

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **046653**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.04.04

(51) Int. Cl. *A61P 21/00* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(21) Номер заявки
202092064

(22) Дата подачи заявки
2019.03.01

(54) **СПОСОБЫ ИЗМЕНЕНИЯ СОСТАВА ТЕЛА**

(31) **62/637,017**

(32) **2018.03.01**

(33) **US**

(43) **2020.12.21**

(86) **PCT/US2019/020330**

(87) **WO 2019/169283 2019.09.06**

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

(56) Ester Latres: "Activin A more prominently regulates muscle mass in primates than does GDF8", 28 July 2017 (2017-07-28), pages 1-13, XP055584641, Retrieved from the Internet: URL:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5414365/> [retrieved on 2019-04-30], page 3 - page 4; figures 1, 6, page 10, paragraph 3

US-A1-2013122007

US-A1-2010183624

US-A1-2015037339

WO-A1-2016168613

(72) Изобретатель:
**Донахью Стефен, Порди Роберт К.,
Херман Гари (US)**

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

(57) Изобретение относится к композициям и способам изменения состава тела у субъекта, причем изменением состава тела является одновременное увеличение мышечной массы и уменьшение жировой массы. Настоящее изобретение также относится к композициям и способам уменьшения жировой массы у субъекта. Композиции и способы также увеличивают объем мышц и безжировую массу тела у субъекта. Данное изобретение также относится к композициям, которые содержат ингибитор GDF8 и ингибитор активина А, и к применению таких композиций для лечения заболеваний и расстройств, характеризующихся повышенной жировой массой и/или уменьшенным объемом мышц.

B1

046653

046653

B1

Данная заявка подана 1 марта 2019 г. В виде международной заявки РСТ на выдачу патента и испрашивает приоритет предварительной заявки США № 62/637017, поданной 1 марта 2018 г., раскрытие которой полностью включено в данный документ посредством ссылки.

Список последовательностей

Данная заявка содержит список последовательностей в электронном формате, озаглавленный "Sequence-Listing-40848-091WOU1", который был создан 1 марта 2019 г. И имеет размер 288 килобайт (KB) (295202 байта). Содержимое txt файла "Sequence-Listing-40848-091USU1" включено в данный документ посредством ссылки.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к композициям и способам изменения состава тела у субъекта. Композиции и способы также снижают жировую массу у субъекта. Композиции и способы также увеличивают объем мышц и/или безжировую массу тела у субъекта. Более конкретно, изобретение относится к композициям, которые содержат ингибитор GDF8 и ингибитор активина А, и к применению таких композиций для лечения заболеваний и расстройств, характеризующихся повышенной жировой массой и/или уменьшенным объемом мышц или уменьшенной безжировой массой тела.

Предшествующий уровень техники

Фактор роста и дифференцировки 8 (GDF8, также известный как миостатин), представляет собой секретируемый лиганд, принадлежащий к суперсемейству факторов роста - трансформирующие факторы роста β (TGF- β). GDF8 играет центральную роль в развитии и поддержании скелетных мышц, выступая в качестве негативного регулятора миогенеза и массы скелетных мышц. Мутации миостатина (включая нокаут) транслируются в фенотипы, которые представляют собой преимущественно увеличенную мышечную массу, но могут состоять в различиях в мускулатуре (больше мышечных волокон), составе мышечных волокон (большая площадь поперечного сечения мышечных волокон), повышенном соотношении белок/ДНК и других.

Антитела против GDF8 и терапевтические способы раскрыты, например, в US 8840894. Антитела против GDF8 также упоминаются, например, в патентах США №№ 6096506; 7320789; 7261893; 7807159; 7888486; 7635760; 7632499; в публикациях заявок на получение патентов №№ 2006/0263354; 2007/0178095; 2008/0299126; 2010/0166764; 2009/0148436; и в публикациях международных заявок на получение патентов №№ WO 2004/037861; WO 2007/047112; WO 2010/070094.

Активины принадлежат к суперсемейству трансформирующих факторов роста бета (TGF- β) и оказывают большой диапазон биологических действий на пролиферацию, дифференцировку, метаболизм, гомеостаз и апоптоз клеток, а также на иммунный ответ и восстановление тканей. Активин А представляет собой гомодимер с дисульфидной связью (две цепи бета-А), который связывается и активирует гетеромерные комплексы рецептора серин-треонин киназы I типа (Act RI-A и Act RI-B) и II типа (Act RII-A и Act RII-B).

Антитела против активина А и способы их использования раскрыты, например, в US 8309082; 9718881; и в публикациях международных заявок на получение патентов № WO 2008/031061.

Композиции, содержащие антитела против GDF8 и антитела против активина А, и терапевтические способы раскрыты, например, в US 8871209.

Ожирение является глобальной проблемой для более чем трети населения мира. В Соединенных Штатах Америки средний уровень ожирения превышает 20%. Стоимость заболеваний, связанных с ожирением, огромна и составляет 190,2 миллиарда долларов, что составляет примерно 21% годовых медицинских расходов в США. Ожирение - это эпидемическое заболевание, характеризующееся хроническим воспалением средней степени тяжести, связанным с дисфункциональной (повышенной) жировой массой. У участников Фрамингемского исследования сердца абдоминальное ожирение было связано с сердечно-сосудистыми заболеваниями (CVD) после поправок на клинические факторы риска и общее ожирение. Britton JACC 2013 62; 921. Накопление висцерального жира в брюшной полости положительно связано с прогрессированием коронарными некальцифицированными бляшками. Imai Atherosclerosis 2012. Поскольку высокая жировая масса связана с такими серьезными состояниями, как застойная сердечная недостаточность, высокое кровяное давление/гипертония, тромбоэмболия легочной артерии, остеоартрит, лимфедема, гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь, хроническая почечная недостаточность, рак, жировая болезнь печени и даже депрессия, сохраняется потребность в терапии, снижающей у субъектов общую жировую массу и/или андрондную жировую массу.

Сущность изобретения

В одном аспекте изобретение направлено на способ изменения состава тела у субъекта, то есть увеличения мышечной массы и уменьшения жировой массы, включающий введение субъекту первой композиции, содержащей эффективное количество ингибитора GDF8, и второй композиции, содержащей эффективное количество ингибитора активина А. В другом аспекте изобретение направлено на способ стимулирования уменьшения жировой массы у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества композиции, содержащей ингибитор GDF8 и ингибитор активина А.

В другом аспекте изобретение направлено на способ лечения заболевания или расстройства, харак-

теризующегося или связанного с увеличенной жировой массой, причем способ включает введение нуждающемуся в этом субъекту первой композиции, содержащей эффективное количество ингибитора GDF8, и второй композиции, содержащей эффективное количество ингибитора активина А. В другом аспекте изобретение направлено на способ лечения заболевания или расстройства, характеризующегося или связанного с увеличенной жировой массой, причем способ включает введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества композиции, содержащей ингибитор GDF8 и ингибитор активина А. В одном аспекте изобретение направлено на способ изменения состава тела у субъекта, то есть увеличения мышечной массы и уменьшения жировой массы, включающий введение субъекту эффективного количества ингибитора GDF8 и эффективное количество ингибитора активина А, причем происходит незначительное изменение общей массы тела. Таким образом, в одном аспекте изобретения у субъекта, которому вводят эффективное количество ингибитора GDF8 и эффективное количество ингибитора активина А, будет происходить увеличение мышечной массы одновременно с уменьшением жировой массы, что приводит к минимальному и/или незначительному изменению общей массы тела.

В одном аспекте изобретение направлено на применение ингибитора GDF8 и/или ингибитора активина А для получения лекарственного средства для достижения уменьшения жировой массы у субъекта. В другом аспекте изобретение направлено на применение ингибитора GDF8 и/или ингибитора активина А для получения лекарственного средства для лечения заболевания или расстройства, связанного с увеличенной жировой массой у субъекта.

В некоторых вариантах осуществления представлен ингибитор GDF8 для применения в способе лечения заболевания или расстройства, характеризующегося повышенной жировой массой, причем способ включает введение субъекту ингибитора GDF8 и ингибитора активина А.

В некоторых вариантах осуществления представлен ингибитор активина А для применения в способе лечения заболевания или расстройства, характеризующегося повышенной жировой массой, причем способ включает введение субъекту ингибитора активина А и ингибитора GDF8.

В некоторых вариантах осуществления представлен нетерапевтический способ уменьшения жировой массы у субъекта, причем способ включает введение субъекту ингибитора активина А и ингибитора GDF8.

В одном варианте осуществления способа согласно изобретению эффективное количество ингибитора GDF8 включает в себя режим дозирования, выбираемый из группы, состоящей из по меньшей мере от 0,1 мг/кг до приблизительно 10 г/кг, от 1 мг/кг до приблизительно 1 г/кг и от 10 до 100 мг/кг. В дополнительном варианте осуществления способа согласно изобретению эффективное количество ингибитора GDF8 включает в себя режим дозирования, выбираемый из группы, состоящей из разовой дозы от приблизительно 0,01 до приблизительно 20 мг/кг массы тела, от приблизительно 0,1 до приблизительно 10 мг/кг массы тела и от приблизительно 0,1 до приблизительно 5 мг/кг массы тела.

В другом варианте осуществления способа согласно изобретению эффективное количество ингибитора активина А включает в себя режим дозирования, выбираемый из группы, состоящей из по меньшей мере от 0,1 мг/кг до приблизительно 10 г/кг, от 1 мг/кг до приблизительно 1 г/кг и от 10 до 100 мг/кг. В дополнительном варианте осуществления способа согласно изобретению эффективное количество ингибитора активина А включает в себя режим дозирования, выбираемый из группы, состоящей из разовой дозы от приблизительно 0,01 до приблизительно 20 мг/кг массы тела, от приблизительно 0,1 до приблизительно 10 мг/кг массы тела и от приблизительно 0,1 до приблизительно 5 мг/кг массы тела.

В одном варианте осуществления способа согласно изобретению эффективное количество ингибитора GDF8 составляет 6 мг/кг массы тела, а эффективное количество ингибитора активина А составляет 3 мг/кг массы тела. В другом варианте осуществления способа согласно изобретению эффективное количество ингибитора GDF8 составляет 6 мг/кг массы тела, а эффективное количество ингибитора активина А составляет 10 мг/кг массы тела.

В одном варианте осуществления способа согласно изобретению первая композиция составлена для внутривенного, подкожного или перорального введения. В другом варианте осуществления способа согласно изобретению вторая композиция составлена для внутривенного, подкожного или перорального введения. В некоторых вариантах осуществления способа согласно изобретению первую и вторую композиции вводят субъекту одновременно или последовательно.

В одном варианте осуществления способа согласно изобретению первую и вторую композиции объединяют перед введением в третью композицию. В дополнительном варианте осуществления третью композицию составлена для внутривенного, подкожного или перорального введения.

В одном варианте осуществления способ согласно изобретению дополнительно включает измерение общей жировой массы у субъекта перед введением. В другом варианте осуществления способ согласно изобретению дополнительно включает измерение общей жировой массы у субъекта после введения и введение первой и второй композиции до тех пор, пока общая жировая масса у субъекта не снизится по меньшей мере на 2-8%, 2,5-6%, 3-4% или по меньшей мере 2,0%, по меньшей мере 2,5%, по меньшей мере 3,0% или по меньшей мере 3,5% или более.

В одном варианте осуществления способ согласно изобретению дополнительно включает измерение андронной жировой массы у субъекта перед введением. В другом варианте осуществления способ

согласно изобретению дополнительно включает измерение андройдной жировой массы у субъекта после введения и введение первой и второй композиции до тех пор, пока андройдная жировая масса у субъекта не снизится по меньшей мере на 2-8%, 2,5-6%, 3-4% или по меньшей мере на 2,0%, по меньшей мере на 2,5%, по меньшей мере на 3,0% или по меньшей мере на 3,5% или более.

В одном варианте осуществления способ согласно изобретению дополнительно включает измерение объема подкожной жировой ткани у субъекта перед введением. В другом варианте осуществления способ согласно изобретению дополнительно включает измерение объема подкожной жировой ткани у субъекта после введения и введение первой и второй композиции до тех пор, пока андройдная жировая масса у субъекта не снизится по меньшей мере на 2-8%, 2,5-6%, 3-4% или по меньшей мере на 2,0%, по меньшей мере на 2,5%, по меньшей мере на 3,0% или по меньшей мере на 3,5% или более.

В некоторых вариантах осуществления представлен способ, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества ингибитора GDF8 и эффективного количества ингибитора активина А, причем ингибитор GDF8 и ингибитор активина А вводят совместно в течение 48 ч или менее, 24 ч или менее, 12 ч или менее, 6 ч или менее, 3 ч или менее или 1 ч или менее.

В некоторых вариантах осуществления представлен способ, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества ингибитора GDF8 и эффективного количества ингибитора активина А, причем у субъекта происходит уменьшение общей жировой массы, андройдной жировой массы и/или объема подкожной жировой ткани.

В некоторых вариантах осуществления представлен способ, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества ингибитора GDF8 и эффективного количества ингибитора активина А, причем у субъекта происходит уменьшение общей жировой массы, андройдной жировой массы и/или объема подкожной жировой ткани через 4 недели или более, или 8 недель или более после введения.

В некоторых вариантах осуществления представлен способ, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества ингибитора GDF8 и эффективного количества ингибитора активина А, причем у субъекта происходит уменьшение общей жировой массы, андройдной жировой массы и/или объема подкожной жировой ткани, при этом у субъекта не наблюдается уменьшение объема внутримышечной жировой ткани бедра.

В некоторых вариантах осуществления представлен способ, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества ингибитора GDF8 и эффективного количества ингибитора активина А, причем у субъекта происходит уменьшение общей жировой массы, андройдной жировой массы и/или объема подкожной жировой ткани, при этом у субъекта не наблюдается уменьшение объема внутримышечной жировой ткани бедра через 4 недели или более, или 8 недель или более после введения.

В некоторых вариантах осуществления представлен набор, содержащий первый контейнер, содержащий эффективное количество ингибитора GDF8, и второй контейнер, содержащий эффективное количество специфического ингибитора активина А.

В некоторых вариантах осуществления ингибитором GDF8 является выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с GDF8.

В одном варианте осуществления способа согласно изобретению ингибитором GDF8 является антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с GDF8. В другом варианте осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывает GDF8, содержит определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR) варибельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащие SEQ ID NO: 360, и определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR) варибельной области легкой цепи (LCVR), содержащие SEQ ID NO: 368. В еще одном варианте осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывает GDF8, содержит три HCDR, содержащие SEQ ID NO: 362, SEQ ID NO: 364 и SEQ ID NO: 366, и три LCDR, содержащие SEQ ID NO: 370, SEQ ID NO: 372 и SEQ ID NO: 374.

В некоторых вариантах осуществления ингибитором активина А является выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с активинном А.

В одном варианте осуществления способа согласно изобретению ингибитором активина А является антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывает активин А. В другом варианте осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывает активин А, содержит определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR) варибельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащие SEQ ID NO: 553, и определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR) варибельной области легкой цепи (LCVR), содержащие SEQ ID NO: 537. В еще одном варианте осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывает активин А, содержит три HCDR, содержащие SEQ ID NO: 555, SEQ ID NO: 557 и SEQ ID NO: 559, и три LCDR, содержащие SEQ ID NO: 539, SEQ ID NO: 541 и SEQ ID NO: 543.

В одном варианте осуществления способа согласно изобретению эффективную дозу ингибитора активина А выбирают из группы, включающей в себя от 100 до 200% эффективной дозы ингибитора GDF8, от 100 до 250% эффективной дозы ингибитора GDF8, от 10 до 300% эффективной дозы ингибитора GDF8 и от 100 до 400% по массе эффективной дозы ингибитора GDF8.

В другом варианте осуществления способа согласно изобретению массовое отношение эффективной дозы ингибитора активина А к эффективной дозе ингибитора GDF8 составляет от 10:1 до 1:10, от 8:1 до 1:8, от 6:1 до 1:6, от 3:1 до 1:3 или приблизительно от 2:1 до 1:2. В другом варианте осуществления способа согласно изобретению массовое отношение эффективной дозы ингибитора активина А приблизительно в 1,5-2,0 раза больше по массе, чем количество ингибитора GDF8.

В одном варианте осуществления способа согласно изобретению ингибитором GDF8 является биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывает GDF8, а также специфически связывает активин А. В другом варианте осуществления ингибитором активина А является биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывает активин А, а также специфически связывает GDF8.

В одном варианте осуществления способа согласно изобретению уменьшением жировой массы у субъекта является уменьшение общей жировой массы, которую измеряют с помощью DXA (двухэнергетической рентгеновской абсорбциометрии). В другом варианте осуществления способа согласно изобретению уменьшением жировой массы у субъекта является уменьшение андройдной жировой массы, которую измеряют с помощью DXA (двухэнергетической рентгеновской абсорбциометрии).

В одном варианте осуществления способа согласно изобретению уменьшением жировой массы у субъекта является уменьшение объема подкожной жировой ткани, который измеряют с помощью MRI (магнитно-резонансной томографии).

В одном варианте осуществления способа согласно изобретению у субъекта происходит увеличение объема мышц. Объемом мышц может быть объем мышечной ткани бедра, например, который измеряют с помощью MRI. В некоторых вариантах осуществления объемом мышц может быть объем мышечной ткани бедра, например, который измеряют с помощью MRI. В некоторых вариантах осуществления объемом мышц бедра может быть объем мышечной ткани бедра, включая внутримышечную жировую ткань и большие сосуды, или объем мышечной ткани бедра за исключением внутримышечной жировой ткани и больших сосудов, например, который измеряют с помощью MRI.

В одном варианте осуществления способа согласно изобретению у субъекта происходит увеличение общей безжировой массы. Общую безжировую массу можно измерять с помощью DXA (двухэнергетической рентгеновской абсорбциометрии).

В одном варианте осуществления способа согласно изобретению у субъекта происходит увеличение аппендикулярной безжировой массы тела. Аппендикулярную безжировую массу тела можно измерять с помощью DXA и рассчитывать, например, по уравнению aLBM.

В одном варианте осуществления способа согласно изобретению у субъекта происходит уменьшение общей жировой массы, которую измеряют, например, с помощью DXA.

В одном варианте осуществления способа согласно изобретению у субъекта происходит уменьшение андройдной жировой массы, которую измеряют, например, с помощью DXA.

В одном варианте осуществления способа согласно изобретению у субъекта происходит уменьшение объема подкожной жировой ткани, которую измеряют, например, с помощью DXA.

В одном варианте осуществления способа согласно изобретению у субъекта происходит уменьшение суммы жировой массы рук и ног, которую измеряют, например, с помощью DXA.

В одном варианте осуществления изобретения у субъекта не наблюдается уменьшение объема внутримышечной жировой ткани бедра, которую измеряют, например, с помощью MRI.

В одном варианте осуществления изобретения у субъекта не наблюдается уменьшение общей массовой плотности минеральных веществ в костной ткани (BMD), которую измеряют, например, с помощью DXA.

В одном варианте осуществления изобретения у субъекта не наблюдается уменьшение общего массового содержания минеральных веществ в костной ткани (BMC), которое измеряют, например, с помощью DXA.

В одном варианте осуществления изобретения у субъекта наблюдается увеличение общего массового содержания минеральных веществ в костной ткани (BMC), которое измеряют, например, с помощью DXA.

В другом варианте осуществления способа согласно изобретению у субъекта нет состояния или заболевания мышечного истощения.

В некоторых вариантах осуществления представлен набор для применения с целью изменения состава тела, уменьшения жировой массы, увеличения безжировой массы или лечения заболевания или расстройства, характеризующегося или связанного с увеличенной жировой массой, причем набор содержит первый контейнер, содержащий композицию, содержащую эффективное количество ингибитора GDF8, и второй контейнер, содержащий вторую композицию, содержащую эффективное количество ингибитора активина А.

В некоторых вариантах осуществления представлен ингибитор GDF8 для применения с целью получения первой композиции для применения в качестве лекарственного средства в наборе для изменения состава тела, уменьшения жировой массы, увеличения безжировой массы или лечения заболевания или расстройства, характеризующегося или связанного с увеличенной жировой массой, причем набор допол-

нительно содержит вторую композицию, содержащую ингибитор активина А.

В некоторых вариантах осуществления представлен ингибитор активина А для применения с целью получения первой композиции для применения в качестве лекарственного средства в наборе для изменения состава тела, уменьшения жировой массы, увеличения безжировой массы или лечения заболевания или расстройства, характеризующегося или связанного с увеличенной жировой массой, причем набор дополнительно содержит вторую композицию, содержащую ингибитор GDF8.

В некоторых вариантах осуществления представлен ингибитор GDF8 для применения с целью получения первой композиции для применения в наборе для изменения состава тела, уменьшения жировой массы или увеличения безжировой массы у субъекта, причем набор дополнительно содержит вторую композицию, содержащую ингибитор активина А.

В некоторых вариантах осуществления представлен ингибитор активина А для применения с целью получения первой композиции для применения в наборе для изменения состава тела, уменьшения жировой массы или увеличения безжировой массы у субъекта, причем набор дополнительно содержит вторую композицию, содержащую ингибитор GDF8.

В некоторых вариантах осуществления представлена первая композиция, содержащая ингибитор GDF8, для применения с целью изменения состава тела, уменьшения жировой массы, увеличения безжировой массы или лечения заболевания или расстройства, характеризующегося или связанного с увеличенной жировой массой или уменьшенной безжировой массой у субъекта, при этом субъект получает вторую композицию, содержащую ингибитор активина А.

В некоторых вариантах осуществления представлена первая композиция, содержащая ингибитор активина А, для применения с целью изменения состава тела, уменьшения жировой массы, увеличения безжировой массы или лечения заболевания или расстройства, характеризующегося или связанного с увеличенной жировой массой или уменьшенной безжировой массой у субъекта, при этом субъект получает вторую композицию, содержащую ингибитор GDF8.

В некоторых вариантах осуществления представлена первая композиция, содержащая ингибитор GDF8, для применения в способе изменения состава тела, уменьшения жировой массы, увеличения безжировой массы или лечения заболевания или расстройства, характеризующегося или связанного с увеличенной жировой массой или уменьшенной безжировой массой, причем способ дополнительно включает введение второй композиции, содержащей ингибитор активина А.

