGGSYYPNH** **FDYWGQGLTV**
TVSSAKTTPP SVYPLAPGSA AQTNSMVTLG CLVKGYFPEP VTVTWNHSGSL SSGVHTFPAV
LQSDLYTLSS SVTVPSSTWP SETVTCNVAH PASSTKVDK IVPRDCGCKP CICTVPEVSS
VFIFPPKPKD VLTITLTPKV TCVVVDISKD DPEVQFSWFV DDDEVHTAQT QPREEQFNST
FRSVSELPIM HQDWLNGKEF KCRVNSAAFP APIEKTISKI KGRPKAPQVY TIPPPKEQMA
KDKVSLTCMI TDFFPEDITV EWQWNGQPAE NYKNTQPIMD TDGSYFVYSK LNVQKSNWEA
GNTFTCSVLH EGLHNHHTTEK SLSHSPGK

Мышиный полноразмерный IgG1 - вариант 2 тяжелой цепи (SEQ ID NO: 29)

DIVMTQTPDS LAVSLGERAT INCKSSQSVL **YSSNNKNYLA** WYQQKPGQPP KLLIYWASTR
ESGVPDRFSG SSGTDFTLT INSLQAEDVA VYFCQQYYDT **PTFGQGRLE** IKRTDAAPTV
SIFPPSSEQL TSGGASVCF LNNFYPKDIN VKWKIDGSER QNGVLNSWTD QDSKDSTYSM
SSTLTTLTKDE YERHNSYTCE ATHKTSTSPI VKSFNRNEC

Человеческий полноразмерный IgG1 - вариант 1 тяжелой цепи (SEQ ID NO: 30)

QVQLVESGAE VKKPGATVKI SCKVSGYTFT **DYYMHWVQQA** PGKGLEWMGL
VDPEDGETIY **AEKFQGRVTI** TADTSTDYAY MELSSLRSED TAVYYCATDA
RSGGSYYPNH **FDYWGQGLTV** TVSSASTKGP SVFPLAPSSK STSGGTAALG
CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV LOSSGLYSLS SVTVPSSSL
GTQTYICNVN HKPSNTKVDK KVEPKSCDKT HTCPCPAPPE LLGGPSVFLF
PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE
EQYNSTYRVV SVLTVLHODW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP
REPOVYTLPP SRDELTKNOV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGOPENNYKT
TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK

Человеческий полноразмерный IgG1 - вариант 1 легкой цепи (SEQ ID NO: 31)

DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSVL **YSSNNKNYLA** WYQQKPGQPP

KLLIYWASTR **ESGVPDRFSG** **SGSGTDFTLT** **INSLQAEDVA** **VYFCQQYYDT**
PTFGQGTRLE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK
VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSTYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE
VTHOGLSSPV TKSFNRGEC

Человеческий полноразмерный IgG1 - вариант 2 тяжелой цепи
(SEQ ID NO: 16)

QVQLVQSGAE VKKPGATVKI SCKVSGYTFT **DYYMHWVQQA** PGKGLEWMGL
VDPEDGETIY **AEKFQGRVTI** TADTSTDYAY MELSSLRSED TAVYYCATDA
RSGSYYPNH **FDYWGQGLV** TVSSASTKGP SVFPLAPSSK STSGGTAALG
CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV LOSSGLYSL SVTVPSSSL
GTQTYICNVN HKPSNTKVDK KVEPKSCDKT HTCPCPAPPE LLGGPSVFLF
PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE
EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP
REPQVYTLPP SRDELTKNOV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT
TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQOGNVF SCSVMHEALH NHYTQKLSLS
SPGK

Человеческий полноразмерный IgG1 - вариант 2 легкой цепи (SEQ ID NO: 17)

DIVMTQTPDS LAVSLGERAT INCKSSQSVL **YSSNNKNYLA** WYQOKPGQPP
 KLLIYWASTR **ESGVPDRFSG** **SGSGTDFTLT** **INSLQAEDVA** **VYFCQQYYDT**
PTFGQGTRLE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK
VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSTYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE
VTHOGLSSPV TKSFNRGEC

CDR антител определяли с использованием метода Kabat (выделены жирным шрифтом в приведенных выше последовательностях). Дополнительные остатки HCDR1 с использованием определения по методу Chothia выделены курсивом. Последовательности константных областей подчеркнуты.

Восстановление передачи сигналов p-SMAD под действием антигемблин 1-антител показано в таблице 4 ниже.

Таблица 4

Восстановление передачи сигналов p-SMAD

2417	2418	2419	2481	2482	2483	2484	7326	8427	
------	------	------	------	------	------	------	------	------	--

ВМР 2 50 нг/мл	109,1% +/- 2,8%	58,2% +/- 1,9%	32,6% +/- 1,4%	40,4% +/- 0,6%	35,3% +/- 0,8%	43,1% +/- 2,1%	104,0% +/- 2,7%	107,2% +/- 3,5%	51,3% +/- 1,4%
ВМР 4 25 нг/мл	109,6% +/- 3,0%	71,3% +/- 3,1%	31,7% +/- 1,2%	60,1% +/- 2,2%	54,4% +/- 1,3%	72,5% +/- 2,1%	105,2% +/- 3,3%	110,0% +/- 3,8%	78,2% +/- 2,5%
ВМР 7 200 нг/мл	111,5% +/- 3,8%	99,5% +/- 3,2%	53,8% +/- 3,4%	64,4% +/- 1,3%	52,3% +/- 1,1%	66,2% +/- 1,2%	105,2% +/- 4,3%	108,0% +/- 3,2%	72,6% +/- 2,5%
ВМР-2/7 50 нг/мл	119,3% +/- 2,6%	78,6% +/- 3,6%	50,8% +/- 2,7%	53,7% +/- 3,1%	47,6% +/- 1,5%	56,1% +/- 2,5%	120,4% +/- 4,4%	128,5% +/- 2,9%	62,8% +/- 2,5%
ВМР4/7 50 нг/мл	113,7% +/- 3,1%	78,0% +/- 4,0%	61,4% +/- 4,0%	48,3% +/- 2,1%	41,7% +/- 1,7%	50,8% +/- 1,7%	112,4% +/- 2,5%	127,0% +/- 3,1%	63,3% +/- 2,1%

Результаты представлены в виде процента от фосфорилирования SMAD одним ВМР (контроль с ВМР). Эксперименты проводили с использованием фибробластов легких от пациентов с идиопатическим легочным фиброзом. Антитела rhGremlin-1 и анти-гремлин-1-антитела предварительно инкубировали в течение 45 мин при комнатной температуре. Затем к клеткам в течение 30 мин добавляли антитела rhGremlin-1 и анти-гремлин-1-антитела с ВМР.

Ниже в таблице 5 показаны дополнительные результаты анализа фосфорилирования SMAD, где исследовали вытеснение ВМР-2 или ВМР4/7 из комплексов гремлин-1-ВМР антителами против гремлина-1. Опыты снова проводили с использованием фибробластов легких от пациентов с идиопатическим легочным фиброзом. rhВМР-2 или rhВМР 4/7 предварительно инкубировали с rhGremlin-1 в течение 1 ч при комнатной температуре. Комплексы ВМР-2- или ВМР4/7-гремлин-1 инкубировали с различными концентрациями анти-гремлин 1-антител в течение ночи при 4°C. Концентрации антител представляют собой конечную концентрацию в планшете.

Таблица 5

Вытеснение ВМР-2 или ВМР4/7 из комплексов гремлин-1-ВМР анти-гремлин-1-антителами

		81,3 мкг/мл	40,6 мкг/мл	20,3 мкг/мл	10,2 мкг/мл	5,1 мкг/мл	2,55 мкг/мл	1,27 мкг/мл	0,63 мкг/мл
2484	ВМР 2 50 нг/мл	100,3% +/-3,5%	98,8% +/-2,7%	97,0% +/-2,9%	93,5% +/-2,6%	86,4% +/-2,0%	79,9% +/-1,9%	66,5% +/-2,8%	54,8% +/-0,3%
2484	ВМР4/7 50 нг/мл	136,4% +/-4,2%	133,2% +/-1,0%	121,4% +/-1,4%	108,1% +/-4,9%	86,6% +/-4,4%	74,7% +/-2,2%	65,8% +/-0,6%	60,7% +/-1,5%
7326	ВМР 2 50 нг/мл	103,7% +/-1,1%	101,5% +/-2,4%	99,4% +/-3,8%	103,8% +/-2,4%	100,3% +/-2,2%	103,2% +/-4,3%	102,8% +/-2,8%	97,0% +/-2,9%
7326	ВМР4/7 50 нг/мл	133,7% +/-0,8%	132,3% +/-1,8%	130,3% +/-4,2%	125,6% +/-10,0%	121,4% +/-4,2%	120,9% +/-3,3%	111,1% +/-2,3%	102,0% +/-4,5%

Результаты, представленные в таблице 5, демонстрируют, что Ab7326 может вытеснять уже комплексированный BMP-2 или BMP4/7 из комплексов гремлин-1-BMP. Ab7326 может достигать этого вытеснения в значительно более низких концентрациях, чем антитело сравнения 2484. Это свидетельствует о том, что Ab7326 является аллостерическим ингибитором, что согласуется с открытием заявителей о том, что сайт связывания для Ab7326 находится дистальнее от известных областей связывания BMP на гремлин-1. Таким образом, Ab7326 может получить доступ к аллостерическому сайту связывания, даже когда BMP образует комплекс с гремлином-1, что приводит к значительному повышению ингибирования активности гремлина.