В некоторых вариантах осуществления представлена первая композиция, содержащая ингибитор активина А, для применения в способе изменения состава тела, уменьшения жировой массы, увеличения безжировой массы или лечения заболевания или расстройства, характеризующегося или связанного с увеличенной жировой массой или уменьшенной безжировой массой, причем способ дополнительно включает введение второй композиции, содержащей ингибитор GDF8.

В некоторых вариантах осуществления представлена композиция, содержащая ингибитор активина А и ингибитор GDF8, для применения с целью изменения состава тела, уменьшения жировой массы, увеличения безжировой массы или лечения или профилактики заболевания или расстройства, характеризующегося или связанного с увеличенной жировой массой или уменьшенной безжировой массой.

Другие варианты осуществления настоящего изобретения станут очевидны из обзора следующего подробного описания.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 представлена гистограмма, изображающая результаты клинических исследований у пациентов с саркопенией в возрасте 70 лет или старше, получающих только антитела против GDF8 REGN1033 через 12 недель в виде процентного изменения среднего значения LS и SE общей безжировой массы от исходного уровня по сравнению с плацебо. У пациентов, получающих REGN1033, наблюдалось значительное увеличение общей безжировой массы тела на 12 неделе в каждом из трех режимов дозирования по сравнению с плацебо (n=65). У пациентов, получающих 100 мг антитела против GDF8 REGN1033 Q4W S.C. Наблюдалось различие общей безжировой массы по сравнению с плацебо, составляющее 1,66% (n=62, P=0,0077). У пациентов, получающих 300 мг антитела против GDF8 Q4W SC, наблюдалось различие общей безжировой массы по сравнению с плацебо, составляющее 1,78% (n=64, P=0,0043). У пациентов, получающих 300 мг Q2W SC, наблюдалось различие общей безжировой массы по сравнению с плацебо, составляющее 2,29% (n=59, P=0,0004).

На фиг. 2А представлена табл. 1 с панелями возрастающих доз, используемых в исследовании 48 здоровых женщин в постменопаузе согласно примеру 2. Использовали одну внутривенную дозу антитела REGN1033 против GDF8 и/или антитела REGN2477 против активина А. В первичных анализах группы плацебо и комбинации высоких доз объединили по панелям, в результате получилось 12 субъектов, получавших плацебо, и 12, получавших комбинацию высокой дозы, как показано областями, выделенными прямоугольником в таблице.

На фиг. 2В представлена гистограмма, изображающая % изменение объема мышц бедра (измеренного с помощью MRI) на 8 неделе после одной в/в дозы антитела REGN2477 против активина А и/или антитела REGN1033 против GDF8 у здоровых женщин в постменопаузе. Значительное увеличение % изменения объема мышц бедра по сравнению с плацебо наблюдалось в группах антитела против GDF8 (6

мг/кг), антитела против GDF8 (6 мг/кг) + антитела против активина А в средней дозе (3 мг/кг) и антитела против GDF8 (6 мг/кг) + антитела против активина А в высокой дозе (10 мг/кг). (*Номинальный $p < 0,5$ по сравнению с плацебо, **** номинальный $p < 0,0001$ по сравнению с плацебо).

На фиг. 2С представлена гистограмма, изображающая % изменение общей жировой массы (измеренной с помощью DXA) на 8 неделе после одной в/в дозы антитела REGN2477 против активина А и/или антитела REGN1033 против GDF8 у здоровых женщин в постменопаузе. Цифры показывают изменения по сравнению с плацебо. Значительное уменьшение % изменения общей жировой массы наблюдалось в группе антитела против GDF8 (6 мг/кг) + антитела против активина А в высокой дозе (10 мг/кг). (*Номинальный $p < 0,05$ по сравнению с плацебо).

На фиг. 3 представлен линейный график, изображающий процентное изменение от исходного уровня среднего значения LS (SE) объема мышц бедра при MRI на 0, 4 и 8 неделе после одной в/в дозы антитела REGN2477 против активина А и/или антитела REGN1033 против GDF8 у здоровых женщин в постменопаузе. На 4 неделе после одной в/в дозы наблюдалось значительное увеличение % изменения объема мышц бедра (измеренного с помощью MRI за исключением внутримышечной жировой ткани) по сравнению с плацебо в каждой из групп антитела против GDF8 (6 мг/кг), антитела против GDF8 (6 мг/кг) + антитела против активина А в низкой дозе (1 мг/кг), антитела против GDF8 (6 мг/кг) + антитела против активина А в средней дозе (3 мг/кг) и антитела против GDF8 (6 мг/кг) + антитела против активина А в высокой дозе (10 мг/кг). На 8 неделе после одной в/в дозы наблюдалось значительное увеличение % изменения объема мышц бедра по сравнению с плацебо в группах антитела против GDF8 (6 мг/кг) + антитела против активина А в средней дозе (3 мг/кг) и антитела против GDF8 (6 мг/кг) + антитела против активина А в высокой дозе (10 мг/кг). (*Номинальный $p < 0,05$, **номинальный $p < 0,001$). Значения N для каждой группы показаны на фиг. 2А.

На фиг. 4 представлены линейные графики, изображающие индивидуальные данные процентного изменения (от исходного уровня) объема мышц бедра по MRI на 0, 4 и 8 неделе после одной в/в дозы антитела REGN2477 против активина А и/или антитела REGN1033 против GDF8 у здоровых женщин в постменопаузе в виде % изменения от исходного уровня в группах плацебо, антитела против GDF8 (6 мг/кг), антитела против активина А в высокой дозе (10 мг/кг), антитела против GDF8 (6 мг/кг) + антитела против активина А в низкой дозе (1 мг/кг), антитела против GDF8 (6 мг/кг) + антитела против активина А в средней дозе (3 мг/кг) и антитела против GDF8 (6 мг/кг) + антитела против активина А в высокой дозе (10 мг/кг) для множества индивидуумов. Увеличение объема мышц бедра постоянно наблюдалось у отдельных субъектов после лечения комбинации REGN2477+REGN1033. В каждой группе лечения разные линии обозначают разных людей.

На фиг. 5 представлен линейный график, изображающий аппендикулярную безжировую массу (тела) (т.е. сумму безжировой ткани рук и ног) на 0, 4 и 8 неделе после одной в/в дозы антитела REGN2477 против активина А и/или антитела REGN1033 против GDF8 у здоровых женщин в постменопаузе в виде процентного изменения среднего значения LS (методом наименьших квадратов) (SE) от исходного уровня в шести группах. Значения N для каждой группы показаны на фиг. 2А. Через 4 недели и 8 недель в каждой из трех групп комбинированной дозы, включая группы антитела против GDF8 (6 мг/кг) + антитела против активина А в низкой дозе (1 мг/кг), антитела против GDF8 (6 мг/кг) + антитела против активина А в средней дозе (3 мг/кг) и антитела против GDF8 (6 мг/кг) + антитела против активина А в высокой дозе (10 мг/кг), наблюдалось значительно увеличенное различие средних значений LS % изменения аппендикулярной безжировой массы по сравнению с плацебо (* номинальный $p < 0,05$, ** номинальный $p < 0,001$). Значения N для каждой группы показаны на фиг. 2А.

На фиг. 6 представлен линейный график, изображающий процентное изменение средней (SE=стандартные ошибки) общей жировой массы (при измерении с помощью DXA) на 0, 4 и 8 неделе после одной в/в дозы антитела REGN2477 против активина А и/или антитела REGN1033 против GDF8 у здоровых женщин в постменопаузе в группах плацебо, антитела против GDF8 (6 мг/кг), антитела против активина А в высокой дозе (10 мг/кг), группы антитела против GDF8 (6 мг/кг) + антитела против активина А в низкой дозе (1 мг/кг), антитела против GDF8 (6 мг/кг) + антитела против активина А в средней дозе (3 мг/кг) и антитела против GDF8 (6 мг/кг) + антитела против активина А в высокой дозе (10 мг/кг). Значения N для каждой группы показаны на фиг. 2А. В группе высокой дозы антитела против GDF8 (6 мг/кг) + антитела против активина А в высокой дозе (10 мг/кг) наблюдалось значительное уменьшение общей жировой массы в виде различия средних значений LS процентного изменения по сравнению с плацебо на 4 неделе и 8 неделе (*номинальный $p < 0,05$). Блокирование как активина А, так и GDF8 приводит к уменьшению общей жировой массы, которую оценивают с помощью DXA.

На фиг. 7 представлен линейный график, изображающий среднее (SE) процентное изменение андрогенной жировой массы на 0, 4 и 8 неделе после одной в/в дозы антитела REGN2477 против активина А и/или антитела REGN1033 против GDF8 у здоровых женщин в постменопаузе в шести группах, включая группы плацебо, антитела против GDF8 (6 мг/кг), антитела против активина А в высокой дозе (10 мг/кг), антитела против GDF8 (6 мг/кг) + антитела против активина А в низкой дозе (1 мг/кг), антитела против GDF8 (6 мг/кг) + антитела против активина А в средней дозе (3 мг/кг) и антитела против GDF8 (6 мг/кг)

+ антитела против активина А в высокой дозе (10 мг/кг). В группе REGN1033+REGN2477 в высокой дозе наблюдалось значительно сниженное различие средних значений LS процентного изменения андройдной жировой массы посредством DXA по сравнению с плацебо на 4 неделе и 8 неделе (*номинальный $p < 0,05$). Значения N для каждой группы показаны на фиг. 2А. Блокирование как активина А, так и GDF8 также связано с уменьшением андройдной жировой массы, которую оценивают с помощью DXA.

На фиг. 8 представлен линейный график, изображающий процентное изменение среднего значения LS с SE объема мышц бедра (за исключением внутримышечной жировой ткани и больших сосудов) на 0, 4 и 8 неделе после одной в/в дозы антитела REGN2477 против активина А и/или антитела REGN1033 против GDF8 у здоровых женщин в постменопаузе в шести группах, включая группы плацебо, антитела против GDF8 (6 мг/кг), антитела против активина А в высокой дозе (10 мг/кг), антитела против GDF8 (6 мг/кг) + антитела против активина А в низкой дозе (1 мг/кг), антитела против GDF8 (6 мг/кг) + антитела против активина А в средней дозе (3 мг/кг) и антитела против GDF8 (6 мг/кг) + антитела против активина А в высокой дозе (10 мг/кг). Значения N для каждой группы показаны на фиг. 2А. По сравнению с плацебо в группах REGN2477+REGN1033 среднего и высокого уровня наблюдалось значительно увеличенное среднее % изменение объема мышц бедра на 4 неделе и 8 неделе. (*Номинальный $p < 0,05$, **номинальный $p < 0,001$).

На фиг. 9 представлен линейный график, изображающий процентное изменение среднего значения LS с SE общей безжировой массы на 0, 4 и 8 неделе после одной в/в дозы антитела REGN2477 против активина А и/или антитела REGN1033 против GDF8 у здоровых женщин в постменопаузе для шести групп, включая группы плацебо, антитела против GDF8 (6 мг/кг), антитела против активина А в высокой дозе (10 мг/кг), антитела против GDF8 (6 мг/кг) + антитела против активина А в низкой дозе (1 мг/кг), антитела против GDF8 (6 мг/кг) + антитела против активина А в средней дозе (3 мг/кг) и антитела против GDF8 (6 мг/кг) + антитела против активина А в высокой дозе (10 мг/кг). Значения N для каждой группы показаны на фиг. 2А. По сравнению с плацебо в группах REGN2477+REGN1033 в средней и высокой дозе наблюдалось значительно увеличенное % изменение общей безжировой массы по сравнению с плацебо на 4 неделе и 8 неделе. (*Номинальный $p < 0,05$).

На фиг. 10 представлен линейный график, изображающий процентное изменение среднего значения LS с SE аппендикулярной безжировой массы тела в кг (рассчитанной по уравнению aLBM) на 0, 4 и 8 неделе после одной в/в дозы антитела REGN2477 против активина А и/или антитела REGN1033 против GDF8 у здоровых женщин в постменопаузе в шести группах, включая группы плацебо, антитела против GDF8, антитела против активина А в высокой дозе (10 мг/кг), антитела против GDF8+антитела против активина А в низкой дозе (1 мг/кг), антитела против GDF8+антитела против активина А в средней дозе (3 мг/кг) и антитела против GDF8+антитела против активина А в высокой дозе (10 мг/кг). Значения N для каждой группы показаны на фиг. 2А. Лечение REGN2477+REGN1033 привело к значительно увеличенному % изменению аппендикулярной безжировой массы тела, рассчитанной по уравнению aLBM (кг), в каждой из групп низкой, средней и высокой дозы на 4 неделе и 8 неделе по сравнению с плацебо (* $p < 0,05$, ** $p < 0,001$).

На фиг. 11 представлен линейный график, изображающий процентное изменение среднего значения LS с SE общей жировой массы, в кг, на 0, 4 и 8 неделе после одной в/в дозы антитела REGN2477 против активина А и/или антитела REGN1033 против GDF8 у здоровых женщин в постменопаузе в шести группах, включая группы плацебо, антитела против GDF8 (6 мг/кг), антитела против активина А в высокой дозе (10 мг/кг), антитела против GDF8+антитела против активина А в низкой дозе (1 мг/кг), антитела против GDF8 (6 мг/кг) + антитела против активина А в средней дозе (3 мг/кг) и антитела против GDF8 (6 мг/кг) + антитела против активина А в высокой дозе (10 мг/кг). Значения N для каждой группы показаны на фиг. 2А. В группе лечения комбинацией REGN2477+REGN1033 в высокой дозе наблюдалось значительно уменьшенное % (изменение) общей жировой массы: -3,92% (группа высокой дозы) по сравнению с плацебо -0,65% на 8 неделе. (*Номинальный $p < 0,05$).

На фиг. 12 представлен линейный график, изображающий процентное изменение среднего значения LS с SE объема мышц бедра, в см³, (включая внутримышечную жировую ткань и большие сосуды) на 0, 4 и 8 неделе после одной в/в дозы антитела REGN2477 против активина А и/или антитела REGN1033 против GDF8 у здоровых женщин в постменопаузе в шести группах, включая группы плацебо, антитела против GDF8, антитела против активина А в высокой дозе (10 мг/кг), антитела против GDF8+антитела против активина А в низкой дозе (1 мг/кг), антитела против GDF8+антитела против активина А в средней дозе (3 мг/кг) и антитела против GDF8+антитела против активина А в высокой дозе (10 мг/кг). Значения N для каждой группы показаны на фиг. 2А. В группах лечения высокой и средней дозой REGN2477+REGN1033 наблюдалось значительно увеличенное % изменение объема мышц бедра, включая внутримышечную жировую ткань и большие сосуды в группах лечения среднего и высокого уровня на 4 неделе и 8 неделе по сравнению с плацебо (*номинальный $p < 0,05$, **номинальный $p < 0,001$).

На фиг. 13 представлен линейный график, изображающий процентное изменение среднего значения LS с SE аппендикулярной безжировой массы (сумма безжировой массы рук и ног), в кг, на 0, 4 и 8 неделе после одной в/в дозы антитела REGN2477 против активина А и/или антитела REGN1033 против GDF8 у

здоровых женщин в постменопаузе в шести группах, включая группы плацебо, антитела против GDF8, антитела против активина А в высокой дозе (10 мг/кг), антитела против GDF8+антитела против активина А в низкой дозе (1 мг/кг), антитела против GDF8+антитела против активина А в средней дозе (3 мг/кг) и антитела против GDF8+антитела против активина А в высокой дозе (10 мг/кг). Значения N для каждой группы показаны на фиг. 2А. Аппендикулярная безжировая масса значительно увеличилась в виде среднего процентного изменения по сравнению с плацебо в каждой из групп лечения REGN2477+REGN1033 низкого, среднего и высокого уровня на 4 и 8 неделе (*номинальный $p < 0,05$, *номинальный* $p < 0,001$).

На фиг. 14 представлен линейный график, изображающий процентное изменение среднего значения LS с SE андройдной жировой массы, в кг, на 0, 4 и 8 неделе после одной в/в дозы антитела REGN2477 против активина А и/или антитела REGN1033 против GDF8 у здоровых женщин в постменопаузе в шести группах, включая группы плацебо, антитела против GDF8, антитела против активина А в высокой дозе (10 мг/кг), антитела против GDF8+антитела против активина А в низкой дозе (1 мг/кг), антитела против GDF8+антитела против активина А в средней дозе (3 мг/кг) и антитела против GDF8+антитела против активина А в высокой дозе (10 мг/кг). Значения N для каждой группы показаны на фиг. 2А. В группе REGN1033+REGN2477 в высокой дозе наблюдалось значительно сниженное % изменение андройдной жировой массы посредством DXA по сравнению с плацебо на 4 неделе и 8 неделе (*номинальный $p < 0,05$).

На фиг. 15 представлен линейный график, изображающий процентное изменение среднего значения LS с SE объема внутримышечной жировой ткани бедра, в см³, на 0, 4 и 8 неделе после одной в/в дозы антитела REGN2477 против активина А и/или антитела REGN1033 против GDF8 у здоровых женщин в постменопаузе в шести группах, включая группы плацебо, антитела против GDF8, антитела против активина А в высокой дозе (10 мг/кг), антитела против GDF8+антитела против активина А в низкой дозе (1 мг/кг), антитела против GDF8+антитела против активина А в средней дозе (3 мг/кг) и антитела против GDF8+антитела против активина А в высокой дозе (10 мг/кг). Значения N для каждой группы показаны на фиг. 2А. В группе REGN1033+REGN2477 в высокой дозе наблюдался увеличенный объем внутримышечной жировой ткани бедра в виде среднего % изменения по сравнению с плацебо на 8 неделе. (*Номинальный $p < 0,05$).

На фиг. 16 представлен линейный график, изображающий процентное изменение среднего значения LS с SE суммы внутримышечной и межмышечной жировой ткани (IMAT) на 0, 4 и 8 неделе после одной в/в дозы антитела REGN2477 против активина А и/или антитела REGN1033 против GDF8 у здоровых женщин в постменопаузе в шести группах, включая плацебо, антитела против GDF8, антитела против активина А в высокой дозе (10 мг/кг), антитела против GDF8+антитела против активина А в низкой дозе (1 мг/кг), антитела против GDF8+антитела против активина А в средней дозе (3 мг/кг) и антитела против GDF8+антитела против активина А в высокой дозе (10 мг/кг) группы. Значения N для каждой группы показаны на фиг. 2А. Группы лечения комбинацией REGN1033+REGN2477 существенно не отличались от плацебо по процентному изменению среднего значения LS с SE суммы внутримышечной и межмышечной жировой ткани (IMAT) на 4 и 8 неделях.

На фиг. 17 представлен линейный график, изображающий процентное изменение среднего значения LS с SE объема подкожной жировой ткани, в см³, на 0, 4 и 8 неделе после одной в/в дозы антитела REGN2477 против активина А и/или антитела REGN1033 против GDF8 у здоровых женщин в постменопаузе в шести группах, включая группы плацебо, антитела против GDF8, антитела против активина А в высокой дозе (10 мг/кг), антитела против GDF8+антитела против активина А в низкой дозе (1 мг/кг), антитела против GDF8+антитела против активина А в средней дозе (3 мг/кг) и антитела против GDF8+антитела против активина А в высокой дозе (10 мг/кг). Значения N для каждой группы показаны на фиг. 2А. В группах лечения REGN1033+REGN2477 низкого и среднего уровня наблюдалось значительно уменьшенное % изменение объема подкожной жировой ткани по сравнению с плацебо на 8 неделе (*номинальный $p < 0,05$).

Подробное описание изобретения

Перед описанием настоящего изобретения следует понимать, что это изобретение не ограничено конкретными описанными композициями, способами и экспериментальными условиями, поскольку такие композиции, способы и условия могут меняться. Также следует понимать, что используемая в данном документе терминология предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения, поскольку объем настоящего изобретения будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения. Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понятно рядовому специалисту в области, к которой относится это изобретение.

Как используется в этом описании и приложенной формуле изобретения, формы единственного числа включают в себя ссылки на множественное число, если из контекста явно не следует иное. Таким образом, например, ссылка на "способ в единственном числе" включает в себя один или несколько способов и/или стадий описанного в данном документе типа и/или которые станут очевидны специалистам в данной области при чтении этого раскрытия.

В рамках настоящего изобретения термин "приблизительно" при использовании в отношении конкретного приведенного числового значения означает, что значение может отличаться от приведенного значения не более на 1%. Например, в рамках настоящего изобретения выражение "приблизительно 100" включает в себя 99 и 101 и все значения между ними (например, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4 и т.д.).

Хотя при практической реализации настоящего изобретения можно использовать любые способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным в данном документе, далее описаны предпочтительные способы и материалы. Все публикации, упомянутые в данном документе, полностью включены в данный документ посредством ссылки.

Антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител в рамках настоящего изобретения термин "антитело" предназначен для обозначения молекул иммуноглобулинов, содержащих четыре полипептидные цепи, две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные дисульфидными связями, а также их мультимеры (например, IgM). Каждая тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи (сокращенно обозначаемую в данном документе как HCVR или V_H) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена, C_{H1} , C_{H2} и C_{H3} . Каждая легкая цепь содержит переменную область легкой цепи (сокращенно обозначаемую в данном документе как LCVR или V_L) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один домен (C_{L1}). Области V_H и V_L можно дополнительно подразделить на области гипервариабельности, называемые определяющие комплементарность области (CDR), с вкраплениями областей, которые являются более консервативными и называются каркасные области (FR). Каждая V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от amino-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В различных вариантах осуществления изобретения FR антител (или их антигенсвязывающих частей) могут быть идентичны последовательностям зародышевой линии человека, или их можно модифицировать естественным или искусственным путем. Аминокислотную консенсусную последовательность можно определить на основе параллельных анализов двух или более CDR.

Антитела могут упоминаться в данном документе согласно следующей номенклатуре: префикс Fc (например "H1M", "H2aM", "H4H"), за которым следует числовой идентификатор (например "10446"), за которым следует суффикс "P", "P2" или "N". Таким образом, согласно этой номенклатуре антитело может упоминаться в данном документе, например, как "H4H10446P2". Префиксы H1M, H2M и H4H в обозначениях антител, используемых в данном документе, указывают на конкретный изотип Fc-области антитела. Например, антитело "H2aM" имеет Fc IgG2a мыши, тогда как антитело "H4H" имеет Fc IgG4 человека. Как будет очевидно рядовому специалисту в данной области, антитело, имеющее конкретный изотип Fc, можно преобразовать в антитело с другим изотипом Fc (например, антитело с Fc IgG2a мыши можно преобразовать в антитело с IgG4 человека и т.д.), но в любом случае переменные домены (включая CDR) останутся такими же, и ожидается, что свойства связывания будут идентичными или по существу аналогичными независимо от природы домена Fc.

В рамках настоящего изобретения термин "антитело" также включает в себя антигенсвязывающие фрагменты полных молекул антител. В рамках настоящего изобретения термины "антигенсвязывающая часть" антитела, "антигенсвязывающий фрагмент" антитела и тому подобное включают в себя любой встречающийся в природе, получаемый ферментативно, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, который специфически связывает антиген с образованием комплекса. Антигенсвязывающие фрагменты антител можно получить, например, из полных молекул антител с использованием любых подходящих стандартных методов, таких как протеолитическое расщепление или методы рекомбинантной геномной инженерии, включающие манипулирование и экспрессию ДНК, кодирующей переменные и необязательно константные домены антитела. Такая ДНК известна и/или легко доступна, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК (включая, например, библиотеки фаг-антител), или ее можно синтезировать. ДНК можно секвенировать и обработать химически или с использованием методов молекулярной биологии, например, для упорядочивания одного или нескольких переменных и/или константных доменов в подходящую конфигурацию или для введения кодонов, создания цистеиновых остатков, модификации, добавления или удаления аминокислот и т.д.

Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают в себя: (i) Fab-фрагменты; (ii) F(ab')₂-фрагменты; (iii) Fd-фрагменты; (iv) Fv-фрагменты; (v) одноцепочечные молекулы Fv (scFv); (vi) dAb-фрагменты; и (vii) минимальные единицы распознавания, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гипервариабельную область антитела (например, выделенную определяющую комплементарность область (CDR), такую как пептид CDR3) или конформационно ограниченный пептид FR3-CDR3-FR4. В рамках настоящего изобретения в выражение "антигенсвязывающий фрагмент" также включены другие сконструированные молекулы, такие как домен-специфические антитела, однодоменные антитела, антитела с удаленным доменом, химерные антитела, антитела с привитыми CDR, диатела, триатела, тетратела, миниантитела, наноантитела (например моновалентные наноантитела, двухвалентные наноантитела и т.д.), малые модульные иммунофармацевтические средства (SMIP) и переменные домены акул антител IgNAR.

Антигенсвязывающий фрагмент антитела обычно содержит по меньшей мере один переменный домен. Переменный домен может иметь любой размер или любой аминокислотный состав и обычно

содержит по меньшей мере одну CDR, которая находится рядом с одной или несколькими каркасными последовательностями или в рамке с ними. В антигенсвязывающих фрагментах, имеющих домен V_H , связанный с доменом V_L , домены V_H и V_L могут быть расположены относительно друг друга в любом подходящем порядке. Например, переменная область может быть димерной и содержать димеры V_H - V_H , V_H - V_L или V_L - V_L . Альтернативно, антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный домен V_H или V_L .

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать по меньшей мере один переменный домен, ковалентно связанный по меньшей мере с одним константным доменом. Неограничивающие иллюстративные конфигурации переменных и константных доменов, который может находиться в антигенсвязывающем фрагменте антитела, используемого в настоящем изобретении, включают в себя: (i) V_H - C_H1 ; (ii) V_H - C_H2 ; (iii) V_H - C_H3 ; (iv) V_H - C_H1 - C_H2 ; (v) V_H - C_H1 - C_H2 - C_H3 ; (vi) V_H - C_H2 - C_H3 ; (vii) V_H - C_L ; (viii) V_L - C_H1 ; (ix) V_L - C_H2 ; (x) V_L - C_H3 ; (xi) V_L - C_H1 - C_H2 ; (xii) V_L - C_H1 - C_H2 - C_H3 ; (xiii) V_L - C_H2 - C_H3 ; и (xiv) V_L - C_L . В любой конфигурации переменных и константных доменов, включая любую из иллюстративных конфигураций, перечисленных выше, переменные и константные домены могут быть либо непосредственно связаны друг с другом, либо могут быть связаны посредством полной или частичной шарнирной или линкерной области. Шарнирная область может состоять из по меньшей мере 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или более) аминокислот, которые приводят к гибкой или полугибкой связи между соседними переменными и/или константными доменами в одной молекуле полипептида. Кроме того, антигенсвязывающий фрагмент антитела, используемого в настоящем изобретении, может содержать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) любой из конфигураций переменного и константного доменов, перечисленных выше, в нековалентной связи друг с другом и/или с одним или несколькими мономерными доменами V_H или V_L (например, с помощью дисульфидной связи (связей)).

Полные молекулы и антигенсвязывающие фрагменты антител могут быть моноспецифическими или мультиспецифическими (например, биспецифическими). Мультиспецифическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела обычно содержит по меньшей мере два разных переменных домена, причем каждый переменный домен способен специфически связываться с отдельным антигеном или с другим эпитопом на одном и том же антигене. Формат любого мультиспецифического антитела можно адаптировать для применения в контексте антитела или антигенсвязывающего фрагмента, описанного в данном документе, с использованием стандартных методов, доступных в данной области.

Антитела, используемые в композициях и способах согласно изобретению, могут действовать посредством комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC) или антитело-зависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC). "Комплемент-зависимая цитотоксичность" (CDC) относится к лизису экспрессирующих антиген клеток антителом согласно изобретению в присутствии комплемента. "Антитело-зависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность" (ADCC) относится к клеточно-опосредованной реакции, в которой неспецифические цитотоксические клетки, которые экспрессируют Fc-рецепторы (FcR) (например, натуральные клетки-киллеры (NK), нейтрофилы и макрофаги), распознают связанное антитело на клетке-мишени и, таким образом, приводят к лизису клетки-мишени. CDC и ADCC можно измерить с использованием хорошо известных и доступных в данной области анализов. (См., например, патенты США №№ 5500362 и 5821337 и Clynes et al. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 95:652-656(1998)).

Антитела, описанные в данном документе, могут содержать или состоять из человеческих антител и/или рекомбинантных человеческих антител или их фрагментов. В рамках настоящего изобретения термин "человеческое антитело" включает в себя антитела, имеющие переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. Тем не менее человеческие антитела могут содержать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулинов зародышевой линии человека (например, мутации, введенные посредством случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или посредством соматической мутации *in vivo*), например, в CDR и в конкретной CDR3. Однако в рамках настоящего изобретения термин "человеческое антитело" не предназначен для включения антител, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии другого вида млекопитающих, такого как мышь, были привиты на каркасные последовательности человека.

Молекулы антител, описанные в данном документе, могут содержать или состоять из рекомбинантных человеческих антител или их антигенсвязывающих фрагментов. В рамках настоящего изобретения термин "рекомбинантное человеческое антитело" предназначен для включения всех человеческих антител, которые получены, экспрессированы, созданы или выделены с помощью рекомбинантных средств, таких как антитела, экспрессированные с использованием рекомбинантного вектора экспрессии, трансфицированного в клетку-хозяин, антитела, выделенные из рекомбинантной, комбинаторной библиотеки человеческих антител, антитела, выделенные у животного (например, мыши), которое является трансгенным по генам иммуноглобулинов человека (см., например, Taylor et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295), или антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любыми другими способами, которые включают сплайсинг последовательностей гена иммуноглобулина человека с

другими последовательностями ДНК. Такие рекомбинантные человеческие антитела имеют вариабельные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. Однако в некоторых вариантах осуществления такие рекомбинантные человеческие антитела подвергают мутагенезу *in vitro* (или соматическому мутагенезу *in vivo* при использовании животного, трансгенного по последовательностям Ig человека) и, таким образом, аминокислотные последовательности областей V_H и V_L рекомбинантных антител представляют собой последовательности, которые, хотя и получены из последовательностей V_H и V_L зародышевой линии человека и связаны с ними, могут не существовать в природе в репертуаре зародышевой линии человеческих антител *in vivo*. Рекомбинантные антитела можно использовать в дополнительном варианте осуществления композиций и способов согласно изобретению.

В рамках настоящего изобретения "выделенное антитело" означает антитело, которое было идентифицировано и выделено и/или извлечено из по меньшей мере одного компонента его естественного окружения. Например, антитело, которое было выделено или извлечено из по меньшей мере одного компонента организма, ткани или клетки, в которой антитело существует в естественных условиях или вырабатывается в естественных условиях, является "выделенным антителом" для целей изобретения. Выделенное антитело также включает в себя антитело *in situ* в рекомбинантной клетке, а также антитело, которое было подвергнуто по меньшей мере одной стадии очистки или выделения. Согласно некоторым вариантам осуществления выделенное антитело может по существу не содержать другой клеточный материал и/или химические вещества. Выделенные антитела можно использовать в дополнительном варианте осуществления композиций и способов согласно изобретению.

Белок или полипептид является "по существу чистым", "по существу гомогенным" или "по существу очищенным", когда по меньшей мере приблизительно 60-75% образца составляет полипептид одного вида. Полипептид или белок может быть мономерным или мультимерным. По существу чистый полипептид или белок обычно содержит приблизительно 50, 60, 70, 80 или 90% м/м чистого образца белка, обычно приблизительно 95% и предпочтительно более 99%. Чистоту или гомогенность белка можно определить с помощью ряда средств, хорошо известных в данной области, таких как хорошо известный в данной области электрофорез образца белка в полиакриламидном геле с последующей визуализацией единственной полипептидной полосы при окрашивании геля красителем. Для некоторых целей более высокое разрешение можно обеспечить за счет использования HPLC или других средств очистки, хорошо известных в данной области.

В рамках настоящего изобретения термин "аналог или вариант полипептида" относится к полипептиду, который состоит из сегмента из по меньшей мере 25 аминокислот, который имеет существенную идентичность с частью аминокислотной последовательности и который обладает по меньшей мере одним из следующих свойств: (1) специфическое связывание с GDF8 в подходящих условиях связывания или (2) способность блокировать биологическую активность GDF8. Обычно, аналоги или варианты полипептидов содержат консервативную аминокислотную замену (или вставку или делецию) по отношению к встречающейся в природе последовательности. Аналоги обычно имеют по меньшей мере 20 аминокислот в длину, по меньшей мере 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150 или 200 аминокислот в длину или более и часто могут иметь длину полноразмерного существующего в природе полипептида.

Предпочтительными аминокислотными заменами являются замены, которые: (1) снижают чувствительность к протеолизу, (2) снижают чувствительность к окислению, (3) изменяют аффинность связывания для образования белковых комплексов, (4) изменяют аффинности связывания и (4) придают или модифицируют другие физико-химические или функциональные свойства таких аналогов. Аналоги могут содержать различные мутации последовательности, отличающейся от существующей в природе пептидной последовательности. Например, одну или множество аминокислотных замен (предпочтительно консервативных аминокислотных замен) можно сделать во встречающейся в природе последовательности (предпочтительно в части полипептида за пределами домена (доменов), образующего межмолекулярные контакты. Консервативная аминокислотная замена не должна существенно изменять структурные характеристики исходной последовательности (например, замещающая аминокислота не должна иметь тенденцию к разрыву спирали, которая встречается в исходной последовательности, или к нарушению других типов вторичной структуры, которая характеризует исходную последовательность). Примеры признанных в данной области вторичных и третичных структур полипептидов описаны в *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton 1984 W. H. Freeman and Company, новый York; *Introduction to Protein Structure* (Branden & Tooze, eds. 1991, Garland Publishing, NY); и в Thornton et al. 1991 Nature 354:105, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки.

Непептидные аналоги широко используются в фармацевтической промышленности в качестве лекарств со свойствами, аналогичными свойствам матричного пептида. Эти типы непептидных соединений называются "пептидными миметиками" или "пептидомиметиками" (см., например, Fauchere (1986) J. Adv. Drug Res. 15:29; и Evans et al. (1987) J. Med. Chem. 30:1229, которые включены в данный документ посредством ссылки. Системную замену одной или нескольких аминокислот консенсусной последовательности D-аминокислотой того же типа (например, D-лизин вместо L-лизина) также можно использовать для создания более стабильных пептидов. Кроме того, конформационно ограниченные пептиды,

содержащие консенсусную последовательность или по существу идентичный вариант консенсусной последовательности, можно получить с помощью способов, известных в данной области (Rizo et al. (1992) *Ann. Rev. Biochem.* 61:387, включенный в данный документ посредством ссылки), например, путем добавления внутренних цистеиновых остатков, способных образовывать внутримолекулярные дисульфидные мостики, которые циклизуют пептид.

Применительно к полипептидам термин "существенная идентичность" или "по существу идентичный" означает, что две пептидные последовательности при оптимальном выравнивании, например, с помощью программ GAP или BESTFIT с использованием по умолчанию штрафов за гэп, имеют по меньшей мере приблизительно 80% идентичность последовательностей, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 98% или по меньшей мере приблизительно 99% идентичность последовательностей. Предпочтительно, чтобы позиции остатков, которые не являются идентичными, отличались консервативными аминокислотными заменами. "Консервативной аминокислотной заменой" является замена, в которой аминокислотный остаток заменен на другой аминокислотный остаток, имеющий боковую цепь (R группу) с аналогичными химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). В общем, консервативная аминокислотная замена существенно не изменяет функциональные свойства белка. В случаях, когда две или более аминокислотные последовательности отличаются друг от друга консервативными заменами, процент идентичности последовательности или степень сходства можно повысить для корректировки консервативного характера замены. Средства выполнения этой регулировки хорошо известны специалистам в данной области. См., например, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24:307-331, включенный в данный документ посредством ссылки. Примеры групп аминокислот, которые имеют боковые цепи с аналогичными химическими свойствами, включают в себя: 1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; 2) алифатические гидроксильные боковые цепи: серин и треонин; 3) содержащие амид боковые цепи: аспарагин и глутамин; 4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; 5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин и 6) серосодержащие боковые цепи представляют собой цистеин и метионин. Предпочтительными консервативными группами замен аминокислот являются: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин. Альтернативно, консервативной заменой является любое изменение, имеющее положительное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250, раскрытой в Gonnet et al. (1992) *Science* 256:1443-45, включенном в данный документ посредством ссылки. "Умеренно консервативной" заменой является любое изменение, имеющее неотрицательное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250.

Сходство последовательностей полипептидов, которое также называется идентичность последовательностей, обычно измеряют с использованием программного обеспечения для анализа последовательностей. Программное обеспечение для анализа белков сопоставляет аналогичные последовательности с использованием мер сходства, относящихся к различным заменам, делециям и другим модификациям, включая консервативные аминокислотные замены. Например, GCG содержит программы, такие как "Gap" и "Bestfit", которые можно использовать с параметрами по умолчанию, для определения гомологии последовательностей или идентичности последовательностей между близкородственными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды из разных видов организмов или между белком дикого типа и его мутантом. См., например, GCG Version 6.1. Полипептидные последовательности также можно сравнивать с помощью FASTA с использованием параметров по умолчанию или рекомендуемых параметров, программы в GCG Version 6.1. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) обеспечивает выравнивание и процент идентичности последовательностей областей наилучшего перекрытия между последовательностями запроса и поиска (Pearson (2000), см. выше). Другим предпочтительным алгоритмом при сравнении последовательности изобретения с базой данных, содержащей большое количество последовательностей от разных организмов, является компьютерная программа BLAST, особенно blastp или tblastn, с использованием параметров по умолчанию. См., например, Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410 и Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки.

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

В некоторых вариантах осуществления изобретения относится к способу изменения состава тела субъекта, включающему введение субъекту первой композиции, содержащей эффективное количество ингибитора GDF8, и второй композиции, содержащей эффективное количество ингибитора активина А.

В некоторых вариантах осуществления изобретения относится к способу стимулирования уменьшения жировой массы у субъекта, включающему введение субъекту первой композиции, содержащей эффективное количество ингибитора GDF8, и второй композиции, содержащей эффективное количество

ингибитора активина А.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способу стимулирования увеличения мышечной массы у субъекта, причем способ включает введение нуждающемуся в этом субъекту первой композиции, содержащей эффективное количество ингибитора GDF8, и второй композиции, содержащей эффективное количество ингибитора активина А.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способу изменения состава тела субъекта, включающему введение субъекту композиции, содержащей эффективное количество ингибитора GDF8 и эффективное количество ингибитора активина А.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способу стимулирования уменьшения жировой массы у субъекта, включающему введение субъекту композиции, содержащей эффективное количество ингибитора GDF8 и эффективное количество ингибитора активина А.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способу стимулирования увеличения мышечной массы у субъекта, причем способ включает введение нуждающемуся в этом субъекту композиции, содержащей эффективное количество ингибитора GDF8 и эффективное количество ингибитора активина А.

В некоторых вариантах осуществления субъектом является субъект-человек. Субъект-человек может быть взрослым субъектом-человеком. Субъект может быть субъектом мужчиной или женщиной. Субъект может быть здоровым субъектом. Субъект может иметь нежелательную жировую массу. Субъект может иметь или иметь риск получить заболевание и расстройство, характеризующееся повышенной жировой массой и/или уменьшенным объемом мышц или уменьшенной безжировой массой тела. Субъект может быть субъектом-женщиной в постменопаузе. Субъект может быть субъектом-мужчиной или субъектом-женщиной в возрасте 40 лет или старше, в возрасте 50 лет или старше, в возрасте 60 лет или старше или в возрасте 70 лет или старше.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способу, включающему введение нуждающемуся в этом субъекту композиции, содержащей ингибитор GDF8, и композиции, содержащей ингибитор активина А, для лечения или профилактики заболевания и расстройства, характеризующегося повышенной жировой массой и/или уменьшенным объемом мышц или уменьшенной безжировой массой тела.

В некоторых вариантах осуществления согласно изобретению субъект имеет по меньшей мере одно заболевание или расстройство, которое может быть связано с увеличенной жировой массой. В некоторых вариантах осуществления заболевание или расстройство можно выбрать из группы, состоящей из ожирения, метаболических синдромов, нарушений питания, высокого холестерина, дислипидемии, сердечно-сосудистых заболеваний, целлюлита, рака (включая толстой кишки, пищевода, почки, поджелудочной железы, желчного пузыря, молочной железы или эндометрия), синдрома поликистозных яичников, подагры, заболевания желчного пузыря, апноэ во сне, респираторного расстройства, астмы, остеоартрита, катаракты, застойной сердечной недостаточности, увеличенного сердца, высокого кровяного давления/гипертонии, тромбоза легочной артерии, лимфедемы, гастроэзофагеальной рефлюксной болезни, грыжи, хронической почечной недостаточности, недержания мочи, заболеваний соединительной ткани и жировой болезни печени. В другом варианте осуществления заболеванием или расстройством может быть саркопения.

Ингибиторы GDF8

В настоящем изобретении представлены способы изменения состава тела, стимулирования уменьшения жировой массы и увеличения безжировой массы у субъекта и способы лечения заболевания или расстройства, характеризующегося повышенной жировой массой у субъекта, включающие введение субъекту композиции, содержащей эффективное количество ингибитора GDF8.

Термин "GDF8" (также называемый "фактор роста и дифференцировки 8" и "миостатин") означает белок, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 340 (зрелый белок). Согласно настоящему изобретению специфические к GDF8 белки связывания специфически связывают GDF8, но не связывают другие лиганды ActRIIB, такие как GDF3, BMP2, BMP4, BMP7, BMP9, BMP10, GDF11, активин А, активин В, активин АВ, Nodal и т.д.

В рамках настоящего изобретения "ингибитор GDF8" представляет собой любое средство, которое связывается или взаимодействует с GDF8 человека и препятствует или ингибирует нормальную биологическую функцию GDF8 *in vitro* или *in vivo*. Неограничивающие примеры категорий ингибиторов GDF8 включают в себя низкомолекулярные антагонисты GDF8, ингибиторы экспрессии или активности GDF8 на основе нуклеиновой кислоты (например, siRNA или антисмысловые), молекулы на основе пептидов, которые специфически взаимодействуют с GDF8 (например, пептитела), рецепторные молекулы, которые специфически взаимодействуют с GDF8, связывающие GDF8 молекулы-скаффолды, белки, содержащие связывающую лиганд часть рецептора, который специфически связывает GDF8, и аптамеры против GDF8 или их части. В предпочтительном варианте осуществления ингибитор GDF8, который можно использовать в контексте настоящего изобретения, представляет собой антитело против GDF8 или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывает GDF8 человека. Антитела против GDF8 включают в себя нейтрализующие и/или блокирующие антитела. Ингибирование, вызванное ней-

трализирующими и/или блокирующими антителами против GDF8, не обязательно должно быть полным, при условии, что его можно обнаружить с использованием соответствующих анализов.

В рамках настоящего изобретения выражение "антитела против GDF8" также включает в себя мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы (например, биспецифические антитела), причем по меньшей мере один связывающий домен (например, "связывающий фрагмент") мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы специфически связывает GDF8.