Пример 6. Получение кристаллической структуры гремлина-1 в комплексе с Fab 7326

Кристаллическая структура человеческого гремлина-1 в комплексе с Ab7326 Fab была получена с разрешением 2,1 Å. Последовательности Fab показаны ниже:

Тяжелая цепь: SEQ ID NO: 18

QVQLVESGAEVKKPGATVKISKVSGYTFDDYYMHWVQQAPGKGLEWMGLVDPEDGETIY
AEKFQGRVTITADTSTDYAMELSSLRSEDTAVYYCATDARGSGSYYPNHFYWGQGLTVTVSS
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSC

Легкая цепь: SEQ ID NO: 19

DIVMTQSPDLSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNKNYLAQYQQKPGQPPKLLIYWASTR
ESGVPDRFSGSGSTDEFTLTINSLQAEDVAVYFCQQYYDTPTFGQGRLEIKRTVAAPSVFIFP
PSDEQLKSGTASVCLLNNFYPRKAVQWVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK
ADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

Затем использовали CCP4 программное обеспечение NCONT для идентификации всех контактных остатков при 4 Å между гремлином-1 и Fab. Были идентифицированы следующие остатки: Ile131, Lys147, Lys148, Phe149, Thr150, Thr151, Arg169, Lys174 и Gln175 (нумерация основана на последовательности UniProt SEQ ID NO: 1 (нумерованы как Ile110, Lys126, Lys127, Phe128, Phe128, Arg148, Lys153 и Gln154 в структурном файле, который соответствует нумерации мышинового гремлина-2)).

На фиг. 4 показаны структурные модели комплекса гремлин-Fab,

где остатки эпитопа Fab показаны относительно областей связывания BMR.

Ab7326 представляет ингибирующее антитело, которое функционирует аллостерически, т. е. оно связывается с областями связывания BMR.

Пример 7. Измерение аффинности связывания антитела против гремлина-1 Ab7326 с гремлином-1.

Метод

Аффинность анти-гремлин mIgG к человеческому гремлину-1 определяли с помощью анализа бимолекулярного взаимодействия с использованием технологии поверхностного плазмонного резонанса (SPR) на системе Biacore T200, GE Healthcare Bio-Sciences AB. Анти-гремлин mIgG захватывалось иммобилизованным на поверхности анти-мышинным Fc, и гремлин-1 титровали поверх захваченного mIgG. Захватывающий лиганд (Affinipure F(ab')₂-фрагмент козьего антимышиного IgG, специфичный для Fc-фрагмента, 115-006-071, Jackson ImmunoResearch Inc.) иммобилизовали при 50 мкг/мл в 10 мМ NaAc, pH 5,0 в проточной ячейке 2 сенсорного чипа CM4 с помощью реакции сочетания аминов с использованием 600-сек инъекций активации и дезактивации до уровня ~ 1600 единиц отклика (RU). В качестве рабочего буфера использовали буфер HBS-EP+ (0,01 М HEPES, pH 7,4, 0,15 М NaCl, 3 мМ ЭДТА, 0,05% поверхностно-активное вещество P20) со скоростью потока 10 мкл/мин. Контрольная поверхность была подготовлена в проточной ячейке 1 активацией и деактивацией поверхности, как для проточной ячейки 2, но без захватывающего лиганда.

Буфер для анализа представлял HBS-EP+ плюс 150 мМ NaCl с получением конечной концентрации NaCl 300 мМ плюс 1% CMD40. 60-сек инъекцию анти-гремлин mIgG (при 5 мкг/мл в рабочем буфере) пропускали через проточные ячейки 1 и 2 для получения уровня захвата примерно 100 RU на иммобилизованном на поверхности анти-мышинном IgG, Fc. Рекомбинантный человеческий гремлин-1 титровали в рабочем буфере от 5 нМ (с использованием 2-кратных разведений) и инъецировали через проточные ячейки 1 и 2 со скоростью потока 30 мкл/мин в течение 3 мин с последующей 5-мин фазой диссоциации. Также включали контроль, представляющий только буфер. Поверхность

регенерировали со скоростью потока 10 мкл/мин путем 60-сек инъецированием 50 мМ HCl, 30-сек инъецированием 5 мМ NaOH и 30-сек инъецированием 50 мМ HCl.

Кинетические данные определяли с использованием оценочного программного обеспечения Biacore T200.

Измерения аффинности проводили при 25°C.

Результаты

Было установлено, что аффинность связывания, представленная в виде среднего значения K_D для 5 определений, составляла ниже 100 пМ.

Пример 8. Ингибирование активности грелина-1 ускоряет заживление и сращение на модели восстановления перелома кости *in vivo*

8.1. Материалы и методы

Крысиная модель перелома и введение препарата

Модели сегментарного дефекта длинных костей широко использовались для исследования заживления и регенерации кости (Sato et al; 2014). В настоящем исследовании 3-мм дефект бедренной кости воспроизводили у 10-недельных самцов крыс и фиксировали с использованием пластины с 8-отверстиями РЕЕК (RIS. 602.105, RISystem, Швейцария). Пластины прикрепляли к кости с помощью зажимов в середине диафиза, перед тем как кость была просверлена и зафиксирована винтами. Создавали 3 мм зазор разрушения с использованием пилы Gigly 0,44 мм. Размер/консистенцию/фиксацию дефекта тщательно контролировали с помощью рентгеновского визуализирования с использованием Faxitron (MX-20-DC5, Faxitron Bioptics LLC, США), эту временную точку определяли как сутки 0.

Еженедельное введение начинали на сутки 1 в течение 8 недель, как указано в таблице 1.

Затем получали рентгеновские снимки в течение прижизненной стадии исследования на сутки 11, 25, 39 и 57 для того, чтобы оценить образование костной мозоли и ход заживления. Анализ изображений Definiens использовали для количественной оценки площади дефекта, лишённого костной ткани, на полученных рентгеновских снимках.

Группы обработки

Группа	Номер животного	Обработка	Доза	Схема введения	Время
1	10	Растворитель	Растворитель: 1 мл, п/к	один раз/неделю	В целом 57 суток
2	10	анти-гремлин-1-антитело	30 мг/кг, 1 мл, п/к	один раз/неделю	

Микро-КТ анализ заживления переломов

Бедренную кость (переломанная сторона) сканировали с разрешением 17,2 мкм с использованием микро-КТ (SkyScan 1076). Была получена область примерно в 15 мм от мозоли с переломом в центре. Сканы реконструировали с использованием программного обеспечения Skyscan NRECON (1.7.10), и затем реконструированные срезы дополнительно сегментировали, чтобы исключить фиксаторные штифты в определенной области 3 мм, рассчитанной по средней точке дефекта перелома бедра. Гистоморфометрический анализ костной мозоли перелома в 3D выполняли с помощью программного обеспечения SkyScan (v. 1.13.1). Определяли среднюю точку в пределах 3 мм дефекта перелома бедренной кости, и срезы на 1,5 мм дистальнее и проксимальнее средней точки были сегментированы для каждой измеренной конечности. Затем проводили бинаризацию реконструированных наборов данных и сегментацию после двух определенных порогов, один для определения мозоли с низкой минерализацией (таким образом, количественно определения новообразованной кости) и другой для определения зрелой кости. Дальнейшую сегментацию этих данных проводили на бедренной кости животных, отнесенных к группе с низким уровнем ответа, на основе удовлетворения критериев неполного преодоления дефекта бедренной кости, или показателей с высоким уровнем ответа, проявляющих соединение в месте перелома.

Гистоморфометрический анализ перелома

Бедренную кость фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине в течение 24 ч, дегидратировали и помещали в метилметакрилат (ММА) при низкой температуре. Срезы толщиной 50 мкм окрашивали толуидиновым синим для количественной оценки

костных элементов дефекта заживающего зазора. Гистоморфометрические показатели определяли на губчатой кости в месте дефекта перелома. Измерения выполняли с помощью анализа изображений.

Статистический анализ

Результаты представлены в виде средних значений \pm SD. Статистический анализ проводили с использованием двустороннего U-критерия Манна-Уитни с программным обеспечением GraphPad Prism, если не указано иное.

8.2 Результаты

Анализ рентгеновских снимков, полученных на прижизненной стадии исследования, показал, что анти-гремлин-1-антитело ускорило заживление перелома у животных, где статистически значимые различия между контрольной и обработанной группами проявлялись через 25 суток ($P < 0,05$). Этот эффект был очевиден для оставшейся части исследования (фиг. 5).

Микро-СТ анализ конечных образцов показал, что обработка анти-гремлин 1-антителом (30 мг/кг/раз в неделю) приводила к увеличению новообразованной кости в мозоли на месте перелома ($P = 0,06$).

Частота возникновения несращенных переломов на этой модели без какого-либо лечебного вмешательства составляет примерно 60% (Sato et al; 2014). Для проверки того, насколько ингибирование гремлина-1 снижало частоту несращения, животных разделяли на респондеров с низким ответом (LR) и респондеров с высоким ответом (HR). Ингибирование гремлина-1 приводило к достоверному увеличению процентного соотношения объема кости/объема ткани (BV/TV%) в пределах LMB (кость с низким содержанием минералов; новообразованная кость) ($P < 0,01$) и HMB (кость с высоким содержанием минералов; зрелая кость) ($P < 0,01$) в группе респондеров с низким ответом по сравнению с контрольной группой, что свидетельствует о прогрессирующем восстановлении когорты, которая может образовывать несращение.

Кроме того, имела место тенденция (незначительная) к увеличению LMB и HMB BV/TV% в группе с высоким уровнем ответа на обработку анти-гремлин 1-антителом (фиг. 6А, репрезентативные

изображения LR и HR показаны на фиг. 6B) ,

Двумерный гистоморфометрический анализ параметров кости выполняли на гистологических срезах места перелома (фиг.7). Обработка анти-гремлин 1-антителом достоверно увеличивала процентное соотношение объема кости/объема ткани (BV/TV%) ($P < 0,05$) по сравнению с контролем. Анти-гремлин 1-антитело достоверно увеличивало трабекулярное число (Tb.N) ($P < 0,001$) и достоверно уменьшало трабекулярное разделение (Tb.Sp) ($P < 0,01$), что указывает на увеличение трабекулярной кости в результате обработки анти-гремлин 1-антителом.

Проводили корреляции между результатами двумерного гистоморфометрического анализа и трехмерного микро-КТ анализа сравнением групп LMB и HMB, сегментированных в анализе микро-КТ, и двумерном гистоморфометрическом анализе срезов перелома (фиг. 8). Сравнения, измеренные по корреляции Пирсона, выявили положительную и значимую корреляцию между гистоморфометрией и микро-КТ анализом в группах LMB ($P < 0,0001$) и HMB ($P < 0,0001$), что подтверждает достоверность данных из каждого ряда данных.

8.3. Вывод

Ингибирование активности гремлина-1 с использованием нейтрализующего анти-гремлин 1-антитела приводило к ускоренному восстановлению перелома, при этом статистически значимые различия между контрольной и обработанной группами проявлялись через 25 суток (3 дозы антитела). Кроме того, конечный анализ места перелома показал усиленное образование костной ткани у животных с низким уровнем ответа, у которых в противном случае могло бы образовываться несращение. Следовательно, ингибирование активности гремлина-1 является многообещающей терапией для профилактики или лечения несращенных переломов и может иметь особое значение для лечения переломов, склонных к несращению, например большеберцовой кости, дистального радиуса, шейки бедра и ладьевидной кости.

Список последовательностей

SEQ ID NO: 1 (человеческий гремлин-1; Uniprot ID: O60565)

MSRTAYTVGALLLLLGTLLPAAEGKKKGSQGAIPPPDKAQHNDSEQTQSPQQPGSRNRGR
GQGRGTAMPGEEVLESSQEALHVTERRKYLKRDWCKTQPLKQTIHEEGCNSRTIINRFCYGCNS

FYIPRHIRKEEGSFQSCSFCKPKKFTTMMVTLNCPQLPPTKKKRVTRVKQCRCSIDL

SEQ ID NO: 2 (человеческий усеченный гремлин-1, использованный в кристаллографии с N-концевой меткой)

MGSSHHHHHSSGENLYFQGSAMPGEEVLESSQALHVTERKYLKRDWCKTQPLKQTIHE
EGCNSRTIINRFYCYQCNSFYIPRHIRKEEGSFQSCSFCKPKKFTTMMVTLNCPQLPPTKKKRVTRVKQCRCSIDL

SEQ ID NO: 3 (Ab7326 HCDR1 объединенная система нумерации по Kabat & Chothia)

GYTFTDYMH

SEQ ID NO: 4 (Ab7326 HCDR1 Kabat)

DYYMH

SEQ ID NO: 5 (Ab7326 HCDR2 Kabat)

LVDPEGETIYAEKFQG

SEQ ID NO: 6 (Ab7326 HCDR3 Kabat)

DARGSGSYYPNHFDY

SEQ ID NO: 7 (Ab7326 LCDR1 Kabat)

KSSQSVLYSSNNKNYLA

SEQ ID NO: 8 (Ab7326 LCDR2 Kabat)

WASTRES

SEQ ID NO: 9 (Ab7326 LCDR3 Kabat)

QQYYDTPT

SEQ ID NO: 10 (вариант 1 варибельной области тяжелой цепи Ab7326)

QVQLVESGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTDYMHVWVQQAPGKGLEWMGLVDPEGETIY
AEKFQGRVTITADTSTDYAYMELSSLRSEDTAVYYCATDARGSGSYYPNHFDYWGQGLTLTVSS

SEQ ID NO: 11 (вариант 1 варибельной области легкой цепи Ab7326)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTR
ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTINSLQAEDVAVYFCQQYYDTPTFGQGRLEIK

SEQ ID NO: 12 (вариант 2 варибельной области тяжелой цепи Ab7326)

QVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTDYMHVWVQQAPGKGLEWMGLVDPEGETIY
AEKFQGRVTITADTSTDYAYMELSSLRSEDTAVYYCATDARGSGSYYPNHFDYWGQGLTLTVSS

SEQ ID NO: 13 (вариант 2 варибельной области легкой цепи Ab7326)

DIVMTQTPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTR

ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTINSLQAEDVAVYFCQQYYDTPTFGQGRLEIK

SEQ ID NO: 14 (вариант 1 тяжелой цепи мышиноного полноразмерного IgG1 1)

QVQLVESGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTDYMHVWVQQAPGKGLEWMGLVDPEDGETIY
AEKFQGRVTITADTSTDYAYMELSSLRSEDVAVYYCATDARGSGSYYPNHFDYWGQGLTVTVSS
AKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTL
SSSVTVPSSTWVSETVTCNVAHPASSTKVDKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFI FPPKPKDVL
TITLTPKVTVCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLN
GKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTI PPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITV
EWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLVNQQSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTKSLSH
SPGK

SEQ ID NO: 15 (вариант 1 легкой цепи мышиноного полноразмерного IgG1 1)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTR
ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTINSLQAEDVAVYFCQQYYDTPTFGQGRLEIKRTDAAPTIVSIFP
PSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSEKQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTLTK
DEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC

SEQ ID NO: 16 (вариант 2 тяжелой цепи человеческого полноразмерного IgG1)

QVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTDYMHVWVQQAPGKGLEWMGLVDPEDGETIY
AEKFQGRVTITADTSTDYAYMELSSLRSEDVAVYYCATDARGSGSYYPNHFDYWGQGLTVTVSS
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPP
KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYT
QKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 17 (вариант 2 легкой цепи человеческого полноразмерного IgG1)

DIVMTQTPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTR
ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTINSLQAEDVAVYFCQQYYDTPTFGQGRLEIKRTVAAPSVFI FFP
PSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYLSSTLTLTK
ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 18 (вариант 1 тяжелой цепи Fab)

QVQLVESGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTDYMHVWVQQAPGKGLEWMGLVDPEDGETIY
AEKFQGRVTITADTSTDYAYMELSSLRSEDVAVYYCATDARGSGSYYPNHFDYWGQGLTVTVSS

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSC

SEQ ID NO: 19 (вариант 1 легкой цепи Fab)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTR
ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTINSLQAEDVAVYFCQQYYDTPTFGQGRLEIKRTVAAPSVFIFP
PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSK
ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 20 (человеческий усеченный гремлин-1, использованный в кристаллографии без N-концевой метки)

AMPGEEVLESSQEQALHVTERRKYLKRDWCKTQPLKQTIHEEGCNSRTIINRFCYGCNSFY
IPRHIRKEEGSFQSCSFCKPKKFTTMMVTLNCPQLPPTKKKRVTRVKQCRCSIDL

SEQ ID NO: 21 (последовательность зрелого гремлина-1 SEQ ID NO: 1 без сигнального пептида из аминокислот 1-21)

KKKGSQGAIPPPDKAQHNDSEQTQSPQQPSRNRGRGQGRGTAMPGEEVLESSQEQALHVT
ERKYLKRDWCKTQPLKQTIHEEGCNSRTIINRFCYGCNSFYIPRHIRKEEGSFQSCSFCKPKK
FTTMMVTLNCPQLPPTKKKRVTRVKQCRCSIDL

SEQ ID NO: 22 (вариант 1 тяжелой цепи человеческого IgG4P)

QVQLVESGAEVKKPGATVKISCKVSGYFTFDYMHVWVQAPGKGLEWMGLVDPEDGETIY
AEKFQGRVTITADTSTDYAYMELSSLRSEDTAVYYCATDARGSGSYYPNHFDYWGQGLTLTVSS
ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHNKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNQKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS
LSLSLGK