Иллюстративные антитела против GDF8, которые можно использовать в композициях и способах согласно изобретению, включают в себя, например, полностью человеческие антитела H4H1657N2 против GDF8, также известные как REGN1033, (например, антитела против GDF8, содержащие переменные области тяжелой и легкой цепей, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 360 и SEQ ID NO: 368, соответственно, которые представлены в патенте США № 8840894). Другие антагонисты GDF8, которые можно использовать в композициях и способах согласно изобретению, включают в себя антитела против GDF8 (например, антитело, обозначенное 2_112_1, например, имеющее обозначение РТА-6574 депонирования ATCC, или, например, 2_112_K, например, имеющее аминокислотные последовательности HCVR/LCVR SEQ ID NO: 620 и 621), которые представлены в US 2006/0263354 и патенте США № 7807159; антитела против GDF8 (например, 12A5-5, например, имеющие аминокислотные последовательности HCVR/LCVR SEQ ID NO: 622 и 623), которые представлены в патенте США № 8999343 и US публикации № 2013/0209489; антитела против GDF8 (например, 10B3H8L5, например, имеющие аминокислотные последовательности HCVR/LCVR SEQ ID NO: 624 и 625, и 10B3H8L5-Fc-деактивированные), которые представлены в US публикации № 2013/0142788; антитела против GDF8 (например, стаумумаб/MYO-29, например, имеющие аминокислотные последовательности HCVR/LCVR SEQ ID NO: 626 и 627), которые представлены в патентах США №№ 8940874 и 7261893; антитела против GDF8 (например, RK22/PF-0625616, например, имеющие аминокислотные последовательности HCVR/LCVR SEQ ID NO: 628 и 629), которые представлены в патенте США № 8415459; антитела против GDF8 (например, JA-16, например, имеющие CDR аминокислотной последовательности HCVR SEQ ID NO: 630), которые представлены в патенте США № 7731961; антитела против GDF8 (например, RK35, например, имеющие аминокислотные последовательности HCVR/LCVR SEQ ID NO: 631 и 632), которые представлены в патентах США №№ 8496934 или 7888486, антитела против GDF8 (например, OGD1.0.0, например, имеющие аминокислотные последовательности HCVR/LCVR SEQ ID NO: 633 и 634), которые представлены в патенте США № 8992913; молекулы Fab против GDF8, которые представлены в Европейском патенте № 1773041 B1, и антитела против GDF8 (например, C12, например, имеющие аминокислотные последовательности HCVR/LCVR SEQ ID NO: 635 и 636, C12-N93H, и/или 510C2, имеющее аминокислотные последовательности HCVR/LCVR SEQ ID NO: 637 и 638), которые представлены, например, в патентах США №№ 7635760 и 8063188, антитела против GDF8 (например, 41C1E4/ландгрозумаб/LY2495655, например, имеющие аминокислотные последовательности HCVR/LCVR SEQ ID NO: 639 и 640), которые представлены в патенте США № 7632499. В некоторых вариантах осуществления антитела против GDF8 могут иметь аминокислотные последовательности полноразмерной тяжелой цепи и полноразмерной легкой цепи ландгрозумаба, например, SEQ ID NO 641 и 642, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитела против GDF8 могут содержать три CDR тяжелой цепи (HCDR) и три CDR легкой цепи (LCDR) ландгрозумаба, например, по определению Chothia, согласно SEQ ID NO: 643/644/645/646/647/648 соответственно.

В одном варианте осуществления антитело против GDF8 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи (HCVR), имеющую аминокислотную последовательность, выбираемую из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290, 306, 360 и 376, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательностей.

В другом варианте осуществления антитело против GDF8 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность переменной области легкой цепи (LCVR), выбираемую из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298, 314, 322, 368 и 384, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательностей.

В другом варианте осуществления антитело против GDF8 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность HCVR и аминокислотную последовательность LCVR, причем пару последовательностей HCVR/LCVR выбирают из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/282, 290/298, 306/314, 114/322, 360/368 и 376/384.

В другом варианте осуществления антитело против GDF8 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность HCVR и аминокислотную последовательность LCVR, причем пару последовательностей HCVR/LCVR выбирают из группы, состоящей из (HCVR/LCVR): 21-E5 (SEQ ID NO: 34/42); 21-B9 (SEQ ID NO: 18/26); 21-E9 (SEQ ID NO: 98/106); 21-A2 (SEQ ID NO: 2/10);

22-D3 (SEQ ID NO: 50/58); 22-E6 (SEQ ID NO: 66/74); 22-G10 (SEQ ID NO: 82/90); 1A2 (SEQ ID NO: 226/234); 20B12 (SEQ ID NO: 274/282); 58C8 (SEQ ID NO: 242/250); 19F2 (SEQ ID NO: 258/266); 8D12-1 (SEQ ID NO: 114/122); 4E3-7 (SEQ ID NO: 194/202); 9B11-12 (SEQ ID NO: 162/170); 4B9 (SEQ ID NO: 226/234); 1H4-5 (SEQ ID NO: 210/218); 9B4-3 (SEQ ID NO: 178/186); 3E2-1 (SEQ ID NO: 290/298); 4G3-25 (SEQ ID NO: 306/314); 4B6-6 (SEQ ID NO: 130/138); H4H1657N2 (SEQ ID NO: 360/368); H4H1669P (SEQ ID NO: 376/384).

В другом варианте осуществления антитело против GDF8 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит домен определяющей комплементарности области 3 (HCDR3) тяжелой цепи и домен CDR3 (LCDR3) легкой цепи, причем домен HCDR3 имеет аминокислотную последовательность, выбираемую из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136, 152, 168, 184, 200, 216, 232, 248, 264, 280, 296, 312, 366 и 382, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательностей, и домен LCDR3 имеет аминокислотную последовательность, выбираемую из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 144, 160, 176, 192, 208, 224, 240, 256, 272, 288, 304, 320, 328, 374 и 390, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательностей. В другом варианте осуществления антитело против GDF8 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит пару аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3, выбираемых из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8/16, 24/32, 40/48, 56/64, 72/80, 88/96, 104/112, 120/128, 136/144, 152/160, 168/176, 184/192, 200/208, 216/224, 232/240, 248/256, 264/272, 280/288, 296/304, 312/320, 328/336, 366/374 и 382/390.

В другом варианте осуществления антитело против GDF8 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит домены CDR1 (HCDR1) и CDR2 (HCDR2) тяжелой цепи и домены CDR1 (LCDR1) и CDR2 (LCDR2) легкой цепи, причем домен HCDR1 имеет аминокислотную последовательность, выбираемую из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 116, 132, 148, 164, 180, 196, 212, 228, 244, 260, 276, 292, 308, 362 и 378, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательностей; домен HCDR2 имеет аминокислотную последовательность, выбираемую из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 118, 134, 150, 166, 182, 198, 214, 230, 246, 262, 278, 294, 310, 364 и 380, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательностей; домен LCDR1 имеет аминокислотную последовательность, выбираемую из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 28, 44, 60, 76, 92, 108, 124, 140, 156, 172, 188, 204, 220, 236, 252, 268, 284, 300, 316, 324, 370 и 386, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательностей, а домен LCDR2 имеет аминокислотную последовательность, выбираемую из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 30, 46, 62, 78, 94, 110, 126, 142, 158, 174, 190, 206, 222, 238, 254, 270, 286, 302, 318, 326, 372 и 388, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательностей. В другом варианте осуществления домены HCDR1, HCDR2 и HCDR3 имеют соответствующие комбинации аминокислотных последовательностей, выбираемых из группы, состоящей из SEQ ID NO: 36/38/40, 116/118/120, 228/230/232, 362/364/366 и 378/380/382; а домены LCDR1, LCDR2 и LCDR3 имеют соответствующие комбинации аминокислотных последовательностей, выбираемых из группы, состоящей из SEQ ID NO: 44/46/48, 124/126/128, 236/238/240, 370/372/374 и 386/388/390.

В еще одном варианте осуществления домены CDR тяжелой и легкой цепей антитела против GDF8 или его антигенсвязывающего фрагмента (HCDR1/HCDR2/HCDR3/LCDR1/LCDR2/LCDR3) имеют комбинации аминокислотных последовательностей, выбираемых из группы, состоящей из SEQ ID NO: 36/38/40/44/46/48 (например, 21-E5), 116/118/120/124/126/128 (например, 8D12), 228/230/232/236/238/240 (например, 1A2), 362/364/366/370/372/374 (например, H4H1657N2) и 378/380/382/386/388/390 (например, H4H1669P).

В другом варианте осуществления антитело против GDF8 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит домены CDR тяжелой и легкой цепей, содержащиеся в парах аминокислотных последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепей (HCVR/LCVR), выбираемых из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/282, 290/298, 306/314, 114/322, 360/368 и 376/384.

Способы и методы идентификации CDR в аминокислотных последовательностях HCVR и LCVR хорошо известны в данной области, и их можно использовать для идентификации CDR в указанных аминокислотных последовательностях HCVR и/или LCVR, раскрытых в данном документе. Иллюстративные соглашения, которые можно использовать для идентификации границ CDR, включают в себя, например, определение Kabat, определение Chothia и определение AbM. В общих чертах, определение Kabat основано на вариабельности последовательности, определение Chothia основано на местоположении

структурных петлевых областей, а определение AbM представляет собой компромисс между подходами Kabat и Chothia. См., например, Kabat "Sequences of Proteins of Immunological Interest" National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani et al. J. Mol. Biol. 273:927-948 (1997) и Martin et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:9268-9272 (1989). Также для идентификации последовательностей CDR внутри антигена доступны открытые базы данных.

В одном варианте осуществления антитело против GDF8 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HCVR, имеющую аминокислотную последовательность, закодированную последовательностью нуклеиновой кислоты, выбираемой из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 17, 33, 49, 65, 81, 97, 113, 129, 145, 161, 177, 193, 209, 225, 241, 257, 273, 289, 305, 359 и 375, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательностей.

В другом варианте осуществления антитело против GDF8 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит LCVR, имеющую аминокислотную последовательность, закодированную последовательностью нуклеиновой кислоты, выбираемой из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9, 25, 41, 57, 73, 89, 105, 121, 137, 153, 169, 185, 201, 217, 233, 249, 265, 281, 297, 313, 321, 367 и 383, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательностей.

В другом варианте осуществления антитело против GDF8 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит пару HCVR/LCVR, имеющих аминокислотные последовательности, закодированные парой молекул нуклеиновой кислоты, выбираемых из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1/9, 17/25, 33/41, 49/57, 65/73, 81/89, 97/105, 113/121, 129/137, 145/153, 161/169, 177/185, 193/201, 209/217, 225/233, 241/249, 257/265, 273/281, 289/297, 305/313, 113/321, 359/367 и 375/383.

В другом варианте осуществления антитело против GDF8 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит домен HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, закодированную последовательностью нуклеиновой кислоты, выбираемой из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, 23, 39, 55, 71, 87, 103, 119, 135, 151, 167, 183, 199, 215, 231, 247, 263, 279, 295, 311, 365 и 381, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательностей, и домен LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, закодированную последовательностью нуклеиновой кислоты, выбираемой из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15, 31, 47, 63, 79, 95, 111, 127, 143, 159, 175, 191, 207, 223, 239, 255, 271, 287, 303, 319, 327, 373 и 389, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательностей. В одном варианте осуществления пара доменов HCDR3/LCDR3 имеет аминокислотные последовательности, закодированные парой последовательностей нуклеиновой кислоты, выбираемых из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7/15, 23/31, 39/47, 55/63, 71/79, 87/95, 103/111, 119/127, 135/143, 151/159, 167/175, 183/191, 199/207, 215/223, 231/239, 247/255, 263/271, 279/287, 295/303, 311/319, 119/327, 365/373 и 381/389.

В другом варианте осуществления антитело против GDF8 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит домены HCDR1 и HCDR2 и домены LCDR1 и LCDR2, причем домен HCDR1 имеет аминокислотную последовательность, закодированную последовательностью нуклеиновой кислоты, выбираемой из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, 19, 35, 51, 67, 83, 99, 115, 131, 147, 163, 179, 195, 211, 227, 243, 259, 275, 291, 307, 361 и 377, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательностей, домен HCDR2 имеет аминокислотную последовательность, закодированную последовательностью нуклеиновой кислоты, выбираемой из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 21, 37, 53, 69, 85, 101, 117, 133, 149, 165, 181, 197, 213, 229, 245, 261, 277, 293, 309, 363 и 379, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательностей, домен LCDR1 имеет аминокислотную последовательность, закодированную последовательностью нуклеиновой кислоты, выбираемой из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11, 27, 43, 59, 75, 91, 107, 123, 139, 155, 171, 187, 203, 219, 235, 251, 267, 283, 299, 315, 323, 369 и 385, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательностей, а домен LCDR2 имеет аминокислотную последовательность, закодированную последовательностью нуклеиновой кислоты, выбираемой из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, 29, 45, 61, 77, 93, 109, 125, 141, 157, 173, 189, 205, 221, 237, 253, 269, 285, 301, 317, 325, 371 и 387.

В другом варианте осуществления антитело против GDF8 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит домены CDR тяжелой и легкой цепей (HCDR1/HCDR2/HCDR3/LCDR1/LCDR2/LCDR3), имеющие комбинации аминокислотных последовательностей, закодированных набором последовательностей нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 35/37/39/43/45/47, 115/117/119/123/125/127, 227/229/231/235/237/239, 361/363/365/369/371/373 или 377/379/381/385/387/389.

В предпочтительном варианте осуществления антитело против GDF8 или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывает GDF8, содержит HCDR варибельной области тяжелой цепи

(HCVR), содержащие SEQ ID NO: 360, и LCDR варибельной области легкой цепи (LCVR), содержащие SEQ ID NO: 368. В другом варианте осуществления антитело против GDF8 или антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывает GDF8, содержит три HCDR, содержащие SEQ ID NO: 362, SEQ ID NO: 364 и SEQ ID NO: 366, и три LCDR, содержащие SEQ ID NO: 370, SEQ ID NO: 372 и SEQ ID NO: 374.

В другом варианте осуществления антитело против GDF8 или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой полностью человеческое или гуманизованное антитело или фрагмент антитела, который связывает GDF8 с аффинностью (выраженной в виде константы диссоциации, "KD") от приблизительно 1 нМ или менее, которое измеряют с помощью анализа с использованием поверхностного плазмонного резонанса (например, BIACORE™). В некоторых вариантах осуществления антитело согласно изобретению демонстрирует KD приблизительно 700 пМ или менее; приблизительно 500 пМ или менее; приблизительно 320 пМ или менее; приблизительно 160 пМ или менее; приблизительно 100 пМ или менее; приблизительно 50 пМ или менее; приблизительно 10 пМ или менее; или приблизительно 5 пМ или менее.

В другом варианте осуществления антитело против GDF8 или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой полностью человеческое или гуманизованное моноклональное антитело (mAb), которое специфически связывается и ингибирует GDF8 человека и демонстрирует IC50 меньше или равно приблизительно 10 нМ; приблизительно 5 нМ или менее; приблизительно 3 нМ или менее; приблизительно 2 нМ или менее; приблизительно 1 нМ или менее; приблизительно 500 пМ или менее; или приблизительно 200 пМ или менее, которую измеряют с помощью анализ люциферазы, индуцируемой GDF8.

В одном варианте осуществления антитело против GDF8 или его антигенсвязывающий фрагмент имеет модифицированный профиль гликозилирования. В некоторых вариантах применения может быть полезна модификация для удаления нежелательных сайтов гликозилирования или антитело с отсутствующим фрагментом фукозы, присутствующим в олигосахаридной цепи, например, для усиления функции антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) (Shield et al. (2002) JBC 277:26733). В других вариантах применения можно осуществить модификацию галактозилирования для модификации комплементзависимой цитотоксичности (CDC).

В другом варианте осуществления антитело против GDF8 или его антигенсвязывающий фрагмент конкурирует за специфическое связывание с GDF8 с другим антителом, содержащим комбинацию доменов HCDR1/HCDR2/HCDR3/LCDR1/LCDR2/LCDR3, имеющих аминокислотные последовательности, выбираемые из группы, состоящей из SEQ ID NO: 36/38/40/44/46/48, 116/118/120/124/126/128, 228/230/232/236/238/240, 362/364/366/370/372/374 или 378/380/382/386/388/390. В другом варианте осуществления антитело против GDF8 или его антигенсвязывающий фрагмент конкурирует за специфическое связывание с GDF8 с другим антителом, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/282, 290/298, 306/314, 114/322, 360/368 или 376/384.

В другом варианте осуществления антитело против GDF8 или его антигенсвязывающий фрагмент распознает эпитоп на GDF8, который распознается другим антителом, содержащим комбинацию доменов HCDR1/HCDR2/HCDR3/LCDR1/LCDR2/LCDR3, имеющих аминокислотные последовательности, выбираемые из группы, состоящей из SEQ ID NO: 36/38/40/44/46/48, 116/118/120/124/126/128, 228/230/232/236/238/240, 362/364/366/370/372/374 или 378/380/382/386/388/390. В другом варианте осуществления антитело против GDF8 или его антигенсвязывающий фрагмент распознает эпитоп на GDF8, который распознается другим антителом, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/282, 290/298, 306/314, 114/322, 360/368 или 376/384.

Ингибиторы активина А

В настоящем изобретении представлены способы изменения состава тела, стимулирования уменьшения жировой массы и/или увеличения безжировой массы у субъекта и способы лечения заболевания или расстройства, характеризующегося повышенной жировой массой у субъекта, включающие введение субъекту композиции, содержащей эффективное количество ингибитора активина А.

В рамках настоящего изобретения "ингибитор активина А" представляет собой любое средство, которое связывается или взаимодействует с человеческим активинном А и препятствует или ингибирует нормальную биологическую функцию активина А *in vitro* или *in vivo*. Неограничивающие примеры категорий ингибиторов активина А включают в себя низкомолекулярные антагонисты активина А, ингибиторы на основе нуклеиновой кислоты экспрессии или активности активина А (например, siRNA или антисмысловые), молекулы на основе пептидов, которые специфически взаимодействуют с активинном А (например, пептитела), рецепторные молекулы, которые специфически взаимодействуют с активинном А, молекулы-скаффолды, связывающие активин А, белки, содержащие связывающую лиганд часть рецептора, который специфически связывает активин А, и аптамеры против активина А или их части. В пред-

почтительном варианте осуществления ингибитор активина А, который можно использовать в контексте настоящего изобретения, представляет собой антитело против активина А или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывает активин А человека. Антитела против активина А включают в себя нейтрализующие и/или блокирующие антитела. Ингибирование, вызванное нейтрализующими и/или блокирующими антителами против активина А, не обязательно должно быть полным, при условии, что его можно обнаружить с использованием соответствующих анализов.

Активины представляют собой гомо и гетеродимерные молекулы, содержащие субъединицы β A и/или β B. Субъединица β A имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 617, а субъединица β B имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 619. Активин А представляет собой гомодимер из двух субъединиц β A; активин В представляет собой гомодимер из двух субъединиц β B; а активин АВ представляет собой гетеродимер из одной субъединицы β A и одной субъединицы β B. Антитело против активина А или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывает субъединицу β A. Поскольку субъединица β A найдена как в молекулах активина А, так и активина АВ, "антитело против активина А или его антигенсвязывающий фрагмент" могут специфически связывать активин А, а также активин АВ (благодаря своему взаимодействию с субъединицей β A). Вследствие этого антитело против активина А или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывает активин А или активин А и активин АВ, но не связывает другие лиганды ActRIIB, такие как активин В, GDF3, GDF8, BMP2, BMP4, BMP7, BMP9, BMP10, GDF11, Nodal и т.д.

В некоторых вариантах осуществления используют антитело против активина А или его антигенсвязывающий фрагмент, которые представлены в патенте США № 9718881. Иллюстративные антитела против активина А, которые можно использовать в композициях и способах согласно изобретению, включают в себя, например, полностью человеческие антитела H4N10446P2 против активина А, также известные как REGN2477, (например, антитела против активина А, содержащие переменные области тяжелой и легкой цепей, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 162 и SEQ ID NO: 146 соответственно, которые представлены в патенте США № 9718881).

В табл. 2 представлены пары аминокислотных последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепей выбранных антител против активина А и их соответствующие идентификаторы антител, которые можно использовать в композициях и способах согласно изобретению. Соответствующие идентификаторы последовательностей нуклеиновой кислоты представлены в табл. 3.

Таблица 2. Идентификаторы аминокислотных последовательностей антител против активина А

SEQ ID NO:								
Обозначение Антитела	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H4N10423P	393	395	397	399	401	403	405	407
H4N10424P	409	411	413	415	417	419	421	423
H4N10426P	425	427	429	431	433	435	437	439
H4N10429P	441	443	445	447	449	451	453	455
H4N10430P	457	459	461	463	465	467	469	471
H4N10432P2	473	475	477	479	481	483	485	487
H4N10433P2	489	491	493	495	481	483	485	487
H4N10436P2	497	499	501	503	481	483	485	487
H4N10437P2	505	507	509	511	481	483	485	487
H4N10438P2	513	515	517	519	481	483	485	487
H4N10440P2	521	523	525	527	481	483	485	487
H4N10442P2	529	531	533	535	537	539	541	543
H4N10445P2	545	547	549	551	537	539	541	543
H4N10446P2	553	555	557	559	537	539	541	543
H4N10447P2	561	563	565	567	537	539	541	543
H4N10448P2	569	571	573	575	537	539	541	543
H4N10452P2	577	579	581	583	537	539	541	543
H4N10468P2	585	-587	589	591	537	539	541	543
H2aM10965N	593	595	597	599	601	603	605	607

Таблица 3. Идентификаторы последовательностей нуклеиновой кислоты антител против активина А

SEQ ID NO:								
Обозначение Антитела	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H4H10423P	392	394	396	398	400	402	404	406
H4H10424P	408	410	412	414	416	418	420	422
H4H10426P	424	426	428	430	432	434	436	438
H4H10429P	440	441	444	446	448	450	452	454
H4H10430P	456	458	460	462	464	466	468	470
H4H10432P2	472	474	476	478	480	482	484	486
H4H10433P2	488	490	492	494	480	482	484	486
H4H10436P2	496	498	500	502	480	482	484	486
H4H10437P2	504	506	508	510	480	482	484	486
H4H10438P2	512	514	516	518	480	482	484	486
H4H10440P2	520	522	524	526	480	482	484	486
H4H10442P2	528	530	532	534	536	538	540	542
H4H10445P2	544	546	548	550	536	538	540	542
H4H10446P2	552	554	556	558	536	538	540	542
H4H10447P2	560	562	564	566	536	538	540	542
H4H10448P2	568	570	572	574	536	538	540	542
H4H10452P2	576	578	580	582	536	538	540	542
H4H10468P2	584	586	588	590	536	538	540	542
H2aM10965N	592	594	596	598	600	602	604	606

В одном варианте осуществления антитело против активина А или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), имеющую аминокислотную последовательность, выбираемую из группы, состоящей из SEQ ID NO: 393, 409, 425, 441, 457, 473, 489, 497, 505, 513, 521, 529, 545, 553, 561, 569, 577, 585 и 593, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательностей.