SEQ ID NO: 23 (вариант 1 легкой цепи человеческого IgG4P)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTR
ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTINSLQAEDVAVYFCQQYYDTPTFGQGRLEIKRTVAAPSVFIFP
PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSK
ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 24 (вариант 1 ДНК тяжелой цепи человеческого IgG1)

caagtgaactggtggaatccggggccgaagtgaaaagcccggagccactgtgaagatc
tcttgcaagtgctccggctacaccttcaccgactattacatgcactgggtccagcaggcacctg
ggaagggccttgagtggatgggtctggtcgatcccgaggacggcgaaactatctacgccgagaa
gttccagggtcgcgtcaccatcaccgcccgaacttccaccgacaccgctacatggagctgtcc
agcttgagggtccgaggacacagccgtgtactactgcccacggatgctcgggggaagcggcagct

actaccggaaccacttcgactactggggacagggcactctcgtgactgtctcgagcgcttctac
aaagggcccctccgtgttcccgctcgtccatcatcgaagtctaccagcggaggcactgcggt
ctcggttgcctcgtgaaggactacttcccggagccggtgaccgtgtcgtggaacagcggagccc
tgaccagcgggggtgcacaccttccggccgtcttgcaagcagcggccttactccctgtcatc
agtggtgactgtcccgtccagctcattgggaacccaaacctacatctgcaatgtgaatcacaaa
cctagcaacaccaagggttgacaagaaagtgcagcccaaactcgtgtgacaagactcacacttgtc
cgccgtgcccggcaccggaactgctgggaggtcccagcgtctttctgttccctcaaagccgaa
agacacgctgatgatctcccgcaccccggaggtcacttgcgtgggtcgtggacgtgtcacatgag
gaccagaggtgaagttcaattggtacgtggatggcgtcgaagtcacaaatgccccaaactaagc
ccagagaagaacagtacaattcgacctaccgctcgtgtccgtgctcacgggtgttgcatcagga
ttggctgaacgggaaggaatacaagtgc aaagtgtccaacaaggcgtgccggcaccgatcgag
aaaactatctcaaagcgaagggacagcctagggaaactcaagtctacacgctgccaccatcac
gggatgaactgactaagaatcaagtctcactgacttgtctgggtgaaggggttttacctagcga
cattgccgtggagtggaatccaacggccagccagagaacaactacaagactaccctccagtg
ctcactcggatggatcgttcttcttactcgaagctcaccgtggataagtcccgggtggcagc
agggaaacgtgttctcctgctcgggtgatgcatgaagccctccataaccactatacccaaaagtc
gctgtccctgtcgcgggaaag

SEQ ID NO: 25 (вариант 1 ДНК легкой цепи человеческого IgG1)

gacattgtgatgaccagtcccccgattcgttgcggtgtccctgggagaacgggcccacc
attaactgcaagagctcacagtcctgtattcatcgaacaacaagaattacctcgatggt
atcagcagaagcctggacagcctcccaagctgctcatctactgggctagcaccscgcaatccgg
ggtgccggatagattctccggatcgggttcgggcaactgacttactctgactatcaactcactg
caagccgaggatgtcgcggtgtacttctgtcagcagtaactacgacaccccgaccttggacaag
gcaccagactggagattaagcgtacggtggccgctccctccgtgttcatcttcccaccctccga
cgagcagctgaagtcggcaccgctccgtcgtgtgctgctgaacaacttctaccccgcgag
gccaaagggtgcagtggaagggtggacaacgccctgcagtcgggcaactcccaggaatccgtcaccg
agcaggactccaaggacagcacctactccctgtcctccaccctgaccctgtccaaggccgacta
cgagaagcacaagggtgtacgcctgcgaagtgaccsaccagggcctgtccagccccgtgaccaag
tccttcaaccggggcgagtgc

SEQ ID NO: 26 (вариант 1 ДНК тяжелой цепи человеческого IgG4P)

caagtgc aactggtggaatccggggccgaagtgaaaaagcccggagccactgtgaagatc
tcttgcaagtgctccggctacaccttaccgactattacatgcaactgggtccagcaggcacctg
ggaagggccttgagtggatgggtctggtc gatcccagggacgggcgaaactatctacgccgagaa
gttccagggctcgcgtcaccatcaccgcccgaacttccaccgacaccgctacatggagctgtcc
agcttgagggtccgaggacacagccgtgtactactgcgccacggatgctcggggaagcggcagct
actaccggaaccacttcgactactggggacagggcactctcgtgactgtctcgagcgcttctac

aaagggcccctccgtggtccctctggccccttgctcccgggtccacctccgagttaccgcccgt
ctgggctgcttggcaaggactacttccccgagcccgtgacagtgctctggaactctggcgccc
tgacctccggcgtgcacaccttccctgccgtgctgcagtcctccggcctgtactccctgtcctc
cgtcgtgacctgcccctcctccagcctggggaccaagacctacacctgtaacgtggaccacaag
ccctccaacaccaaggtggacaagcgggtggaatctaagtacggccctccctgccccccctgcc
ctgcccctgaatttctgggcgacacctccgtggtcctgttcccccaagcccaaggacaccct
gatgatctcccggacccccgaagtgacctgctggtggtggacgtgtcccaggaagatcccgag
gtccagttcaattggtacgtggacggcgtggaagtgcacaatgccaagaccaagcccagagagg
aacagttcaactccacctaccgggtggtgtccgtgctgacctgctgcaccaggactggctgaa
cggcaaagagtacaagtgcaaggtgtccaacaagggcctgccctccagcatcgaaaagaccatc
tccaaggccaagggccagccccgcgagccccaggtgtacacctgccccctagccaggaagaga
tgaccaagaaccaggtgtccctgacctgtctggtcaagggcttctaccctccgacattgccgt
ggaatgggagttcaacggccagcccagagaacaactacaagaccacccccctgtgctggacagc
gacggctccttcttctgactctcggctgacctggacaagtcccgggtggcaggaaggcaacg
tcttctcctgctccgtgatgcacgagggcctgcacaaccactacaccagaagtcctgtcct
gagcctgggcaag

SEQ ID NO: 27 (вариант 1 ДНК легкой цепи человеческого IgG4P)

gacattgtgatgaccsagttccccgattcgttgcgggtgtccctgggagaacggggccacc
attaactgcaagagctcacagtcctgtattcatcgaacaacaagaattacctcgcatggt
atcagcagaagcctggacagcctcccaagctgctcatctactgggctagcaccgcgaatccgg
gggtgccggatagattctccggatcgggttcgggcaactgacttcaactctgactatcaactcactg
caagccgaggatgtcgcgggtgacttctgtcagcagtaactacgacacccccgaccttggacaag
gcaccagactggagattaagcgtacgggtggccgctccctccgtgttcatcttcccaccctccga
cgagcagctgaagtccggcaccgcctccgtcgtgtgctgctgaacaacttctacccccgcgag
gccaaggtgcagtggaaggtggacaacgcctgcagtcggcaactcccaggaatccgtcaccg
agcaggactccaaggacagcacctactccctgtcctccaccctgacctgtccaaggccgacta
cgagaagcacaaggtgtacgcctgcgaagtgaccaccagggcctgtccagccccgtgaccaag
tccttcaaccggggcgagtgc

SEQ ID NO: 28 (вариант 2 тяжелой цепи мышиноного полноразмерного IgG1)

QVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYFTFDYYMHWVQQAPGKGLEWMGLVDPEDGETIY
AEKFQGRVTITADTSTDYAMELSSLRSEDTAVYYCATDARGSGSYYPNHFDYWGQGLTLTVSS
AKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTL
SSSVTVPSSTWVSETVTCNVAHPASSTKVDKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFI FPPKPKDVL
TITLTPKVT CVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLN
GKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTI PPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITV

EWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNNHTEKSLSH
SPGK

SEQ ID NO: 29 (вариант 2 легкой цепи мышиноного полноразмерного IgG1)

DIVMTQTPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTR
ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTINSLQAEDVAVYFCQQYYDTPTFGQGRLEIKRTDAAPTVSIFP
PSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTLT
DEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNREK

SEQ ID NO: 30 (вариант 1 тяжелой цепи человеческого полноразмерного IgG1)

QVQLVESGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTDYMHVWVQAPGKGLVDPEDGETIY
AEKFQGRVTITADTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCATDARGSGSYYPNHFDYWGQGLVTVSS
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP
KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCSVMHEALHNHYT
QKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 31 (вариант 1 легкой цепи человеческого полноразмерного IgG1)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTR
ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTINSLQAEDVAVYFCQQYYDTPTFGQGRLEIKRTVAAPSVFI
PSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYLSSTLTLSK
ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 32 (вариант 2 тяжелой цепи Fab)

QVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTDYMHVWVQAPGKGLVDPEDGETIY
AEKFQGRVTITADTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCATDARGSGSYYPNHFDYWGQGLVTVSS
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSC

SEQ ID NO: 33 (вариант 2 легкой цепи Fab)

DIVMTQTPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTR
ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTINSLQAEDVAVYFCQQYYDTPTFGQGRLEIKRTVAAPSVFI
PSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYLSSTLTLSK
ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 34 (вариант 2 тяжелой цепи человеческого IgG4P)

QVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTDYMHVWVQAPGKGLVDPEDGETIY

AEKFQGRVTITADTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCATDARGSGSYYPNHFDYWGQGLVTVSS
ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVTVTPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNQKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS
LSLSLGK

SEQ ID NO: 35 (вариант 2 легкой цепи человеческого IgG4P)

DIVMTQTPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTR
ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTINSLQAEDVAVYFCQQYYDTPTFGQGRLEIKRTVAAPSVFIFP
PSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSK
ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

ССЫЛКИ

Bostrom M. P. & Seigerman D. A. (2005), HSS journal: The Musculoskeletal Journal of Hospital for Special Surgery 1, 9-18. The clinical use of allografts, demineralized bone matrices, synthetic bone graft substitutes and osteoinductive growth factors: a survey study.

Buza J. A., 3rd & Einhorn, T. (2016), Clinical cases in mineral and bone metabolism: The Official Journal of the Italian Society of Osteoporosis, Mineral Metabolism, and Skeletal Diseases 13, 101-105. Bone healing in 2016.

Canalis E., Parker K. & Zanotti S. (2012), J.Cell Physiol 227, 269-277. Gremlin1 is required for skeletal development and postnatal skeletal homeostasis.

Cho T. J., Gerstenfeld L. C. & Einhorn T. A. (2002), Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research 17, 513-520. Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing.

Einhorn T. A. & Gerstenfeld L. C. (2015), Nat. Rev. Rheumatol. 11, 45-54. Fracture healing: mechanisms and interventions.

Ferguson C., Alpern E., Miclau T. & Helms J. A. (1999), Mechanisms of development 87, 57-66. Does adult fracture repair recapitulate embryonic skeletal formation?

Gazzerro E. et al. (2005), Endocrinology 146, 655-665. Skeletal overexpression of gremlin impairs bone formation and causes osteopenia.

Gazzerro E. et al. (2007), J.Biol.Chem. 282, 31549-31557. Conditional deletion of gremlin causes a transient increase in bone formation and bone mass.

Goulet J. A., Senunas L. E., DeSilva G. L. & Greenfield M. L. (1997), Clinical Orthopaedics and Related Research, 76-81. Autogenous iliac crest bone graft. Complications and functional assessment.

Hsu D. R., Economides A. N., Wang X., Eimon P. M. & Harland R. M. (1998), Mol. Cell 1, 673-683. The Xenopus dorsalizing factor Gremlin identifies a novel family of secreted proteins that

antagonize BMP activities.

Sato K., Watanabe Y., Harada N., Abe S., Matsushita T., Yamanaka K., Kaneko T., & Sakai Y. (2014) *Tissue Eng Part C. Methods* 20, 1037-1041.

Schmid G. J., Kobayashi C., Sandell L. J. & Ornitz D. M. (2009), *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 238, 766-774. Fibroblast growth factor expression during skeletal fracture healing in mice.

Yu Y. Y. et al. (2010), *Bone* 46, 841-851. Immunolocalization of BMPs, BMP antagonists, receptors, and effectors during fracture repair.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Ингибитор активности гремлина-1 для применения в лечении перелома кости или дефекта кости.

2. Ингибитор активности гремлина-1 по п.1, где ингибитор представляет анти-гремлин 1-антитело или его функционально активный фрагмент, вариант или производное.

3. Ингибитор активности гремлина-1 по п.2, где функционально активным фрагментом антитела является Fab, Fab', F(ab')₂, Fv или scFv.

4. Ингибитор активности гремлина-1 по любому из пп.2 или 3, где антитело содержит по меньшей мере одну последовательность HCDR, выбранную из SEQ ID NO: 3, 4, 5 и 6, и/или по меньшей мере одну последовательность LCDR, выбранную из SEQ ID NO: 7, 8 и 9.

5. Ингибитор активности гремлина-1 по любому из пп.2-4, где антитело содержит переменную область тяжелой цепи (HCVR) с SEQ ID NO: 10 и/или переменную область легкой цепи (LCVR) с SEQ ID NO: 11.

6. Ингибитор активности гремлина-1 по любому из пп.2-4, где антитело содержит последовательность SEQ ID NO: 3 или 4 для HCDR1, последовательность SEQ ID NO: 5 для HCDR2, последовательность SEQ ID NO: 6 для HCDR3, последовательность SEQ ID NO: 7 для LCDR1, последовательность SEQ ID NO: 8 для LCDR2 и последовательность SEQ ID NO: 9 для LCDR3; и где переменная область тяжелой цепи содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность с последовательностью SEQ ID NO: 10, и переменная область легкой цепи содержит последовательность имеющую по меньшей мере 95% идентичность с последовательностью SEQ ID NO: 11.

7. Ингибитор активности гремлина-1 по любому из пп.2-6, где антитело связывается с эпитопом на гремлине-1, содержащем по меньшей мере один остаток, выбранный из Ile131, Lys147, Lys148, Phe149, Thr150, Thr151, Arg169, Lys174 и Gln175, где нумерация остатков соответствует нумерации в SEQ ID NO: 1.

8. Ингибитор активности гремлина-1 по любому из предшествующих пунктов, где перелом кости или дефект кости представляет перелом с замедленным сращением или несращенный перелом.

9. Ингибитор активности гремлина-1 по любому из предшествующих пунктов, где перелом кости или дефект кости ассоциирован с заболеванием, которое отрицательно влияет на целостность кости.

10. Ингибитор активности гремлина-1 по п.9, где заболевание, которое оказывает отрицательное влияние на целостность кости, представляет остеопороз, несовершенный остеогенез, диабет, болезнь Педжета, ревматоидный артрит, анкилозирующий спондилит, множественную миелому, первичный рак кости, рак с метастазами в кости, диффузный идиопатический гиперостоз скелета, остеомиелит, почечную недостаточность, мышечную дистрофию Дюшенна и талассемию.

11. Применение ингибитора активности гремлина-1 для производства лекарственного средства для лечения перелома кости или дефекта кости.

12. Применение по п.11, где ингибитор представляет анти-гремлин 1-антитело или его функционально активный фрагмент, вариант или производное.

13. Применение по п.12, где функционально активный фрагмент антитела представляет Fab, Fab', F(ab')₂, Fv или scFv.

14. Применение по любому из пп.12 или 13, где антитело содержит, по меньшей мере, одну последовательность HCDR, выбранную из SEQ ID NO: 3, 4, 5 и 6, и/или по меньшей мере одну последовательность LCDR, выбранную из SEQ ID NO: 7, 8 и 9.

15. Применение по любому из пп.12-14, где антитело содержит переменную область тяжелой цепи (HCVR) с SEQ ID NO: 10 и/или переменную область легкой цепи (LCVR) с SEQ ID NO: 11.

16. Применение по любому из пп.12-14, где антитело содержит последовательность SEQ ID NO: 3 или 4 для HCDR1, последовательность SEQ ID NO: 5 для HCDR2, последовательность SEQ ID NO: 6 для HCDR3, последовательность SEQ ID NO: 7 для LCDR1, последовательность SEQ ID NO: 8 для LCDR2 и последовательность SEQ ID NO: 9 для LCDR3; и где переменная область тяжелой цепи содержит последовательность, имеющую, по меньшей мере, 95% идентичность с последовательностью SEQ ID NO: 10, и переменная область легкой цепи содержит последовательность, имеющую, по меньшей мере, 95% идентичность с последовательностью SEQ ID NO: 11.

17. Применение по любому из пп.12-16, где антитело связывается с эпитопом на гремлине-1, содержащем по меньшей мере один остаток, выбранный из Ile131, Lys147, Lys148, Phe149, Thr150, Thr151, Arg169, Lys174 и Gln175, где нумерация остатков соответствует нумерации в SEQ ID NO: 1.

18. Применение по любому из предшествующих пунктов, где перелом кости или дефект кости представляет перелом с замедленным сращением или несращенный перелом.

19. Применение по любому из предшествующих пунктов, где перелом кости или дефект кости ассоциирован с заболеванием, которое отрицательно влияет на целостность кости.

20. Применение по п.19, где заболевание, которое оказывает отрицательное влияние на целостность кости, представляет остеопороз, несовершенный остеогенез, диабет, болезнь Педжета, ревматоидный артрит, анкилозирующий спондилит, множественную миелому, первичный рак кости, рак с метастазами в кости, диффузный идиопатический гиперостоз скелета, остеомиелит, почечную недостаточность, мышечную дистрофию Дюшенна и талассемию.

21. Способ лечения перелома кости или дефекта кости, включающий введение терапевтически эффективного количества ингибитора активности гремлина-1.

22. Способ по п.21, где ингибитор представляет анти-гремлин 1-антитело или его функционально активный фрагмент, вариант или производное.

23. Способ по п.22, где функционально активный фрагмент антитела представляет Fab, Fab', F(ab')₂, Fv или scFv.

24. Способ по любому из пп.22 или 23, где антитело содержит, по меньшей мере, одну последовательность HCDR, выбранную из SEQ ID NO: 3, 4, 5 и 6, и/или по меньшей мере одну последовательность LCDR, выбранную из SEQ ID NO: 7, 8 и 9.

25. Способ по любому из пп.22-24, где антитело содержит переменную область тяжелой цепи (HCVR) с SEQ ID NO: 10 и/или переменную область легкой цепи (LCVR) с SEQ ID NO: 11.

26. Способ по любому из пп.22-24, где антитело содержит последовательность SEQ ID NO: 3 или 4 для HCDR1, последовательность SEQ ID NO: 5 для HCDR2, последовательность SEQ ID NO: 6 для HCDR3, последовательность SEQ ID NO: 7 для LCDR1, последовательность SEQ

ID NO: 8 для LCDR2 и последовательность SEQ ID NO: 9 для LCDR3; и где переменная область тяжелой цепи содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность с последовательностью SEQ ID NO: 10, и переменная область легкой цепи содержит последовательность, имеющую по меньшей мере, 95% идентичность с последовательностью SEQ ID NO: 11.