В другом варианте осуществления антитело против активина А или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область легкой цепи (LCVR), имеющую аминокислотную последовательность, выбираемую из группы, состоящей из SEQ ID NO: 401, 417, 433, 449, 465, 481, 537 и 601, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательностей.

В другом варианте осуществления антитело против активина А или его антигенсвязывающий фрагмент содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR (HCVR/LCVR), выбираемых из группы, состоящей из SEQ ID NO: 393/401, 409/417, 425/433, 441/449, 457/465, 473/481, 489/481, 497/481, 505/481, 513/481, 521/481, 529/537, 545/537, 553/537, 561/537, 569/537, 577/537, 585/537 и 593/601.

В другом варианте осуществления антитело против активина А или его антигенсвязывающий фрагмент содержит домен тяжелой цепи CDR3 (HCDR3), имеющий аминокислотную последовательность, выбираемую из группы, состоящей из SEQ ID NO: 399, 415, 431, 447, 463, 479, 495, 503, 511, 519, 527, 535, 551, 559, 567, 575, 583, 591 и 599, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательностей; и домен легкой цепи CDR3 (LCDR3), имеющий аминокислотную последовательность, выбираемую из группы, состоящей из SEQ ID NO: 407, 423, 439, 455, 471, 487, 543 и 607, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательностей.

В другом варианте осуществления антитело против активина А или его антигенсвязывающий фрагмент содержит пару аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3, выбираемых из группы, состоящей из SEQ ID NO: 399/407, 415/423, 431/439, 447/455, 463/471, 479/487, 495/487, 503/487, 511/487, 519/487, 527/487, 535/543, 551/543, 559/543, 567/543, 575/543, 583/543, 591/543 и 599/607.

В другом варианте осуществления антитело против активина А или его антигенсвязывающий фрагмент содержит домен CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), имеющий аминокислотную последовательность, выбираемую из группы, состоящей из SEQ ID NO: 395, 411, 427, 443, 459, 475, 491, 499, 507, 515, 523,

531, 547, 555, 563, 571, 579, 587 и 595, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательностей; домен CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), имеющий аминокислотную последовательность, выбираемую из группы, состоящей из SEQ ID NO: 397, 413, 429, 445, 461, 477, 493, 501, 509, 517, 525, 533, 549, 557, 565, 573, 581, 589 и 597, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательностей; домен CDR1 легкой цепи (LCDR1), имеющий аминокислотную последовательность, выбираемую из группы, состоящей из SEQ ID NO: 403, 419, 435, 451, 467, 483, 539 и 603, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательностей; и домен CDR2 легкой цепи (LCDR2), имеющий аминокислотную последовательность, выбираемую из группы, состоящей из SEQ ID NO: 405, 421, 437, 453, 469, 485, 541 и 605, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательностей.

В другом варианте осуществления антитело против активина А или его антигенсвязывающий фрагмент содержит домены HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, соответственно, имеющие аминокислотные последовательности, выбираемые из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 395-397-8-403-405-407; 411-413-415-419-421-423; 36-429-431-435-437-439; 443-445-447-451-453-455; 459-461-463-467-469-471; 475-477-479-483-485-487; 491-493-495-483-485-487; 499-501-503-483-485-487; 507-509-511-483-485-487; 515-517-519-483-485-487; 523-525-527-483-485-487; 531-533-535-539-541-543; 547-549-551-539-541-543; 555-557-559-539-541-543 (H4N10446P2); 563-565-567-539-541-543; 571-573-575-539-541-543; 579-581-583-539-541-543; 587-589-591-539-541-543; и 595-597-599-603-605-607.

В другом варианте осуществления антитело против активина А или его антигенсвязывающий фрагмент содержит домены CDR тяжелой и легкой цепей, содержащиеся в парах последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепей (HCVR/LCVR), выбираемых из группы, состоящей из SEQ ID NO: 393/401, 409/417, 425/433, 441/449, 457/465, 473/481, 489/481, 497/481, 505/481, 513/481, 521/481, 529/537, 545/537, 553/537, 561/537, 569/537, 577/537, 585/537 и 593/601.

В одном варианте осуществления антитело против активина А или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HCVR, имеющую аминокислотную последовательность, закодированную последовательностью нуклеиновой кислоты, выбираемой из группы, состоящей из SEQ ID NO: 392, 408, 424, 440, 456, 472, 488, 496, 504, 512, 520, 528, 544, 552, 560, 568, 576, 584 и 592, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательностей.

В другом варианте осуществления антитело против активина А или его антигенсвязывающий фрагмент содержит LCVR, имеющую аминокислотную последовательность, закодированную последовательностью нуклеиновой кислоты, выбираемой из группы, состоящей из SEQ ID NO: 400, 416, 432, 448, 464, 480, 536 и 600, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательностей.

В другом варианте осуществления антитело против активина А или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HCVR и LCVR, причем пара HCVR/LCVR имеет аминокислотные последовательности, закодированные парой последовательностей нуклеиновой кислоты, выбираемых из группы, состоящей из SEQ ID NO: 392/400, 408/416, 424/432, 440/448, 456/464, 472/480, 488/480, 496/480, 504/480, 512/480, 520/480, 528/536, 544/536, 552/536, 560/536, 568/536, 576/536, 584/536 и 592/600.

В другом варианте осуществления антитело против активина А или его антигенсвязывающий фрагмент содержит домен HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, закодированную последовательностью нуклеиновой кислоты, выбираемой из группы, состоящей из SEQ ID NO: 398, 414, 430, 446, 462, 478, 498, 502, 510, 518, 526, 534, 550, 558, 566, 574, 582, 590 и 598, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательностей, и домен LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, закодированную последовательностью нуклеиновой кислоты, выбираемой из группы, состоящей из SEQ ID NO: 406, 422, 435, 454, 470, 486, 542 и 606, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательностей. В одном варианте осуществления набор доменов HCDR3/LCDR3 имеет аминокислотные последовательности, закодированные парой последовательностей нуклеиновой кислоты, выбираемых из группы, состоящей из SEQ ID NO: 398/406, 414/422, 430/438, 446/454, 462/470, 478/486, 494/486, 502/486, 510/486, 518/486, 526/486, 534/542, 550/542, 558/542, 566/542, 574/542, 582/542, 590/542 и 598/606.

В другом варианте осуществления антитело против активина А или его антигенсвязывающий фрагмент содержит домены HCDR1 и HCDR2 и домены LCDR1 и LCDR2, причем домен HCDR1 имеет аминокислотную последовательность, закодированную последовательностью нуклеиновой кислоты, выбираемой из группы, состоящей из SEQ ID NO: 394, 410, 426, 442, 458, 474, 490, 498, 506, 514, 522, 530, 546,

554, 562, 570, 578, 586 и 594, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательностей, домен HCDR2 имеет аминокислотную последовательность, закодированную последовательностью нуклеиновой кислоты, выбираемой из группы, состоящей из SEQ ID NO: 396, 412, 428, 444, 460, 476, 492, 500, 508, 516, 524, 532, 548, 556, 564, 572, 580, 588 и 596, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательностей, домен LCDR1 имеет аминокислотную последовательность, закодированную последовательностью нуклеиновой кислоты, выбираемой из группы, состоящей из SEQ ID NO: 402, 418, 434, 450, 466, 482, 538 и 602, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательностей, а домен LCDR2 имеет аминокислотную последовательность, закодированную последовательностью нуклеиновой кислоты, выбираемой из группы, состоящей из SEQ ID NO: 404, 420, 436, 452, 468, 484, 540 и 604, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательностей.

В другом варианте осуществления антитело против активина А или его антигенсвязывающий фрагмент содержит домены CDR тяжелой и легкой цепей (HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3), имеющие аминокислотные последовательности, закодированные набором последовательностей нуклеиновой кислоты, выбираемых из группы, состоящей из SEQ ID NO: 394/396/398/402/404/406, 410/412/414/418/420/422, 426/428/430/434/436/438, 442/444/446/450/452/454, 458/460/462/466/468/470, 474/476/478/482/484/486, 490/492/494/482/484/486, 498/500/502/482/484/486, 506/508/510/482/484/486, 514/516/518/482/484/486, 522/524/526/482/484/486, 530/532/534/538/540/542, 546/548/550/538/540/542, 554/556/558/538/540/542, 562/564/566/538/540/542, 570/572/574/538/540/542, 578/580/582/538/540/542, 586/588/590/538/540/542 и 594/596/598/602/604/606.

В одном варианте осуществления антитело против активина А или его антигенсвязывающий фрагмент содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR (HCVR/LCVR) SEQ ID NO: 553/537, а антитело против GDF8 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR (HCVR/LCVR) SEQ ID NO: 360/368.

В другом варианте осуществления антитело против активина А или его антигенсвязывающий фрагмент содержит домены HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, соответственно, имеющие аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 555-557-559-539-541-543 (H4H10446P2), а антитело против GDF8 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит домены HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, соответственно, имеющие аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 362/364/366/370/372/374 (например, H4H1657N2).

В другом варианте осуществления антитело против активина А или его антигенсвязывающий фрагмент имеет модифицированный профиль гликозилирования. В некоторых вариантах применения может быть полезна модификация для удаления нежелательных сайтов гликозилирования или антитело с отсутствующим фрагментом фукозы, присутствующим в олигосахаридной цепи, например, для усиления функции антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) (Shield et al. (2002) JBC 277:26733). В других вариантах применения можно осуществить модификацию галактозилирования для модификации комплементзависимой цитотоксичности (CDC).

Полностью человеческие антитела против активина А и/или антитела против GDF8, описанные в данном документе, могут содержать одну или несколько аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасных и/или CDR областях переменных доменов тяжелой и легкой цепей по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии. Такие мутации можно легко установить путем сравнения аминокислотных последовательностей, раскрытых в данном документе, с последовательностями зародышевой линии, доступными, например, из публичных баз данных последовательностей антител. В дополнительных вариантах осуществления в композициях и способах согласно изобретению использованы антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые получают из любых аминокислотных последовательностей, раскрытых в данном документе, причем одну или несколько аминокислот в одной или нескольких каркасных и/или CDR областях подвергают обратной мутации в соответствующий остаток (остатки) зародышевой линии или в консервативную аминокислотную замену (природную или неприродную) соответствующего остатка (остатков) зародышевой линии (такие изменения последовательности в данном документе называются "обратные мутации зародышевой линии"). Рядовой специалист в данной области, начиная с последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепей, описанных в данном документе, может легко получить множество антител и антигенсвязывающих фрагментов, которые содержат одну или несколько отдельных обратных мутаций зародышевой линии или их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления все каркасные остатки и/или остатки CDR в доменах V_H и/или V_L подвергают обратной мутации в последовательность зародышевой линии. В других вариантах осуществления только некоторые остатки подвергают обратной мутации в последовательность зародышевой линии, например только мутированные остатки, находящиеся в первых 8 аминокислотах FR1 или в последних 8 аминокислотах FR4, или только мутированные остатки, находящиеся в CDR1,

CDR2 или CDR3. Кроме того, антитела и антигенсвязывающие фрагменты, используемые в композициях и способах согласно изобретению, могут содержать любую комбинацию двух или более обратных мутаций зародышевой линии в каркасных и/или CDR областях, то есть где некоторые отдельные остатки подвергают обратной мутации в последовательность зародышевой линии, в то время как некоторые другие остатки, которые отличаются от последовательности зародышевой линии, сохраняют. После получения антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или несколько обратных мутаций зародышевой линии, можно легко проверить на одно или несколько нужных свойств, таких как улучшенная специфичность связывания, повышенная аффинность связывания, улучшенные или усиленные антагонистические или агонистические биологические свойства (по обстоятельствам), сниженная иммуногенность и т.д. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, полученные таким общим способом, включены в настоящее изобретение.

В дополнительных вариантах осуществления в композициях и способах согласно изобретению используются антитела против GDF8 и/или антитела против активина А (или их антигенсвязывающие фрагменты), содержащие варианты любых аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, описанных в данном документе, имеющие одну или несколько консервативных замен. Например, антитела против GDF8 и/или антитела против активина А, используемые в композициях и способах согласно изобретению, имеют в некоторых вариантах осуществления аминокислотные последовательности HCVR, LCVR и/или CDR, например, с 10 или менее, 8 или менее, 6 или менее, 4 или менее и т.д. Консервативными аминокислотными заменами относительно любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, описанных в данном документе.

Биспецифические антитела

Биспецифические антитела (bsAb) объединяют специфичность двух антител и одновременно связывают разные антигены или эпитопы. Два или более распознающих антиген элемента сконструированы в виде одного антитела. В одном варианте осуществления способов согласно изобретению композиция содержит антитело, содержащее специфический к GDF8 связывающий домен и специфический к активину А связывающий домен. В рамках настоящего изобретения термин "специфический к (антигену) связывающий домен" включает в себя полипептиды, содержащие или состоящие из: (i) антигенсвязывающего фрагмента молекулы антитела, (ii) пептида, который специфически взаимодействует с конкретным антигеном (например, пептителом), и/или (iii) связывающей лиганд части рецептора, которая специфически связывает конкретный антиген. Например, включены биспецифические антитела с одним плечом, содержащие первую пару варибельной области тяжелой цепи/варибельной области легкой цепи (HCVR/LCVR), которая специфически связывает GDF8, и другим плечом, содержащим вторую пару HCVR/LCVR, которая специфически связывает активин А.

Биспецифические антитела можно получать согласно известным способам, включая химическое сшивание, межвидовые гибридомы/квадрогрибридомы, выступы-во-впадины, CrossMab, иммуноглобулин с двумя варибельными доменами, рекомбинантную инженерию (тандемные одноцепочечные варибельные фрагменты/диатела) и замок на причале. Другие иллюстративные биспецифические форматы, которые можно использовать в контексте настоящего изобретения, включают в себя, без ограничения, например, слияния IgG-scFv, двойной варибельный домен (DVD)-Ig, общую легкую цепь, CrossFab, тело (SEED), лейциновую застежку, Duobody, IgG1/IgG2, Fab (DAF)-IgG двойного действия и биспецифические форматы Mab2 (для обзора вышеупомянутых форматов см., например, Klein et al. mAbs 4:6, 1-11 (2012) и процитированные там ссылки). Биспецифические антитела также можно сконструировать с использованием, например, конъюгации пептида/нуклеиновой кислоты, причем неприродные аминокислоты с ортогональной химической реактивностью используют для создания сайтспецифических конъюгатов антитело-олигонуклеотид, которые затем самособираются в мультимерные комплексы с определенным составом, валентностью и геометрией. (См., например, Kazane et al. J Am Chem Soc. 135(1):340-346 (2013)).

Специфическое связывание

В рамках настоящего изобретения термин "специфически связывает" и тому подобное означает, что антигенспецифический связывающий белок или антигенспецифический связывающий домен, образует с конкретным антигеном комплекс, характеризующийся константой диссоциации (K_D) 500 пМ или менее, и не связывает другие неродственные антигены в обычных условиях тестирования. "Неродственные антигены" представляют собой белки, пептиды или полипептиды, которые имеют идентичность аминокислот друг другу менее 95%. Способы определения, связываются ли две молекулы специфически друг с другом, хорошо известны в данной области и включают в себя, например, равновесный диализ, поверхностный плазмонный резонанс и тому подобное. Например, антигенспецифический связывающий белок или антигенспецифический связывающий домен, как используется в контексте настоящего изобретения, содержит антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают конкретный антиген (например, GDF8, активин А) или его часть с K_D менее приблизительно 500 пМ, менее приблизительно 400 пМ, менее приблизительно 300 пМ, менее приблизительно 200 пМ, менее приблизительно 100 пМ, менее приблизительно 90 пМ, менее приблизительно 80 пМ, менее приблизительно 70 пМ, менее приблизительно 60 пМ, менее приблизительно 50 пМ, менее приблизительно 40 пМ, менее приблизительно

30 пМ, менее приблизительно 20 пМ, менее приблизительно 10 пМ, менее приблизительно 5 пМ, менее приблизительно 4 пМ, менее приблизительно 2 пМ, менее приблизительно 1 пМ, менее приблизительно 0,5 пМ, менее приблизительно 0,2 пМ, менее приблизительно 0,1 пМ или менее приблизительно 0,05 пМ при измерении в анализе с использованием поверхностного плазмонного резонанса.

Связывание антителом (антигена) можно количественно оценить в показателях K_D , измерение аффинности. Чем ниже значение K_D , тем выше аффинность связывания антитела. В рамках настоящего изобретения термин " K_D " предназначен для обозначения равновесной константы диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген. Для измерения связывания лиганда, например, взаимодействия антитело-антиген, можно использовать поверхностный плазмонный резонанс.

В рамках настоящего изобретения термин "поверхностный плазмонный резонанс" относится к оптическому явлению, которое обеспечивает в реальном времени анализ биоспецифических взаимодействий посредством обнаружения изменений концентраций белков в биосенсорной матрице, например, с использованием системы BIACORE™ (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, N.J.).

Термин "эпитоп" включает в себя любую детерминанту, предпочтительно полипептидную детерминанту, способную специфически связываться с иммуноглобулиновым или Т-клеточным рецептором. В некоторых вариантах осуществления детерминанты эпитопа включают в себя химически активные поверхностные группы молекул, таких как аминокислоты, боковые цепи Сахаров, фосфорильные группы или сульфонильные группы, а в некоторых вариантах осуществления могут иметь определенные трехмерные структурные характеристики и/или определенные характеристики заряда, эпитоп представляет собой область антигена, которую связывает антитело. В некоторых вариантах осуществления говорят, что антитело специфически связывает антиген, когда оно предпочтительно распознает свой антиген-мишень в сложной смеси белков и/или макромолекул. Например, говорят, что антитело специфически связывает антиген, когда K_D меньше или равна 10^{-8} М, меньше или равна 10^{-9} М или меньше или равна 10^{-10} М.

Получение человеческих антител

Способы получения моноклональных антител, включая полностью человеческие моноклональные антитела, известны в данной области. Любые такие известные способы можно использовать в контексте изобретения для получения человеческих антител, которые специфически связываются с GDF8 и/или с активинном А.

Используя метод VELOCIMMUNE™ или любой другой известный способ получения моноклональных антител, сперва выделяют высокоаффинные химерные антитела против GDF8 и/или активина А, имеющие человеческую вариабельную область и мышиную константную область. Как и в экспериментальном разделе ниже, антитела характеризуют и отбирают по нужным характеристикам, включая аффинность, селективность, эпитоп и т.д. Мышиные константные области заменяют нужной человеческой константной областью для создания полностью человеческого антитела согласно изобретению, например, дикого типа или модифицированным IgG1 или IgG4. Хотя выбираемую константную область можно менять согласно конкретному использованию, вариабельной области присущи характеристики высокоаффинного связывания антигена и специфичности к мишени.

В общем, антитела, используемые в способах согласно настоящему изобретению, обладают очень высокой аффинностью, обычно обладают K_D от приблизительно 10^{-12} до приблизительно 10^{-9} М при измерении посредством связывания с антигеном, либо иммобилизованным на твердой фазе, либо в растворимой фазе.

Фармацевтические композиции и способы введения

В настоящем изобретении представлены способы изменения состава тела субъекта. В рамках настоящего изобретения фраза "изменение состава тела" относится к изменению одного или нескольких элементов из безжировой массы, жировой массы и/или костной массы у субъекта. В некоторых вариантах осуществления состав тела у субъекта можно изменять посредством введения субъекту эффективного количества ингибитора GDF8 и ингибитора активина А. Безжировая масса может представлять собой, например, объем мышц бедра, аппендикулярную безжировую массу тела или общую безжировую массу и т.д. В некоторых аспектах объем мышц бедра может относиться к объему мышечной ткани бедра за исключением внутримышечной жировой ткани и больших сосудов. В некоторых аспектах объем мышц бедра может относиться к объему мышечной ткани бедра, включая внутримышечную жировую ткань и большие сосуды. В некоторых аспектах аппендикулярную безжировую массу тела можно рассчитать, например, по уравнению aLBM. В некоторых аспектах аппендикулярную безжировую массу можно рассчитать по сумме безжировой массы рук и ног. Жировой массой может быть, например, общая жировая масса, андронидная жировая масса, сумма внутримышечной и межмышечной жировой ткани (IMAT), объем подкожной жировой ткани, сумма жировой массы рук и ног, внутримышечная жировая ткань бедра и т.д. Костной массой может быть, например, общая массовая плотность минеральных веществ в костной ткани (BMD), общее массовое содержание минеральных веществ в костной ткани (BMC) и т.д. В некоторых вариантах осуществления изменение состава тела включает в себя увеличение мышечной массы и/или уменьшение жировой массы. В некоторых вариантах осуществления изменение состава тела

включает в себя увеличение мышечной массы и уменьшение жировой массы одновременно. В некоторых вариантах осуществления изменение состава тела включает в себя увеличение мышечной массы и уменьшение жировой массы одновременно, без уменьшения костной массы. В некоторых вариантах осуществления изменение состава тела включает в себя увеличение массового содержания минеральных веществ в костной ткани. В некоторых вариантах осуществления изменение состава тела включает в себя уменьшение общей жировой массы, андройдной жировой массы и/или подкожной жировой массы. В некоторых вариантах осуществления изменение состава тела включает в себя уменьшение общей жировой массы, андройдной жировой массы и/или подкожной жировой массы без уменьшения объема внутримышечной жировой ткани бедра.

В настоящем изобретении представлены способы изменения состава тела, например, стимулирования уменьшения жировой массы у субъекта, и способы лечения заболевания или расстройства, характеризующегося повышенной жировой массой, включающие введение субъекту первой композиции, содержащей эффективное количество ингибитора GDF8, и второй композиции, содержащей эффективное количество ингибитора активина А. Первую и вторую композиции можно вводить субъекту одновременно или последовательно. Первую и вторую композиции также можно объединить перед введением в третью композицию. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления субъекту можно вводить композицию, содержащую как ингибитор GDF8, так и ингибитор активина А. Ингибитором GDF8 в такой композиции может быть, например, антитело против GDF8. Ингибитором активина А в такой композиции может быть, например, антитело против активина А.