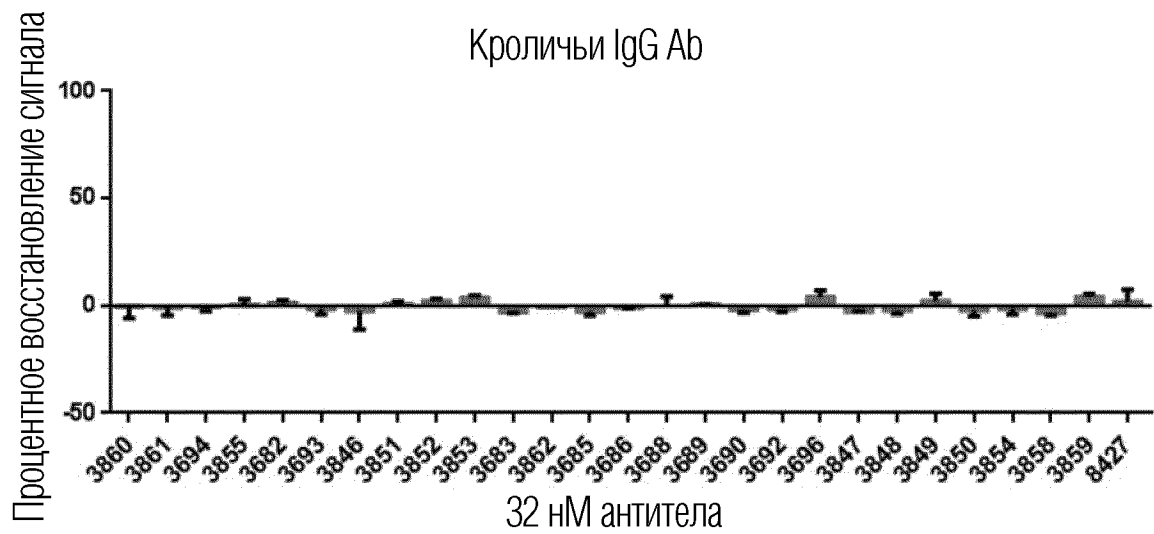
27. Способ по любому из пп.22-26, где антитело связывается с эпитопом на гремине-1, содержащем по меньшей мере один остаток, выбранный из Ile131, Lys147, Lys148, Phe149, Thr150, Thr151, Arg169, Lys174 и Gln175, где нумерация остатков соответствует нумерации в SEQ ID NO: 1.

28. Способ по любому из предшествующих пунктов, где перелом кости или дефект кости представляет перелом с замедленным сращением или несращенный перелом.

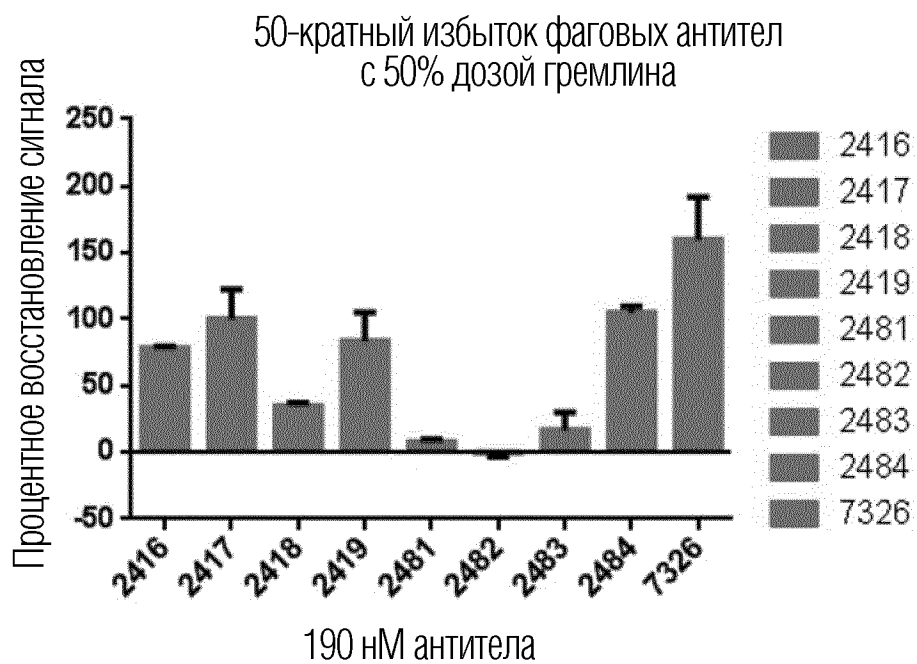
29. Способ по любому из предыдущих пунктов, где перелом кости или дефект кости ассоциирован с заболеванием, которое отрицательно влияет на целостность кости.

30. Способ по п.29, где заболевание, которое оказывает отрицательное влияние на целостность кости, представляет остеопороз, несовершенный остеогенез, диабет, болезнь Педжета, ревматоидный артрит, анкилозирующий спондилит, множественную миелому, первичный рак кости, рак с метастазами в кости, диффузный идиопатический гиперостоз скелета, остеомиелит, почечную недостаточность, мышечную дистрофию Дюшенна и талассемию.

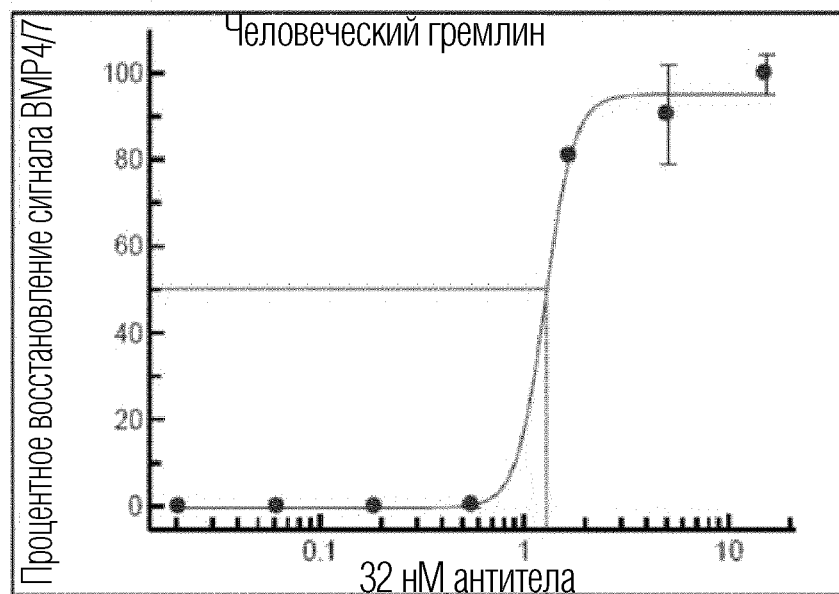
ФИГ. 1



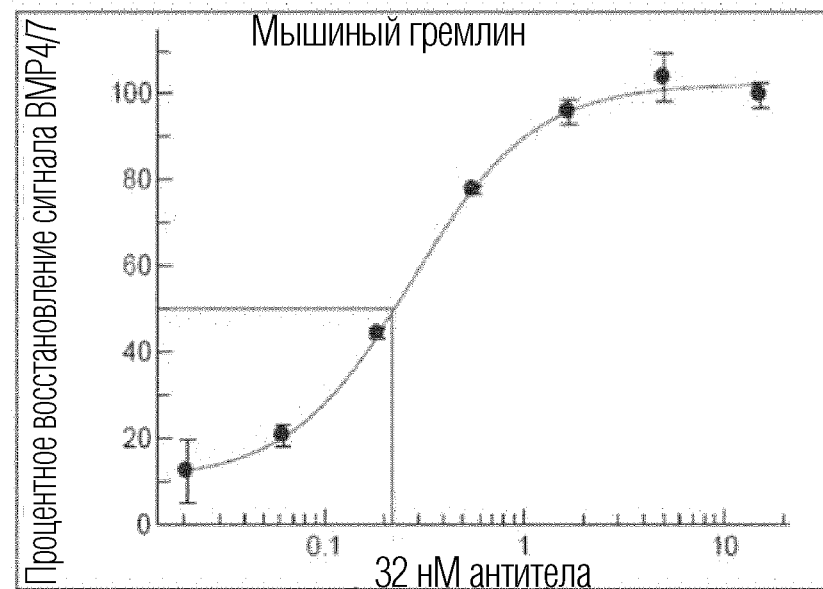
ФИГ. 2



3-кратное титрование на 7 точках по всей поверхности планшета 15 нМ (10-кратная 100% доза гремлина)



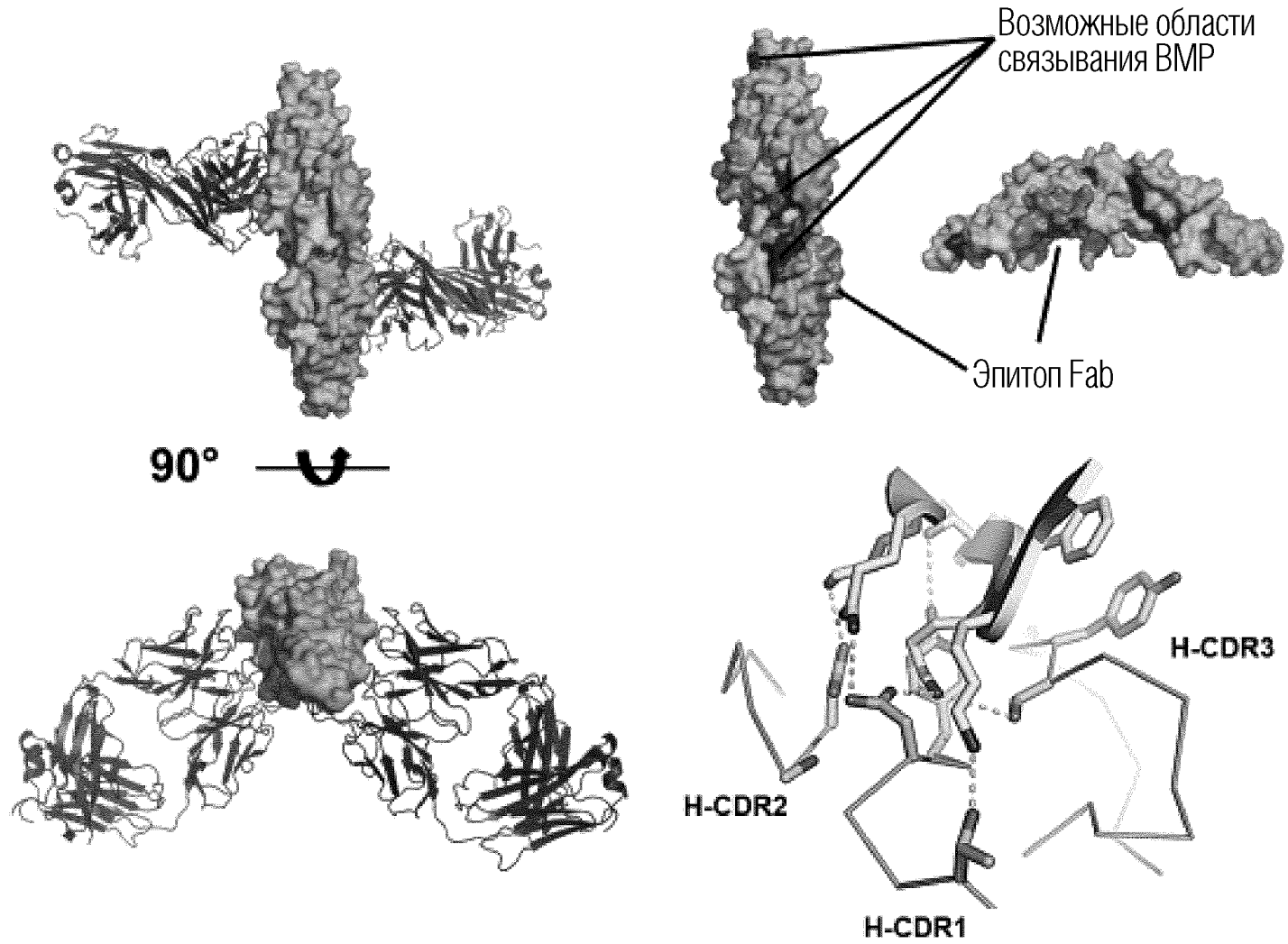
Человеческий гремлин	IC50 (нМ)	IC80 (нМ)
PВ376	1.3	1.6



Мышиный гремлин	IC50 (нМ)	IC80 (нМ)
2898	0.7	1.9
PВ376	0.2	0.6

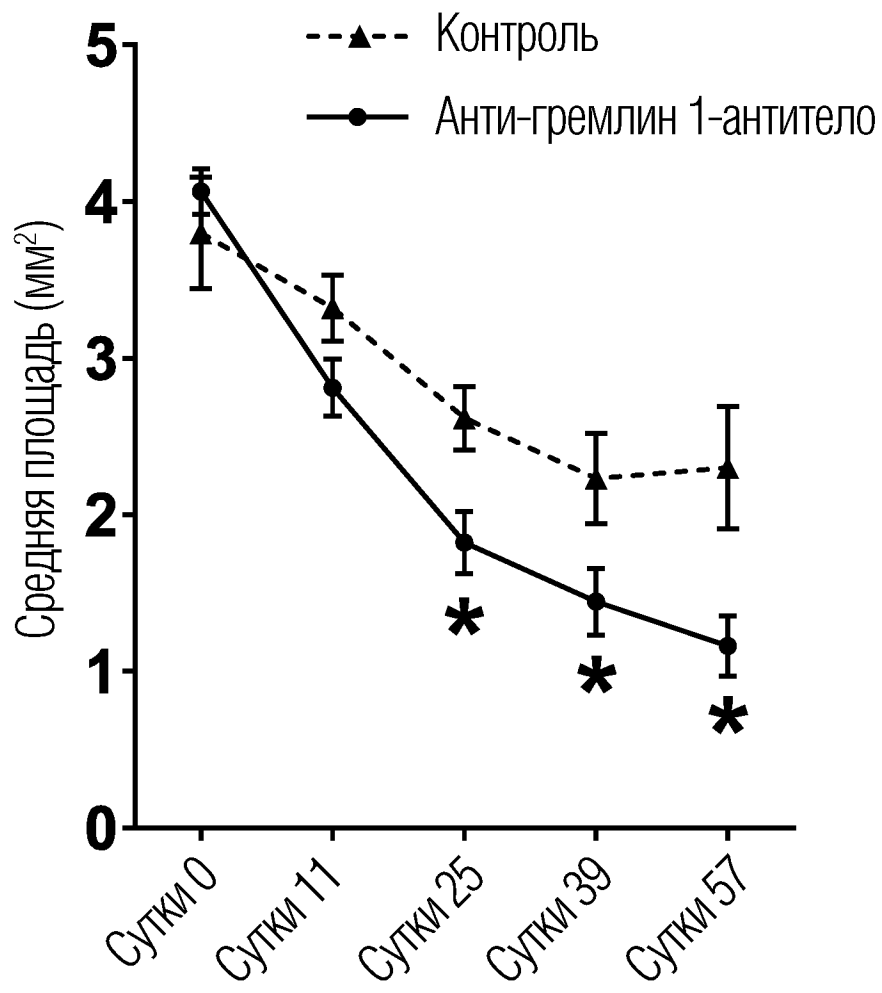
ФИГ. 3

Комплекс гремлин-Fab

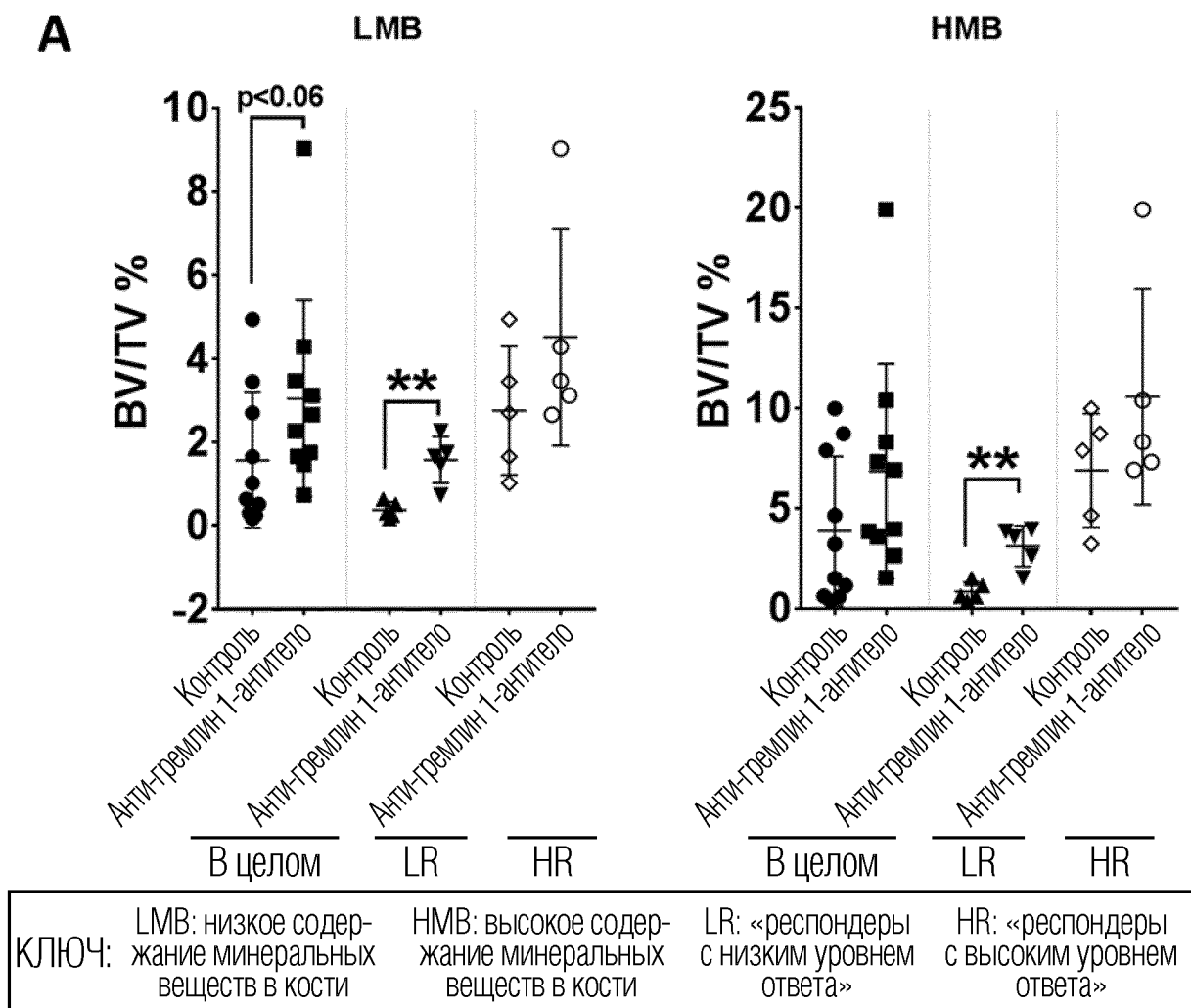
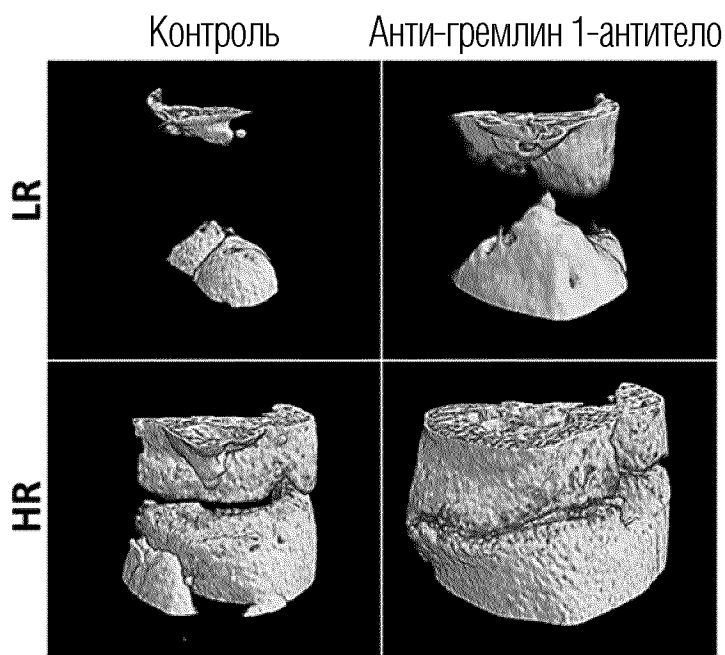