Фармацевтические композиции согласно изобретению составляют с подходящими носителями, вспомогательными веществами и другими средствами, которые обеспечивают должный перенос, доставку, переносимость и тому подобное. Множество соответствующих составов можно найти в рецептах, известных всем химикам-фармацевтам: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Эти составы включают в себя, например, порошки, пасты, мази, желе, воски, масла, липиды, содержащие липиды (катионные или анионные) везикулы (такие как LIPOFECTIN™), конъюгаты ДНК, безводные абсорбирующие пасты, эмульсии масла в воде и вода в масле, эмульсии карбовакс (полиэтиленгликоли различной молекулярной массы), полутвердые гели и полутвердые смеси, содержащие карбовакс. Любая из вышеперечисленных смесей может подходить для лечения и терапии в соответствии с изобретением при условии, что активный ингредиент в составе не инактивируется составом, и состав является физиологически совместимым и переносимым в зависимости от пути введения. См. Также Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311.

Известны различные системы доставки, которые можно использовать для введения фармацевтических композиций согласно настоящему изобретению, например, инкапсуляция в липосомы, микрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать мутантные вирусы, опосредованный рецепторами эндоцитоз (см., например, Wu et al. 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432). Способы введения включают в себя, но без ограничения, внутрикожный, внутримышечный, внутривенный, внутривенный, подкожный, интраназальный, эпидуральный и пероральный пути.

Композиции можно вводить любым удобным путем, например, с помощью инфузии или болюсной инъекции, с помощью абсорбции через эпителиальные или кожно-слизистые оболочки (например, слизистую оболочку полости рта, слизистую оболочку прямой кишки и кишечника и т.д.) и можно вводить вместе с другими биологически активными средствами.

Фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению можно доставлять подкожно или внутривенно с помощью стандартной иглы и шприца. Кроме того, что касается подкожной доставки устройство доставки шприц-ручка легко может найти применение при доставке фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению. Такое устройство доставки шприц-ручка может быть многократным или однократным. В многократном устройстве доставки шприц-ручка обычно используют сменный картридж, который содержит фармацевтическую композицию. После введения всей фармацевтической композиции в картридже и опорожнения картриджа пустой картридж можно легко выбросить и заменить новым картриджем, который содержит фармацевтическую композицию. Затем устройство доставки шприц-ручка можно использовать повторно. В однократном устройстве доставки шприц-ручка сменный картридж отсутствует. Вместо этого однократное устройство доставки шприц-ручка поставляют с предварительно заполненной фармацевтической композицией, содержащейся в резервуаре внутри устройства. После опорожнения резервуара от фармацевтической композиции все устройство выбрасывают.

Множество многократных устройств доставки шприц-ручка и автоинъектор находят применение для подкожной доставки фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению. Примеры включают в себя, но без ограничения, AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc. Woodstock, UK), шприц-ручку DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Bergdorf, Switzerland), шприц-ручку HUMALOG MIX 75/25™, шприц-ручку HUMALOG™, шприц-ручку HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co. Indianapolis, IN), NOVOPEN™ I, II и III (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Co-

penhagen, Denmark), шприц-ручку BD™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ и OPTICLIK™ (Sanofi-Aventis, Frankfurt, Germany), и это лишь некоторые из них. Примеры одноразовых устройств доставки шприц-ручка, находящие применение для подкожной доставки фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, включают в себя, но без ограничения, шприц-ручку SOLOSTAR™ (Sanofi-Aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) и KWIKPEN™ (Eli Lilly), автоинъектор SURECLICK™ (Amgen, Thousand Oaks, CA), PENLET™ (Haselmeier, Stuttgart, Germany), EPIPEN (Dey, L.P.) и шприц-ручку HUMIRATM (Abbott Labs, Abbott Park IL), и это лишь некоторые из них.

В некоторых ситуациях фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению можно доставлять в системе с управляемым высвобождением. В одном варианте осуществления можно использовать насос (см. Langer выше; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201). В другом варианте осуществления можно использовать полимерные материалы; см. Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), 1974, CRC Pres., Boca Raton, Florida. В еще одном варианте осуществления системы с управляемым высвобождением можно поместить в непосредственной близости от мишени для композиции, так что требуется только часть системной дозы (см., например, Goodson, 1984, в Medical Applications of Controlled Release, выше, vol. 2, pp. 115-138). Другие системы с управляемым высвобождением обсуждаются в обзоре Langer, 1990, Science 249:1527-1533.

Препараты для инъекций могут содержать лекарственные формы для внутривенных, подкожных, внутримышечных и внутримышечных инъекций, капельных инфузий и т.д. Эти препараты для инъекций можно получать с помощью известных способов. Например, препараты для инъекций можно получать, например, путем растворения, суспендирования или эмульгирования описанного выше антигена или его соли в стерильной водной среде или масляной среде, обычно используемой для инъекций. В качестве водной среды для инъекций используют, например, физиологический солевой раствор, изотонический раствор, содержащий глюкозу и другие вспомогательные средства и т.д., которые можно использовать в комбинации с соответствующим солюбилизующим средством, таким как спирт (например, этанол), полиспирт (например, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль), неионное поверхностно-активное вещество [например, полисорбат 80, HCO-50 (полиоксиэтиленовый (50 моль) аддукт гидрогенизированного касторового масла)] и т.д. В качестве масляной среды используют, например, кунжутное масло, соевое масло и т.д., которые можно использовать в комбинации с солюбилизующим средством, таким как бензилбензоат, бензиловый спирт и т.д. Полученную таким образом инъекцию предпочтительно заполняют в соответствующую ампулу.

Преимущественно, фармацевтические композиции для перорального или парентерального применения, описанного выше, получают в виде лекарственных форм со стандартной дозой, подходящей для соответствия дозе активных ингредиентов. Такие лекарственные формы со стандартной дозой включают в себя, например, таблетки, пилюли, капсулы, инъекции (ампулы), суппозитории и т.д.

Дозировка

Количество активного ингредиента (например, антигена против GDF8 и/или антигена против активина А), который можно вводить субъекту, обычно составляет терапевтически эффективное количество. Термин "эффективное количество" означает концентрацию или количество активного ингредиента, например, антигена или антигенсвязывающего фрагмента антигена, которое приводит к достижению конкретной заявленной цели. Термин "эффективное количество" использован взаимозаменяемо с термином "терапевтически эффективное количество" и означает концентрацию или количество активного ингредиента, например, антигена или его антигенсвязывающего фрагмента, которое является эффективным для достижения заявленного терапевтического эффекта. (Терапевтически) эффективное количество можно определить эмпирически.

В рамках настоящего изобретения фраза "терапевтически эффективное количество" или "эффективное количество" означает дозу антигенспецифических связывающих белков и/или антигенсвязывающих молекул (например, антиген), которое приводит к обнаруживаемому уменьшению жировой массы. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество также может приводить к увеличению одного или нескольких следующих параметров: массы тела, мышечной массы (например, массы передней большеберцовой [TA] мышцы, массы икроножной [GA] мышцы, массы четырехглавой [Quad] мышцы, аппендикулярной безжировой массы тела и т.д.), объема мышц (например, объема мышц бедра), мышечной силы/мощности и/или мышечной функции и переносимости глюкозы.

"Терапевтически эффективное количество" или "эффективное количество" ингибитора GDF8 (например, антигена против GDF8) и/или ингибитора активина А (например, антигена против активина А) включает в себя, например, количество ингибитора GDF8 и/или ингибитора активина А, которое при введении субъекту вызывает уменьшение общей жировой массы по меньшей мере приблизительно на 2-8%, по меньшей мере на 2,5-6%, по меньшей мере на 3-4% или по меньшей мере приблизительно на 2,0%, по меньшей мере приблизительно на 2,5%, по меньшей мере приблизительно на 3,0% или по меньшей мере приблизительно на 3,5% или более. Например, "терапевтически эффективное количество" или "эффективное количество" ингибитора GDF8 (например, антигена против GDF8) и/или ингибитора

активина А (например, антитела против активина А) включает в себя, например, количество ингибитора GDF8 и/или ингибитора активина А, которое при введении субъекту вызывает уменьшение общей жировой массы по меньшей мере приблизительно на 3,5% или более.

В некоторых вариантах осуществления "терапевтически эффективное количество" или "эффективное количество" ингибитора GDF8 (например, антитела против GDF8) и/или ингибитора активина А (например, антитела против активина А) включает в себя, например, количество ингибитора GDF8 и/или ингибитора активина А, которое при введении субъекту вызывает уменьшение андройдной жировой массы по меньшей мере приблизительно на 2-8%, по меньшей мере на 2,5-6%, по меньшей мере на 3-4% или по меньшей мере приблизительно на 2,0%, по меньшей мере приблизительно на 2,5%, по меньшей мере приблизительно на 3,0% или по меньшей мере приблизительно на 3,5% или более. Например, "терапевтически эффективное количество" или "эффективное количество" ингибитора GDF8 (например, антитела против GDF8) и/или ингибитора активина А (например, антитела против активина А) включает в себя, например, количество ингибитора GDF8 и/или ингибитора активина А, которое при введении субъекту вызывает уменьшение андройдной жировой массы по меньшей мере приблизительно на 3,5%.

В некоторых вариантах осуществления количество также приводит к увеличению мышечной массы ТА или GA по меньшей мере на 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60% или более по сравнению с субъектами, получающими контрольное лечение.

В некоторых вариантах осуществления "терапевтически эффективное количество" или "эффективное количество" ингибитора GDF8 (например, антитела против GDF8) и/или ингибитора активина А (например, антитела против активина А) включает в себя, например, количество ингибитора GDF8 и/или ингибитора активина А, которое при введении субъекту вызывает увеличение объема мышц бедра по меньшей мере приблизительно на 2-8%, 2,5-6%, 3-4% или по меньшей мере 2,0%, по меньшей мере 2,5%, по меньшей мере 3,0% или по меньшей мере 3,5% или более.

В некоторых вариантах осуществления "терапевтически эффективное количество" или "эффективное количество" ингибитора GDF8 (например, антитела против GDF8) и/или ингибитора активина А (например, антитела против активина А) включает в себя, например, количество ингибитора GDF8 и/или ингибитора активина А, которое при введении субъекту вызывает увеличение общей безжировой массы тела по меньшей мере приблизительно на 2-8%, 2,5-6%, 3-4% или по меньшей мере 2,0%, по меньшей мере 2,5%, по меньшей мере 3,0% или по меньшей мере 3,5% или более.

В некоторых вариантах осуществления "терапевтически эффективное количество" или "эффективное количество" ингибитора GDF8 (например, антитела против GDF8) и/или ингибитора активина А (например, антитела против активина А) включает в себя, например, количество ингибитора GDF8 и/или ингибитора активина А, которое при введении субъекту вызывает увеличение аппендикулярной безжировой массы тела по меньшей мере приблизительно на 2-8%, 2,5-6%, 3-4% или по меньшей мере 2,0%, по меньшей мере 2,5%, по меньшей мере 3,0% или по меньшей мере 3,5% или более.

В некоторых вариантах осуществления количество также приводит к увеличению мышечной массы ТА или GA по меньшей мере на 2%, 3%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25% или более по сравнению с субъектами, получающими контрольное лечение.

В некоторых вариантах осуществления (терапевтически) эффективное количество антитела против GDF8, антитела против активина А или биспецифического антитела, которое специфически связывает GDF8 и активин А, может составлять от приблизительно 0,05 до приблизительно 600 мг; например, приблизительно 0,05 мг, приблизительно 0,1 мг, приблизительно 1,0 мг, приблизительно 1,5 мг, приблизительно 2,0 мг, приблизительно 10 мг, приблизительно 20 мг, приблизительно 30 мг, приблизительно 40 мг, приблизительно 50 мг, приблизительно 60 мг, приблизительно 70 мг, приблизительно 80 мг, приблизительно 90 мг, приблизительно 100 мг, приблизительно 110 мг, приблизительно 120 мг, приблизительно 130 мг, приблизительно 140 мг, приблизительно 150 мг, приблизительно 160 мг, приблизительно 170 мг, приблизительно 180 мг, приблизительно 190 мг, приблизительно 200 мг, приблизительно 210 мг, приблизительно 220 мг, приблизительно 230 мг, приблизительно 240 мг, приблизительно 250 мг, приблизительно 260 мг, приблизительно 270 мг, приблизительно 280 мг, приблизительно 290 мг, приблизительно 300 мг, приблизительно 310 мг, приблизительно 320 мг, приблизительно 330 мг, приблизительно 340 мг, приблизительно 350 мг, приблизительно 360 мг, приблизительно 370 мг, приблизительно 380 мг, приблизительно 390 мг, приблизительно 400 мг, приблизительно 410 мг, приблизительно 420 мг, приблизительно 430 мг, приблизительно 440 мг, приблизительно 450 мг, приблизительно 460 мг, приблизительно 470 мг, приблизительно 480 мг, приблизительно 490 мг, приблизительно 500 мг, приблизительно 510 мг, приблизительно 520 мг, приблизительно 530 мг, приблизительно 540 мг, приблизительно 550 мг, приблизительно 560 мг, приблизительно 570 мг, приблизительно 580 мг, приблизительно 590 мг или приблизительно 600 мг соответствующего антитела. Дозу можно менять в зависимости от возраста и размера субъекта, которому ее вводят, целевого заболевания, условий, пути введения и тому подобное. В зависимости от тяжести состояния можно регулировать частоту и продолжительность лечения.

Количество антитела (например, антитела против GDF8, антитела против активина А или биспецифического антитела, которое специфически связывает GDF8 и активин А), содержащееся в отдельных дозах, можно выразить в миллиграммах антитела на килограмм массы тела пациента (т.е. мг/кг). Напри-

мер, антитело против GDF8, антитело против активина А и/или биспецифическое антитело против GDF8/против активина А в первой, второй или третьей композиции, вводимых в способах согласно изобретению, можно вводить пациенту в дозе от приблизительно 0,0001 до приблизительно 50 мг/кг массы тела пациента (например, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 10,5, 11,0, 11,5 мг/кг и т.д.).

Эффективное количество ингибитора GDF8 (например, антитела против GDF8) в некоторых вариантах осуществления может включать в себя режим дозирования, выбираемый из группы, состоящей из по меньшей мере от 0,1 мг/кг до приблизительно 10 г/кг, от 1 мг/кг до приблизительно 1 г/кг и от 10 до 100 мг/кг. Эффективное количество ингибитора активина А (например, антитела против активина А) в некоторых вариантах осуществления может включать в себя режим дозирования, выбираемый из группы, состоящей из по меньшей мере от 0,1 мг/кг до приблизительно 10 г/кг, от 1 мг/кг до приблизительно 1 г/кг и от 10 до 100 мг/кг.

Эффективное количество ингибитора GDF8 (например, антитела против GDF8) в дополнительных вариантах осуществления может включать в себя режим дозирования, выбираемый из группы, состоящей из разовой дозы от приблизительно 0,01 до приблизительно 20 мг/кг массы тела, от приблизительно 0,1 до приблизительно 10 мг/кг массы тела и от приблизительно 0,1 до приблизительно 5 мг/кг массы тела, эффективное количество ингибитора активина А (например, антитела против активина А) в дополнительных вариантах осуществления может включать в себя режим дозирования, выбираемый из группы, состоящей из разовой дозы от приблизительно 0,01 до приблизительно 20 мг/кг массы тела, от приблизительно 0,1 до приблизительно 10 мг/кг массы тела и от приблизительно 0,1 до приблизительно 5 мг/кг массы тела. В одном конкретном аспекте эффективное количество антитела против GDF8 составляет приблизительно 2 мг/кг-10 мг/кг, 4 мг/кг-8 мг/кг или приблизительно 6 мг/кг массы тела субъекта, а эффективное количество антитела против активина А составляет 0,5 мг/кг-15 мг/кг, 2 мг/кг-12 мг/кг, приблизительно 3 мг/кг или приблизительно 10 мг/кг массы тела субъекта.

Первая, вторая и третья композиции, вводимые в способах согласно изобретению, в некоторых вариантах осуществления могут включать в себя равные количества ингибитора GDF8 (например, антитела против GDF8) и/или ингибитора активина А (например, антитела против активина А). Альтернативно, количество ингибитора GDF8 (например, антитела против GDF8) в композиции может быть меньше или больше количества ингибитора активина А (например, антитела против активина А), эффективное количество ингибитора GDF8 (например, антитела против GDF8) в комбинации с ингибитором активина А (например, антителом против активина А) может быть ниже, чем в отдельной композиции, эффективное количество ингибитора активина А (например, антитела против активина А) в комбинации с ингибитором GDF8 (например, антителом против GDF8) может быть ниже, чем в отдельной композиции. Рядовой специалист в данной области, используя стандартные эксперименты, будет способен определить соответствующие количества отдельных компонентов в композициях, необходимые для получения нужного терапевтического эффекта.

Аспекты раскрытия

В раскрытии представлены композиции, наборы и способы использования ингибиторов GDF8 и ингибиторов активина А для уменьшения жировой массы (стимулирования уменьшения жировой массы) у субъекта. В раскрытии также представлены композиции, наборы и способы использования ингибиторов GDF8 и ингибиторов активина А для лечения заболеваний, расстройств и/или состояний, связанных или характеризующихся повышенной жировой массой у субъекта. В предпочтительных вариантах осуществления ингибитором GDF8 является антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывает GDF8.

Терапевтические способы

В настоящем изобретении представлены способы изменения состава тела, например, способы стимулирования уменьшения жировой массы у субъекта, способы увеличения мышечной массы у субъекта и способы лечения заболевания или расстройства, характеризующегося повышенной жировой массой, путем специфического связывания GDF8 и/или активина А. Например, в настоящем изобретении представлены способы стимулирования уменьшения жировой массы у субъекта, индуцирования увеличения мышечной массы у субъекта и способы лечения заболевания или расстройства, характеризующегося повышенной жировой массой у субъекта, посредством введения субъекту: i) композиции, содержащей антитело против GDF8, и композиции, содержащей антитело против активина А, или ii) композиции, содержащей как антитело против GDF8, так и антитело против активина А, или iii) композиции, содержащей биспецифическое антитело, содержащее первый вариабельный домен, содержащий пару HCVR/LCVR, который специфически связывает GDF8, и второй вариабельный домен, содержащий пару HCVR/LCVR, который специфически связывает активин А. Любые ингибиторы GDF8 и/или ингибиторы активина А, раскрытые или упоминаемые в данном документе, можно использовать в контексте этих аспектов изобретения.

В способах, включающих введение субъекту ингибитора GDF8 и ингибитора активина А, ингибитор GDF8 (например, антитело против GDF8) и ингибитор активина А (например, антитело против активина А) можно вводить субъекту в одно и то же или по существу одно и то же время, например, в одной

терапевтической дозе (третья композиция) или в двух отдельных дозах (первая и вторая композиции), которые вводят одновременно или в течение менее приблизительно 5 мин друг от друга. Альтернативно, ингибитор GDF8 и ингибитор активина А (первую и вторую композиции) можно вводить субъекту последовательно, например, в отдельных терапевтических дозах, отделенных по времени друг от друга более чем приблизительно на 5 мин.

Уменьшением жировой массы у субъекта в способах согласно изобретению может быть уменьшение общей жировой массы, которую измеряют с помощью DXA (двухэнергетической рентгеновской абсорбциометрии).

В другом варианте осуществления уменьшением жировой массы у субъекта в способах согласно изобретению является уменьшение андройдной жировой массы (т.е. висцерального жира, связанного с верхней/центральной частью тела), которую измеряют с помощью DXA (двухэнергетической рентгеновской абсорбциометрии). При андройдном ожирении у субъекта жир скапливается вокруг его или ее области живота. Андройдное ожирение также может проявляться в других зонах верхней части туловища, таких как верхняя часть груди (спереди или сзади), задняя часть шеи и даже плечи. Субъекты с андройдным ожирением подвержены большему риску связанных с ожирением заболеваний/расстройств, таких как сердечные заболевания и метаболический синдром. Вероятность развития подагры, заболеваний, связанных с артериями (из-за высокого кровяного давления), и многих видов рака также связана с центральным типом распределения жира у субъектов, страдающих андройдным ожирением.

Оценки телесного жира различаются по точности и точности. Общие антропометрические измерения включают: измерение веса, окружности талии и кожной складки с помощью штангенциркуля. Более сложные методы включают: анализ биоэлектрического импеданса (BIA), BOD POD и двухэнергетическую рентгеновскую абсорбциометрию (DEXA или DXA). DXA особенно точен и действителен, поскольку он учитывает минеральное содержание костной ткани при оценке жировых отложений и мышц. С помощью сканирования DEXA можно оценить различные области распределения жира, чтобы определить соотношение андройдного/гиноидного жира, которое отличается от индекса массы тела. DXA может измерять общую жировую массу, общую мышечную массу тела, уровни висцерального жира (жир вокруг органов), внутримышечный жир (жир между мышцами), общую минеральную плотность костной ткани и даже может давать региональные данные. Наконец, DXA может точно оценить распределение жира в организме, связанное с повышенной инсулинорезистентностью.