ФИГ. 4

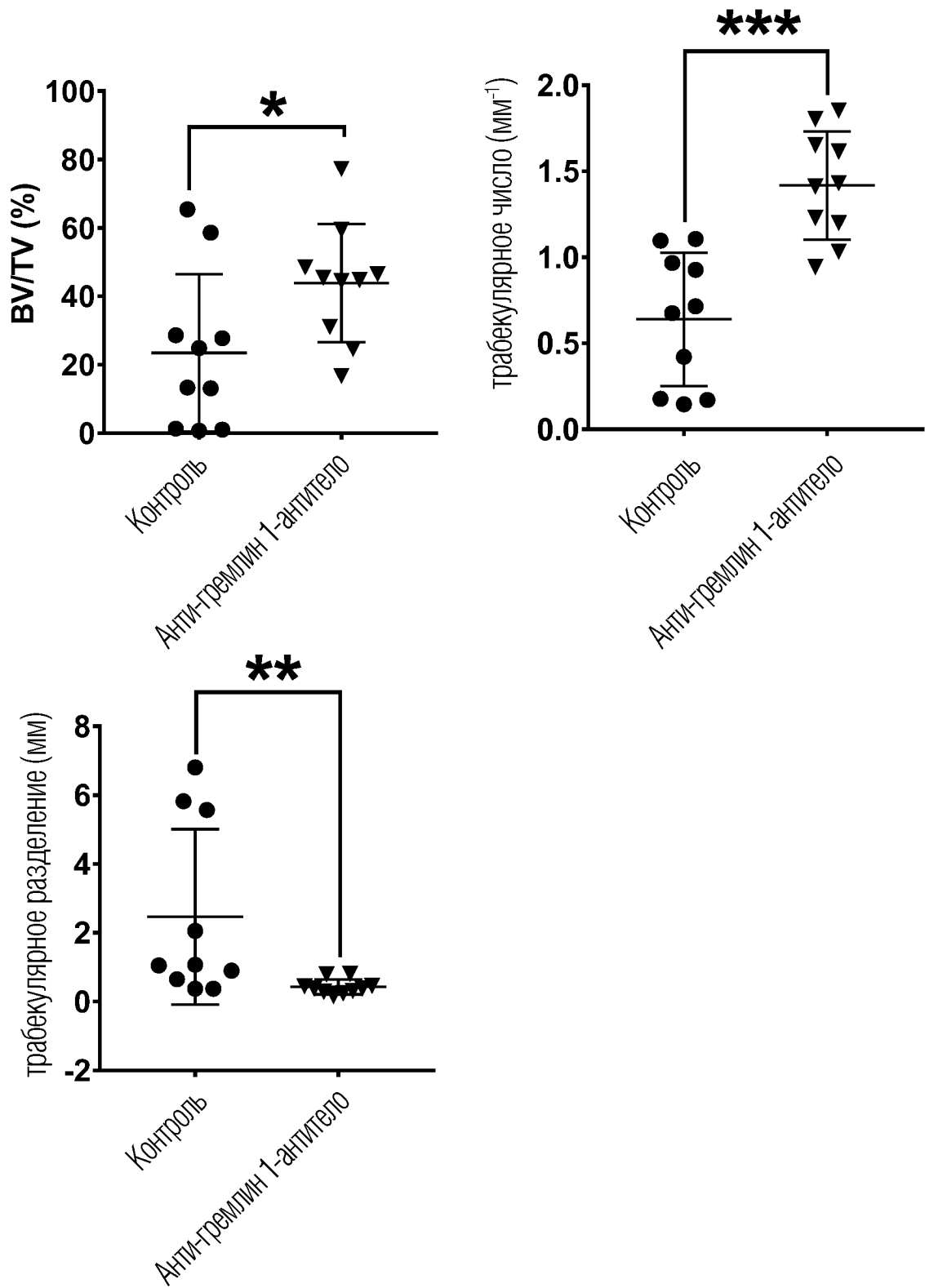
ФИГ. 5



ФИГ. 6

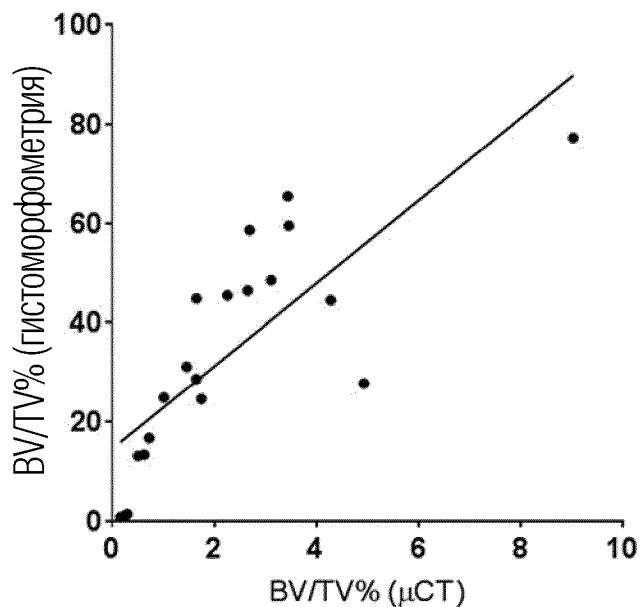
**B**

ФИГ. 7



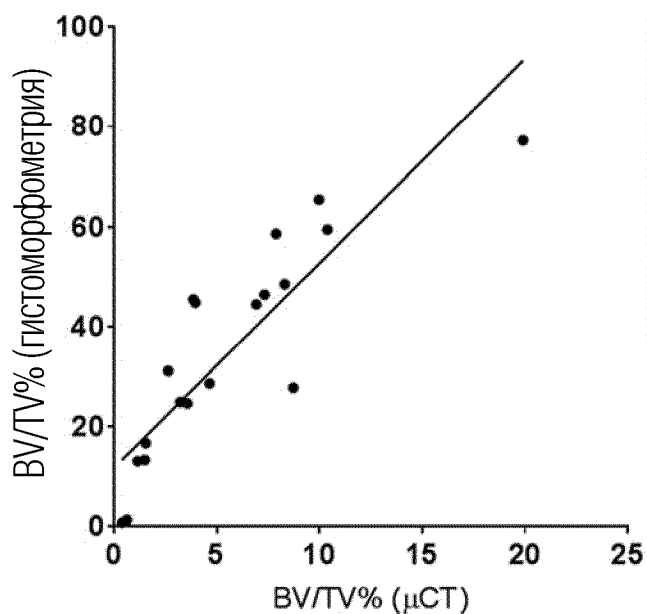
ФИГ. 8

LMB



критерий Пирсона	
г	0.7871
95% доверительный интервал	0.5287 to 0.912
R-квадрат	0.6195
P значение	
P (двухсторонний критерий)	<0.0001
Суммарное значение P	****
Статистически достоверно? (альфа = 0.05)	Да
Число пар XY	20

HMB



критерий Пирсона	
г	0.8696
95% доверительный интервал	0.6942 to 0.9475
R-квадрат	0.7562
P значение	
P (двухсторонний критерий)	<0.0001
Суммарное значение P	****
Статистически достоверно? (альфа = 0.05)	Да
Число пар XY	20