Избегание побочных эффектов

В настоящем изобретении представлены способы изменения состава тела, например, стимулирования уменьшения жировой массы у субъекта, и способы лечения заболевания или расстройства, характеризующегося повышенной жировой массой, включающие введение субъекту ингибитора GDF8 и ингибитора активина А, не вызывая нежелательных побочных эффектов, связанных с введением молекул, которые связывают множество (например, 3 или более) лигандов ActRIIB, например, которые представлены в патенте США № 8871209. Например, клиническая молекула, называемая ACE-031 (Acceleron Pharma, Inc. Cambridge, MA), представляет собой мультимер, состоящий из внеклеточной части ActRIIB, слитой с доменом Fc IgG (эта молекула также упоминается в данном документе как "ActRIIB-Fc"). ActRIIB-Fc связывает GDF8, а также другие лиганды ActRIIB, такие как, например, активин А, активин В, GDF11, BMP9, BMP10 и TGF β , и известно, что она вызывает различные нежелательные побочные эффекты при введении пациентам-людям. Например, было показано, что введение ACE-031 женщинам в постменопаузе в исследовании возрастающей дозы фазы Ib вызывает ненужное увеличение гемоглобина и снижение уровней FSH. Кроме того, исследование ACE-031 фазы II у пациентов детского возраста с мышечной дистрофией было прекращено из-за нежелательных эффектов, включая кровотечение из носа и десен. Расширенные кровеносные сосуды также наблюдаются у пациентов, которых лечат ActRIIB-Fc. Эффект ACE-031 у мальчиков с мышечной дистрофией Дюшенна (DMD) продемонстрировал тенденцию увеличения безжировой массы тела и снижения жировой массы, но не связанные с мышцами нежелательные явления повлияли на решение прекратить исследование. (Campbell, et al. 2017 Muscle Nerve 55: 458-464). Конкретно ингибирование GDF8 и активина А (например, посредством введения антитела против GDF8 и антитела против активина А), в отсутствие ингибирования других лигандов ActRIIB, таких как активин В, GDF11, BMP9, BMP10 и TGFP, приводит к ускорению уменьшения жировой массы, не вызывая нежелательных побочных эффектов, связанных с неспецифическими средствами связывания активина, такими как ActRIIB-Fc.

Схемы введения

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения множество доз композиций согласно настоящему изобретению (например, композиций, содержащих ингибитор GDF8 и/или ингибитор активина А, например, антитела против GDF8 и/или антитела против активина А или биспецифического антитела против GDF8 и активина А) можно вводить субъекту в течение определенного периода времени. Способы согласно этому аспекту изобретения включают последовательное введение субъекту множества доз композиции (композиций) согласно настоящему изобретению. В рамках настоящего изобретения "последовательное введение" означает, что каждую дозу композиций согласно настоящему изобретению вводят субъекту в разные моменты времени, например, в разные дни, разде-

ленные заданным интервалом (например, часами, днями, неделями или месяцами). В настоящем изобретении представлены способы, которые включают последовательное введение пациенту начальной дозы первой и/или второй композиции; или третьей композиции; за которым следует одна или несколько вторичных доз первой и/или второй композиции; или третьей композиции; и необязательно за которым следует одна или несколько третичных доз первой и/или второй композиции; или третьей композиции.

Термины "начальная доза", "вторичные дозы" и "третичные дозы" относятся к временной последовательности введения композиций согласно настоящему изобретению. Таким образом, "начальной дозой" является доза, которую вводят в начале схемы лечения (также называемая "базовая доза"); "вторичными дозами" являются дозы, которые вводят после начальной дозы; а "третичными дозами" являются дозы, которые вводят после вторичных доз. Начальная, вторичные и третичные дозы, все могут содержать одинаковое количество активного ингредиента (ингредиентов), например, антитела против GDF8 и/или антитела против активина А, но обычно отличаются друг от друга показателями частоты введения. Однако в некоторых вариантах осуществления количество активного ингредиента (ингредиентов), содержащееся в начальной, вторичных и/или третичных дозах, будет отличаться друг от друга (например, увеличиваться или уменьшаться в зависимости от обстоятельств) в течение курса лечения.

В одном иллюстративном варианте осуществления настоящего изобретения каждую вторичную и/или третичную дозу вводят 1-30 (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 или более) дней после непосредственно предшествующей дозы. В рамках настоящего изобретения фраза "непосредственно предшествующая доза" означает в последовательности множества введений дозу (дозы) композиций согласно настоящему изобретению, которые вводят субъекту перед введением следующей дозы в последовательности, без промежуточных доз.

Способы согласно этому аспекту изобретения могут включать введение пациенту любого количества вторичных и/или третичных доз композиций согласно настоящему изобретению. Например, в некоторых вариантах осуществления пациенту вводят только одну вторичную дозу. В других вариантах осуществления пациенту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) вторичных доз. Также, в некоторых вариантах осуществления пациенту вводят только одну третичную дозу. В других вариантах осуществления пациенту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) третичных доз.

В вариантах осуществления, включающих множество вторичных доз, каждую вторичную дозу можно вводить с такой же частотой, как другие вторичные дозы. Например, каждую вторичную дозу можно вводить пациенту через 1-29 дней после непосредственно предшествующей дозы. Аналогично, в вариантах осуществления, включающих множество третичных доз, каждую третичную дозу можно вводить с такой же частотой, как другие третичные дозы. Например, каждую третичную дозу можно вводить пациенту через 1-60 дней после непосредственно предшествующей дозы. Альтернативно, частоту, с которой вторичные и/или третичные дозы вводят пациенту, можно менять в течение курса лечения. Врач также может регулировать частоту введения в течение курса лечения в зависимости от потребностей отдельных пациентов после клинического обследования.

В одном варианте осуществления субъекта можно подвергнуть предварительному DXA, затем назначить композицию, содержащую антитела против GDF8 и антитела против активина А (или композицию, содержащую антитела против GDF8, и композицию, содержащую антитела против активина А), затем подвергнуть последующему DXA. Если в последующем DXA жировая масса заметно не уменьшилась (по сравнению с предварительным DXA), субъекту снова можно назначить композицию (композиции). В дополнительном варианте осуществления величину последующей дозировки и частоту введения можно менять на основе результатов последующего DXA.

Комбинированная терапия

Способы согласно настоящему изобретению в соответствии с некоторыми вариантами осуществления включают введение субъекту одного или нескольких дополнительных терапевтических средств, которые можно преимущественно объединить с композицией, содержащей ингибитор GDF8 и/или ингибитор активина А. В рамках настоящего изобретения выражение "в комбинации с" означает, что дополнительное терапевтическое средство (средства) вводят перед, после или одновременно с фармацевтической композицией, содержащей ингибитор GDF8 и/или ингибитор активина А. Термин "в комбинации с" также включает в себя последовательное или сопутствующее введение ингибитора GDF8 ингибитора активина А или и того и другого и второго терапевтического средства. Термин "терапевтическое средство" также означает включение конкретной терапии.

Дополнительным терапевтическим средством может быть, например, другой антагонист/ингибитор GDF8, другой антагонист/ингибитор активина А, ингибиторы фактора роста, иммуносупрессанты, ингибиторы обмена веществ, ингибиторы ферментов и цитотоксические/цитостатические средства, антагонист IL-1 (включая, например, антагонист IL-1, который представлен в US 6927044), антагонист IL-6, антагонист IL-6R (включая, например, антитело против IL-6R, которое представлено в US 7582298), антагонист IL-13, антагонист фактора некроза опухоли (TNF), антагонист IL-8, антагонист IL-9, антагонист IL-17, антагонист IL-5, антагонист IgE, антагонист CD48, антагонист IL-31 (в том числе, например, представленный в US 7531637), антагонист тимического стромального лимфопоэтина (TSLP) (в том числе, например, представленный в US 2011/027468), антибиотики интерферон-гамма (IFN γ), кортикостероиды

местного действия, таколиму, пимекролиму, циклоспору, азатиоприну, метотрексату, кромолину натрия, ингибиторы протеиназ, системные кортикостероиды, системная иммунотерапия, антигистаминные препараты, химиотерапия, светотерапия или их комбинации.

В дополнительных вариантах осуществления в изобретении представлена композиция, причем дополнительное терапевтическое средство выбирают из группы, состоящей из (1) ингибиторов 3-гидрокси-3-метилглутарил-кофермента А редуктазы (HMG-CoA), таких как церивастатин, аторвастатин, симвастатин, питавастатин, розувастатин, флувастатин, ловастатин, правастатин и тому подобное; (2) ингибиторов поглощения холестерина и/или реабсорбции желчных кислот; (3) ниацина, который повышает катаболизм липопротеинов; (4) фибратов или амфипатических карбоновых кислот, которые снижают уровень липопротеина низкой плотности (LDL), повышают уровни липопротеина высокой плотности (HDL) и TG и снижают количество нефатальных сердечных приступов; и (5) активаторов фактора транскрипции LXR, который участвует в элиминации холестерина, таких как 22-гидроксихолестерин или фиксированные комбинации, такие как эзетимиб плюс симвастатин; статин со смолой желчной кислоты (например, холецирамин, колестилол, колесевелам), фиксированная комбинация ниацина плюс статин (например, ниацин с ловастатином); или с другими понижающими липиды средствами, такими как сложные этиловые эфиры омега-3-жирных кислот (например, омакор).

В других дополнительных вариантах осуществления второе терапевтическое средство выбирают из одного или нескольких других ингибиторов/антагонистов глюкагона или ингибитора/антагониста рецептора глюкагона, а также ингибиторов других молекул, таких как ингибиторы ANGPTL8 (например, антитело против ANGPTL8), а также ингибиторов других молекул, таких как ANGPTL3 (например, антитело против ANGPTL3), ANGPTL4, ANGPTL5, ANGPTL6, аролипопротеин C-III (также называемый APOC3; см., например, ингибиторы APOC3, описанные в US 8530439, US 7750141, US 7598227 и воланесорен, также называемый ISIS-APOCIIIrx) и пропротеиновая конвертаза субтилизин/кексин 9 типа (PCSK9), которые участвуют в метаболизме липидов, в частности, в гомеостазе холестерина и/или триглицеридов. Ингибиторы этих молекул включают в себя малые молекулы, бессмысловые молекулы и антитела, которые специфически связываются с этими молекулами и блокируют их активность.

В дополнительных вариантах осуществления дополнительное терапевтическое средство можно выбирать из группы, состоящей из анальгетиков, противовоспалительных средств, включая нестероидные противовоспалительные лекарственные средства (NSAIDs), такие как ингибиторы Cox-2 и тому подобное, чтобы, если необходимо, облегчить и/или уменьшить симптомы сопровождающие основное заболевание.

Дополнительное терапевтическое средство (средства) можно вводить перед, одновременно или после введения первой и/или второй; или третьей композиции (композиций), описанных в данном документе. Для целей настоящего раскрытия такими схемами введения можно считать введение антитела против GDF8 и/или антитела против активина А "в комбинации со" вторым терапевтически активным компонентом.

Примеры

Следующие примеры приведены для того, чтобы представить рядовым специалистам в данной области полное раскрытие и описание того, как получить и применять способы и композиции согласно изобретению и не предназначено для ограничения объема того, что авторы считают своим изобретением. Были приложены усилия, чтобы обеспечить точность по отношению к используемым цифрам (например, количеству, температуре и т.д.), но следует учитывать некоторые погрешности и отклонения в экспериментах. Если не указано иное, части представляют собой массовые части, молекулярная масса представляет собой среднюю молекулярную массу, температура приведена в градусах по Цельсию, а давление равно или близко к атмосферному.

Пример 1. Только антитела против GDF8 увеличивали общую безжировую массу до 3% в клинических исследованиях: данные по саркопении 2 фазы.

Провели рандомизированное двойное слепое с контролем по плацебо клиническое испытание 2 фазы интервенционного исследования у пациентов 70 лет и старше, включая мужчин и женщин в постменопаузе с саркопенией. Пациентов лечили 12 недель с помощью подкожного введения только антитела REGN1033 против GDF8 (H4H1657N2), либо 100 мг антитела против GDF8, Q4W s.c. (n=62); либо 300 мг антитела против GDF8 Q4W s.c. (n=64), либо 300 мг антитела против GDF8 Q2W s.c. (n=59), или плацебо (n=65). Как показано на фиг. 1, значительное увеличение общей безжировой массы тела по сравнению с плацебо наблюдалось у пациентов через 12 недель при использовании только REGN1033 в каждой из трех доз, как показано на фиг. 1 и табл. 4.

Таблица 4. % Изменения общей безжировой массы к 12 неделе при использовании только антитела REGN1033 против GDF8

	Плацебо	Антитела против GDF8		
		100 Q4W	300 Q4W	300 Q2W
N	65	62	64	59
Базовое среднее значение	43,6 кг	42,9 кг	42,7	42,8
Различие по сравнению с плацебо	-	1,66%	1,78%	2,29%
значение P	-	0,0077	0,0043	0,0004

Влияние на силу и функцию отличалось. Антитела против GDF8 были в целом безопасными и хорошо переносились (реакции, если имели место, были легкими). В табл. 4 представлены пациенты, получающие REGN1033 в дозах либо 100 мг или 300 мг, у которых наблюдалось значительно увеличенная общая безжировая масса в виде % изменения по сравнению с данными плацебо к 12 неделе. Только антитела REGN1033 против GDF8 повышали в исследовании общую безжировую массу тела до 3%. Схемы 300 мг также приводили к снижению общей и андронидной жировой массы.

Пример 2. Первое исследование однократной возрастающей дозы комбинации антитела против GDF8 и антитела против активина А на людях.

Начали рандомизированное двойное слепое с контролем по плацебо исследование возрастающей дозы для оценки переносимости и влияния на состав тела комбинации внутривенного введения антитела против GDF8 и антитела против активина А по сравнению с отдельными компонентами.

Основная цель исследования состояла в оценке безопасности и переносимости антитела против активина А (например, H4N10446P2=REGN2477) отдельно и в комбинации с антителом против GDF8 (например, H4N1657N2=REGN1033) у здоровых женщин в постменопаузе в возрасте от 45 до 70 лет.

Дополнительные цели исследования состояли в: оценке влияния отдельно REGN2477, отдельно REGN1033 и комбинации REGN2477+REGN1033 на объем мышц бедра, который измеряют с помощью магнитно-резонансной томографии (MRI), и оценке влияния REGN2477 отдельно, REGN1033 отдельно и комбинации REGN2477+REGN1033 на общий и региональный состав тела, который измеряют с помощью двухэнергетической рентгеновской абсорбциометрии (DXA)

Дизайн исследования

Это исследование представляло собой рандомизированное двойное слепое с контролем по плацебо исследование возрастающей дозы для оценки безопасности, переносимости и фармакодинамики внутривенного введения REGN2477 (антитела против активина А) отдельно и в комбинации с REGN1033 (антителом против GDF8) у здоровых женщин в постменопаузе.

В общей сложности 48 субъектов рандомизировали в 1 из следующих 4 последовательно возрастающих панелей доз REGN2477 в/в, причем 8 субъектов рандомизировали в соотношении 6:2 в каждую из первых 3 панелей (панели А, В и С), а 24 субъектов рандомизировали в соотношение 1:1:1:1 (по 6 субъектов в каждой) в панель D.

Панель А: 4 субъекта REGN1033 (6 мг/кг в/в) + низкая доза REGN2477 (1 мг/кг в/в) или 2 субъекта плацебо.

Панель В: 4 субъекта REGN1033 (6 мг/кг в/в) + средняя доза REGN2477 (3 мг/кг в/в) или 2 субъекта плацебо.

Панель С: 4 субъекта REGN1033 (6 мг/кг в/в) + высокая доза REGN2477 (10 мг/кг в/в) или 2 субъекта плацебо.

Панель D: REGN1033(6 мг/кг в/в) + высокая доза REGN2477 (10 мг/кг в/в) плацебо, REGN2477 (10 мг/кг в/в) или REGN1033 (6 мг/кг в/в).

Субъекты получали одну внутривенную дозу одного или обоих антител REGN1033 против GDF8 и/или антител REGN2477 против активина А. В первичных анализах группы плацебо и комбинации высоких доз объединили по панелям, в результате получилось 12 субъектов, получавших плацебо, и 12, получавших комбинацию высокой дозы, как показано на фиг. 2А. Схему введения доз, показанную на фиг. 2А, использовали в исследованиях, показанных на каждой из последующих фиг. 2В-17.

Субъекты участвовали в периоде скрининга до 28 дней с последующим базовым и лечебным посещением в 1 день и последующим периодом 113 дней.

Анализ эффективности и безопасности

В полную выборку для анализа (FAS) входят все рандомизированные субъекты; он основан на на-

значенном лечении (при рандомизации). Конечные точки эффективности анализировали с использованием FAS. В выборку анализа безопасности (SAF) входят все рандомизированные субъекты, которые получали любое лекарственное средство исследования; он основан на полученном лечении (по лечению). Соблюдение режима лечения/введение и все переменные клинической безопасности анализировали с использованием SAF.

Переменные эффективности включали объем мышечной ткани бедра, исключая и включая внутримышечную жировую ткань и большие сосуды, который измеряют с помощью магнитно-резонансной томографии (MRI); общую безжировую массу, которую измеряют с помощью двухэнергетической рентгеновской абсорбциометрии (DXA); аппендикулярную безжировую массу тела (рассчитываемую по уравнению LBM), которую измеряют с помощью DXA; и общую жировую массу, которую измеряют с помощью DXA.

Демографические и базовые характеристики субъектов уравнивали по группам лечения, как показано в приведенной ниже табл. 5.

Таблица 5. Базовые характеристики уравнивали по группам лечения

	Плацебо	Антитела против GDF8	Антитела против активина A (10 мг/кг) в/в	Антитела против GDF8+против активина A (1 мг/кг) в/в	Антитела против GDF8+против активина A (3 мг/кг) в/в	Антитела против GDF8+против активина (10 мг/кг) в/в
	(N=12)	(N=6)	(N=6)	(N=6)	(N=6)	(N=12)
Возраст (Лет)						
Медиана	54	56	61	60	60	55,5
Рост (см)						
Медиана	162,5	164,2	162,5	166,5	165	163,5
Масса (кг)						
Медиана	68,35	70,5	69,6	61,35	67,05	70,4
ВМТ (кг/м ²)						
Медиана	26,2	26,55	26,65	22,9	25,55	26,6

Статистические методы

Процентное изменение и изменение переменных эффективности от исходного уровня либо к 4, либо к 8 неделе в полной выборке для анализа (FAS) анализировали с использованием модели анализа ковариации (ANCOVA) с группой лечения в качестве фиксированного эффекта и базовым значением в качестве непрерывной ковариаты. Из этой модели получали средние значения по методу наименьших квадратов на 4 неделе и 8 неделе для каждой группы лечения с соответствующей стандартной ошибкой, доверительным интервалом и значением *p* для сравнения лечения. Субъектов плацебо объединили по панелям. Отсутствующие данные эффективности не рассчитывали. В этом исследовании не применяли поправку для множественного тестирования.

Результаты

В общей сложности 48 субъектов рандомизировали, вводили лекарственное средство исследования и проводили исследование. У одного субъекта в группе REGN2477+REGN1033 в высокой дозе прервали инфузию лекарственного средства исследования из-за нежелательного явления "набухания в месте инфузии".

Эффективность

Блокирование как активина А, так и GDF8 в комбинации увеличивало объем мышц бедра и уменьшало жировую массу на 8 неделе, как показано на фиг. 2В и 2С. Наибольший эффект был замечен в комбинации с самой высокой дозой.

На фиг. 2В представлена гистограмма, показывающая % изменение объема мышц бедра при MRI на 8 неделе после разовой дозы у женщин в постменопаузе. Цифры показывают изменения по сравнению с плацебо. * обозначает номинальный *p*<0,05 по сравнению с плацебо; **** обозначает номинальный *p*<0,0001 по сравнению с плацебо. Количества разовой дозы в виде мг/кг либо антитела против активина А и/либо антитела против GDF8 показаны под гистограммой. Лечение комбинациями REGN2477+REGN1033 в средней и высокой дозе привело к значительному увеличению объема мышц бедра (*p*<0,05; *p*<0,0001 соответственно) зависимым от дозы образом по сравнению с плацебо. У субъектов панели высокой дозы наблюдалось до 7,73% в виде % изменения от исходного уровня по сравнению с плацебо на 8 неделе.

На фиг. 2С представлена гистограмма, показывающая % изменение общей жировой массы посред-

ством DXA на 8 неделе после разовой дозы у женщин в постменопаузе. Цифры показывают изменения по сравнению с плацебо. * обозначает номинальный $p < 0,05$ по сравнению с плацебо; **** обозначает номинальный $p < 0,0001$ по сравнению с плацебо. Количества разовой дозы в виде мг/кг либо антитела против активина А и/либо антитела против GDF8 показаны под гистограммой. Лечение комбинацией REGN2477+REGN1033 в высокой дозе привело к значительному уменьшению общей жировой массы ($p < 0,05$) по сравнению с плацебо.

Как показано на фиг. 3, антитело REGN2477 против активина А в комбинации с антителом REGN1033 против GDF8 приводит к зависимому от дозы увеличению объема мышц бедра. Результаты измерения объема мышц бедра с помощью MRI за исключением межмышечной жировой ткани и больших сосудов аналогичным образом представлены в табл. 6 ниже. Лечение комбинацией REGN2477+REGN1033 в средней и высокой дозе привело к значительному увеличению объема мышц бедра ($p < 0,05$) по сравнению с плацебо, как показано в табл. 6.

Таблица 6. Объем мышц бедра, измеренный с помощью MRI*

		Плацебо	антитела против GDF8	антитела против активина А Высокая Доза	антитела против GDF8+a нтитела против активина А Низкая доза	антитела против GDF8+a нтитела против активина А Средняя доза	антитела против GDF8+a нтитела против активина А Высокая Доза
4 неделя,	N	12	6	6	6	6	12
% изменение	среднее значение	0,4	3,3	0,3	4,9	4,6	5,9
8 неделя,	среднее значение	0,9	4,6	2,9	3,4	6,2	7,8
% изменение	Δ LSM vs плацебо (SE)		3,73 (1,819)	1,97 (1,821)	2,63 (1,824)	5,31 (1,817)	6,85 (1,484)
	Номинальный p-значение		0,0467	0,2846	0,1569	0,0056	<0,0001

* за исключением межмышечной жировой ткани и больших сосудов.

Как показано в табл. 4, лечение комбинациями REGN2477+REGN1033 в средней и высокой дозе привело к значительному увеличению объема мышц бедра зависимым от дозы образом по сравнению с плацебо.

На фиг. 4 показано, что увеличение объема мышц бедра постоянно наблюдалось у отдельных субъектов после лечения комбинацией антитело против активина А+антитело против GDF8. В каждой группе лечения разные линии обозначают разных людей.

Профиль влияния на аппендикулярную безжировую массу (сумма безжировой массы рук и ног) комбинации антитела REGN2477 против активина А+антитела REGN1033 против GDF8 аналогичен профилю влияния на объем мышц бедра, как показано на фиг. 5. Результаты измерения аппендикулярной безжировой массы с помощью DXA аналогичным образом представлены в табл. 7. Комбинации средней и высокой дозы значительно увеличивали аппендикулярную безжировую массу по сравнению с плацебо, как показано в табл. 7.

Таблица 7. Аппендикулярная безжировая масса посредством DXA

		Плацебо	Антитела против GDF8	Антитела против активина А Высокая Доза	Антитела против GDF8+антитела активина А Низкая доза	Антитела против GDF8+антитела активина А Средняя доза	Антитела против GDF8+антитела активина А Высокая Доза
	N	12	6	6	6	6	12
Исходный уровень, кг	Среднее значение	17,44	18,10	18,02	17,92	18,67	17,32
4 неделя, % Изменение	Среднее значение	-0,2	1,2	2,1	4,2	4,6	3,8
8 неделя, % Изменение	Среднее значение	0,8	2,6	2,3	3,7	6,9	5,8
	Δ LSM vs Плацебо (SE)		1,90 (1,266)	1,61 (1,265)	2,96 (1,264)	6,39 (1,275)	4,97 (1,031)
	Номинальный р-значение		0,1418	0,2109	0,0242	<0,0001	<0,0001

Как показано на фиг. 6, блокирование как активина А, так и GDF8 приводит к уменьшению общей жировой массы, которую оценивают с помощью DXA. Комбинация высокой дозы антитела REGN1033 против GDF8 и антитела REGN2477 против активина А значительно снизило на 8 неделе общую жировую массу посредством DXA по сравнению с плацебо (* $p < 0,05$). Результаты измерения общей жировой массы с помощью DXA аналогичным образом представлены в табл. 8 ниже.

Таблица 8. Общая жировая масса посредством DXA

		антитела против GDF8	антитела против активина А	антитела против GDF8+антитела активина А	антитела против GDF8+антитела активина А	антитела против GDF8+антитела активина А
	Доза	Высокая	Высокая	Low	Mid	Высокая
	N	6	6	6	6	12
8 неделя, % Изменение	Δ LSM vs Плацебо (SE)	-2,11 (1,96)	-0,69 (1,93)	-0,2 (1,93)	-2,08 (1,93)	-3,92 (1,58)*

* $p < 0,05$.

Также было обнаружено, что блокирование активина А и GDF8 связано с уменьшением андройдной жировой массы, которую оценивают с помощью DXA, как показано на фиг. 7. Комбинация высокой дозы антитела REGN1033 против GDF8 и антитела REGN2477 против активина А значительно снижает андройдную жировую массу посредством DXA по сравнению с плацебо на 8 неделе (* $p < 0,05$).

Дополнительные результаты эффективности показаны на фиг. 8-17 и приведены в таблицах ниже. Высокая, средняя и низкая дозы REGN2477+REGN1033 показаны на фиг. 2А.

По сравнению с плацебо в группах средней ($p < 0,05$) и высокой дозы ($p < 0,001$) REGN2477+REGN1033 наблюдалось значительное увеличение объема мышц бедра за исключением внутримышечной жировой ткани и больших сосудов (фиг. 8). Объем мышц бедра увеличился на 8 неделе в группе REGN2477+REGN1033 в высокой дозе на 7,73% по сравнению с 0,88% в группе плацебо (номинальный $p < 0,001$). По сравнению с плацебо REGN2477+REGN1033 в средней дозе и REGN1033 отдельно

также значительно увеличивали объем мышц бедра. Увеличение объема мышц бедра постоянно наблюдалось у отдельных субъектов, которых лечат комбинацией с зависимостью от дозы (Данные не показаны).

По сравнению с плацебо в группе REGN2477+REGN1033 в высокой дозе наблюдалось значительное увеличение общей безжировой массы посредством DXA ($p<0,05$) (фиг. 9).

Аппендикулярная безжировая масса тела (рассчитанная по уравнению aLBM) значительно увеличилась в каждой из групп лечения комбинацией REGN2477+REGN1033 по сравнению с плацебо (группы низкой дозы $p<0,05$, средней и высокой дозы $p<0,001$) (фиг. 10). Аппендикулярная безжировая масса тела увеличилась на 8 неделе в группе средней дозы REGN2477+REGN1033 на 7,15% от исходного уровня по сравнению с 0,76% в группе плацебо. Аналогично, аппендикулярная безжировая масса тела увеличилась в группе REGN2477+REGN1033 в высокой дозе на 5,7% от исходного уровня по сравнению с 0,76% в группе плацебо.

Общая жировая масса значительно уменьшилась в группе лечения высокой дозой REGN2477+REGN1033; общая жировая масса уменьшилась: на 3,92% (группа высокой дозы) по сравнению с плацебо на 0,5% (номинальный $p<0,05$) (фиг. 11).

По сравнению с плацебо объем мышц бедра, включая внутримышечную жировую ткань и большие сосуды, значительно увеличился на 4 неделе и на 8 неделе в каждой из групп среднего и высокого уровня дозы REGN2477+REGN1033 и в группе REGN1033 (фиг. 12). В группе низкой дозы REGN2477+REGN1033 также наблюдалось значительное увеличение на 4 неделе объема мышц бедра, включая внутримышечную жировую ткань и большие сосуды по сравнению с плацебо.

Аппендикулярная безжировая масса (сумма рук и ног) значительно увеличилась на 4 и 8 неделе в каждой из групп лечения комбинацией REGN2477+REGN1033 ($p<0,05$) по сравнению с плацебо (фиг. 13).

Андройдная жировая масса в группе лечения высокой дозой REGN2477+REGN1033 также значительно уменьшилась (фиг. 14). Андройдная жировая масса уменьшилась на 6,6% в группе REGN2477+REGN1033 в высокой дозе по сравнению с отсутствием уменьшения в группах плацебо.

Объем внутримышечной жировой ткани бедра (см^3) значительно увеличился на 8 неделе в группе REGN2477+REGN1033 в высокой дозе ($p<0,05$) по сравнению с плацебо (фиг. 15).

Снижение жировой ткани в группе высокой дозы наблюдалось по сумме внутримышечной и межмышечной жировой ткани (IMAT) (фиг. 16) и в группе низкой и средней дозы подкожной жировой ткани (фиг. 17). Наоборот, внутримышечная жировая ткань бедра увеличилась в группе высокой дозы до 8% по сравнению с плацебо с уменьшением на 4% (фиг. 17).

В группе REGN2477+REGN1033 в высокой дозе значительно увеличились все основные показатели объема мышц и безжировой массы по сравнению с плацебо как на 4 неделе, так и на 8 неделе; влияние на 4 неделе было в целом менее выраженным, чем на 8 неделе (табл. 9). В табл. 9 ниже показаны сводные данные процентного изменения основных показателей состава тела на 8 неделе (представлены полная выборка для анализа, средние значения LS и SE).

Таблица 9. Сводные данные изменения состава тела на 8 неделе

Конечная точка		Плацебо	R1033 (6 мг/кг)	R2477 (10 мг/кг)	Низкая	Средняя	Высокая
					R2477 (1 мг/кг)	R2477 (3 мг/кг)	R2477 (10 мг/кг)
					+ R1033	+ R1033	+ R1033
		(n= 12)	(n= 6)	(n= 6)	(n= 6)	(n= 6)	(n= 12)
Объем мышц бедра	% Изменение от исходного уровня	0,88 (1,05)	4,61 (1,49)	2,85 (1,49)	3,51 (1,49)	6,19 (1,48)	7,73 (1,05)
	Различия по сравнению с плацебо		3,73 (1,82)*	1,97 (1,82)	2,63 (1,82)	5,31 (1,82)*	6,85 (1,48)**
Общая Безжировая масса посредством DXA	% Изменение от исходного уровня	1,31 (0,64)	2,18 (0,89)	1,94 (0,90)	3,16 (0,89)	4,67 (0,89)	4,31 (0,63)
	Различия по сравнению с плацебо		0,88 (1,10)	0,63 (1,11)	1,85 (1,10)	3,37 (1,10)*	3,00 (0,89)*
Аппендикуляр ная Безжировая масса тела	% Изменение от исходного уровня	0,76 (0,73)	2,65 (1,03)	2,37 (1,03)	3,72 (1,03)	7,15 (1,04)	5,72 (0,73)
	Различия по сравнению с плацебо		1,90 (1,27)	1,61 (1,26)	2,96 (1,26)*	6,39 (1,27)**	4,97 (1,03)**
Общая Жировая масса посредством DXA	% Изменение от исходного уровня	-0,65 (1,12)	-2,76 (1,60)	-1,34 (1,58)	-0,85 (1,58)	-2,73 (1,58)	-4,57 (1,12)
	Различия по сравнению с плацебо		-2,11 (1,96)	-0,69 (1,93)	-0,2 (1,93)	-2,08 (1,93)	-3,92 (1,58)*

* $p<0,05$; ** $p<0,001$

В табл. 9 выше изменения от исходного уровня и различия по сравнению с плацебо представляют

собой средние значения методом наименьших квадратов (LS) на основе модели ANCOVA с исходным уровнем в качестве ковариаты и лечением в качестве фиксированного фактора. Стандартные ошибки (SE) и р-значения также взяты из ANCOVA. Приведены номинальные р-значения.

Массовая плотность минеральных веществ костной ткани (BMD) и массовое содержание минеральных веществ в костной ткани (BMC) измеряли посредством DXA, как показано в табл. 10. При высокой дозе R2477+R1033 увеличивали содержание минеральных веществ в костной ткани, которое измеряют с помощью DXA, хотя общая минеральная плотность костной ткани не изменилась (табл. 10).

Сумму жировой массы рук и ног измеряли, как показано в табл. 10. При высокой дозе R2477+R1033 уменьшали сумму жировой массы рук и ног ($p < 0,05$).

Данные анализа основных конечных точек показаны в табл. 10 ниже.

Таблица 10. Первичный анализ конечных точек эффективности

Параметр	Посещение Анализ	Плацебо	R2477	R1033+R2	R1033+R24	R1033+R24	
		(n= 12)	(10 мг/кг) в/в (n= 6)	477 (1 мг/кг) в/в (n= 6)	77 (3 мг/кг) в/в (n= 6)	77 (10 мг/кг) в/в (n= 12)	
Объем мышечной ткани бедра (см ³), За исключением внутримышечной Жировой ткани и Больших Сосудов/% изменение	LS Среднее значение (SE) 4 неделя	0,37 (0,76)	3,27 (1,07)	0,27 (1,08)	4,96 (1,08)	4,61 (1,07)	5,92 (0,76)
	LS Среднее различие (SE)/4 неделя		2,9 (1,32)*	-0,11 (1,32)	4,59 (1,32)*	4,24 (1,31)*	5,55 (1,07)**
	LS Среднее значение (SE)/8 неделя	0,88 (1,05)	4,61 (1,49)	2,85 (1,49)	3,51 (1,49)	6,19 (1,48)	7,73 (1,05)
	LS Среднее различие (SE)/8 неделя		3,73 (1,82)*	1,97 (1,82)	2,63 (1,82)	5,31 (1,82)*	6,85 (1,48)**
	LS Среднее значение (SE)/4 неделя	1,64 (3,26)	13,95 (4,61)	-0,14 (4,63)	20,29 (4,63)	18,77 (4,61)	24,5 (3,26)
	LS Среднее различие (SE)/4 неделя		12,32 (5,65)*	-1,78 (5,66)	18,65 (5,67)*	17,14 (5,64)*	22,86 (4,61)**
	LS Среднее значение (SE)/8 неделя	3,5 (4,13)	20,42 (5,85)	11,22 (5,87)	14,55 (5,88)	25,44 (5,85)	31,95 (4,14)
	LS Среднее различие (SE)/8 неделя		16,91 (7,17)*	7,71 (7,18)	11,05 (7,19)	21,94 (7,16)*	28,45 (5,85)**
	LS Среднее значение (SE)/4 неделя	0,21 (0,78)	3,32 (1,1)	-0,2 (1,11)	5 (1,11)	4,49 (1,1)	5,76 (0,78)
	LS Среднее различие (SE)/4 неделя		3,1 (1,35)*	-0,41 (1,36)	4,79 (1,35)*	4,28 (1,35)*	5,54 (1,1)**
LS Среднее значение (SE)/8 неделя	0,85 (1,06)	4,14 (1,51)	2,47 (1,52)	3,14 (1,51)	5,99 (1,5)	7,41 (1,06)	
LS Среднее различие (SE)/8 неделя		3,29 (1,84)	1,62 (1,85)	2,29 (1,85)	5,14 (1,84)*	6,57 (1,5)**	
LS Среднее значение (SE)/4 неделя	0,99 (3,45)	14,76 (4,89)	-2,61 (4,94)	21,22 (4,91)	19,35 (4,89)	25,22 (3,45)	

	LS Среднее различие (SE)/4 неделя	13,77 (5,99)*	-3,6 (6,02)	20,24 (6,01)*	18,36 (5,98)*	24,23 (4,88)**	
	LS Среднее значение (SE)/8 неделя	3,55 (4,42)	19,54 (6,25)	9,26 (6,32)	13,64 (6,29)	26,04 (6,25)	32,27 (4,42)
	LS Среднее различие (SE)/8 неделя	15,99 (7,66)*	5,72 (7,7)	10,09 (7,69)	22,49 (7,65)*	28,72 (6,25)**	
Аппендикулярная безжировая масса тела (расчитанная по уравнению aLBM) (кг)% изменение	LS Среднее значение (SE)/4 неделя	-0,31 (0,74)	1,26 (1,04)	2,15 (1,04)	4,26 (1,04)	4,77 (1,05)	3,7 (0,74)
	LS Среднее различие (SE)/4 неделя	1,57 (1,28)	2,46 (1,28)	4,57 (1,28)**	5,08 (1,29)**	4,01 (1,04)**	
	LS Среднее значение (SE)/8 неделя	0,76 (0,73)	2,65 (1,03)	2,37 (1,03)	3,72 (1,03)	7,15 (1,04)	5,72 (0,73)
	LS Среднее различие (SE)/8 неделя	1,9 (1,27)	1,61 (1,26)	2,96 (1,26)*	6,39 (1,27)**	4,97 (1,03)**	
Изменение	LS Среднее значение (SE)/4 неделя	-0,05 (0,13)	0,23 (0,18)	0,35 (0,18)	0,73 (0,18)	0,84 (0,18)	0,63 (0,13)
	LS Среднее различие (SE)/4 неделя	0,28 (0,22)	0,4 (0,22)	0,78 (0,22)*	0,89 (0,22)**	0,68 (0,18)**	
	LS Среднее значение (SE)	0,11 (0,13)	0,45 (0,19)	0,41 (0,19)	0,64 (0,18)	1,28 (0,19)	1,02 (0,13)
	LS Среднее различие (SE)/8 неделя	0,33(0,23)	0,29 (0,23)	0,53 (0,23)*	1,16 (0,23)**	0,91 (0,18)**	
Общая Безжировая масса (кг)% изменение	LS Среднее значение (SE)/4 неделя	0,16 (0,56)	0,71 (0,79)	1,53 (0,79)	3,42(0,79)	3,52 (0,79)	2,84 (0,56)
	LS Среднее различие (SE)/4 неделя	0,55 (0,97)	1,37 (0,98)	3,26 (0,98)*	3,36 (0,98)*	2,69 (0,79)*	
	LS Среднее значение (SE)/8 неделя	1,31 (0,64)	2,18 (0,89)	1,94 (0,9)	3,16 (0,89)	4,67 (0,89)	4,31 (0,63)
	LS Среднее различие (SE)/8 неделя	0,88 (1,1)	0,63 (1,11)	1,85 (1,1)	3,37 (1,1)*	3 (0,89)*	
изменение	LS Среднее значение (SE)/4 неделя	0,08 (0,23)	0,25 (0,33)	0,61 (0,33)	1,42 (0,33)	1,44 (0,33)	1,14 (0,23)
	LS Среднее различие (SE)/4 неделя	0,17 (0,41)	0,54 (0,41)	1,34 (0,41)*	1,36 (0,41)*	1,07 (0,33)*	
	LS Среднее значение (SE)/8 неделя	0,53 (0,27)	0,86 (0,37)	0,78 (0,37)	1,27 (0,37)	1,92 (0,37)	1,8 (0,26)
	LS Среднее различие (SE)/8 неделя	0,33 (0,46)	0,25 (0,46)	0,74 (0,46)	1,39 (0,46)*	1,26 (0,37)*	

Аппендикулярная	LS Среднее значение (SE)/4 неделя	-0,35	1,2	2,02	4,06	4,51	3,54
Безжировая масса		(0,74)	(1)	(1)	(1)	(1)	(0,71)
(сумма							
безжировой массы							
рук и ног) (кг)/%							
изменение							
	LS Среднее различие (SE)/4 неделя		1,56	2,37	4,42	4,87	3,89
			(1,25)	(1,24)	(1,24)**	(1,26)**	(1,02)**
	LS Среднее значение (SE)/8 неделя	0,95	2,51	2,22	3,53	6,74	5,48
		(0,72)	(0,97)	(0,97)	(0,97)	(0,98)	(0,69)
	LS Среднее различие (SE)/8 неделя		1,56	1,28	2,58	5,79	4,53
			(1,22)	(1,21)	(1,21)*	(1,23)**	(0,99)**
изменение	LS Среднее значение (SE)/4 неделя	-0,06	0,23	0,35	0,73	0,83	0,64
		(0,14)	(0,18)	(0,18)	(0,18)	(0,19)	(0,13)
	LS Среднее различие (SE)/4 неделя		0,28	0,41	0,79	0,89	0,69
			(0,23)	(0,23)	(0,23)*	(0,23)**	(0,19)**
	LS Среднее значение (SE)/8 неделя	0,17	0,44	0,4	0,64	1,26	1,02
		(0,14)	(0,18)	(0,18)	(0,18)	(0,18)	(0,13)
	LS Среднее различие (SE)/8 неделя		0,27	0,23	0,48	1,09	0,86
			(0,23)	(0,23)	(0,23)*	(0,23)**	(0,19)**
Общая Жировая	LS Среднее значение (SE)/4 неделя	-0,11	-1,15	1,32	-0,76	-1,52	-2,58
масса (кг)/%		(0,81)	(1,15)	(1,14)	(1,14)	(1,14)	(0,8)
изменение							
	LS Среднее различие (SE)/4 неделя		-1,04	1,42	-0,65	-1,41	-2,47
			(1,41)	(1,39)	(1,39)	(1,39)	(1,14)*
	LS Среднее значение (SE)/8 неделя	-0,65	-2,76	-1,34	-0,85	-2,73	-4,57
		(1,12)	(1,6)	(1,58)	(1,58)	(1,58)	(1,12)
	LS Среднее различие (SE)/8 неделя		-2,11	-0,69	-0,2	-2,08	-3,92
			(1,96)	(1,93)	(1,93)	(1,93)	(1,58)*
изменение	LS Среднее значение (SE)/4 неделя	0,07	-0,18	0,29	-0,29	-0,38	-0,6
		(0,21)	(0,3)	(0,29)	(0,29)	(0,29)	(0,21)
	LS Среднее различие (SE)/4 неделя		-0,25	0,23	-0,36	-0,45	-0,67
			(0,36)	(0,36)	(0,36)	(0,36)	(0,29)*
	LS Среднее значение (SE)/8 неделя	-0,04	-0,54	-0,46	-0,34	-0,75	-1,16
		(0,28)	(0,4)	(0,4)	(0,4)	(0,4)	(0,28)
	LS Среднее различие (SE)/8 неделя		-0,5	-0,42 (0,49)	-0,3	-0,71	-1,12
			(0,49)		(0,49)	(0,49)	(0,4)*
Андронная	LS Среднее значение (SE)/4 неделя	-0,21	-1,57	0,44	-2,47	-1,8	-3,94
жировая масса		(1,3)	(1,85)	(1,84)	(1,84)	(1,83)	(1,3)
(кг)/% изменение							
	LS Среднее различие (SE)/4 неделя		-1,35	0,65	-2,25	-1,59	-3,73
			(2,26)	(2,25)	(2,25)	(2,25)	(1,83)*
	LS Среднее значение (SE)	-0,05	-2,35	-4,67	-1,71	-2,62	-6,65
		(1,69)	(2,4)	(2,39)	(2,39)	(2,38)	(1,69)
	LS Среднее различие (SE)/8 неделя		-2,31	-4,62	-1,66	-2,57	-6,61
			(2,93)	(2,92)	(2,93)	(2,92)	(2,38)*

изменение	LS Среднее значение (SE)/4 неделя	0,03 (0,03)	0,01 (0,04)	0 (0,04)	-0,05 (0,04)	-0,04 (0,04)	-0,07 (0,03)
	LS Среднее различие (SE)/4 неделя		-0,01 (0,05)	-0,02 (0,05)	-0,07 (0,05)	-0,06 (0,05)	-0,1 (0,04)*
	LS Среднее значение (SE)/8 неделя	0,03 (0,04)	-0,01 (0,05)	-0,09 (0,05)	-0,03 (0,05)	-0,07 (0,05)	-0,13 (0,04)
	LS Среднее различие (SE)/8 неделя		-0,04 (0,06)	-0,11 (0,06)	-0,06 (0,06)	-0,1 (0,06)	-0,16 (0,05)*
Объем внутримышечной Жировой ткани Бедр (см ³)/% объем	LS Среднее значение (SE)/4 неделя	-2,9 (3)	-2 (4,24)	-3,44 (4,23)	6,19 (4,28)	-2,99 (4,24)	8,25 (2,98)
	LS Среднее различие (SE)/4 неделя		0,9 (5,22)	-0,54 (5,17)	9,09 (5,27)	-0,09 (5,17)	11,15 (4,23)*
	LS Среднее значение (SE)/8 неделя	-4,19 (4,21)	-3,35 (5,96)	0,65 (5,95)	1,14 (6,02)	-3,88 (5,96)	7,26 (4,19)
	LS Среднее различие (SE)/8 неделя		0,84 (7,34)	4,84 (7,26)	5,33 (7,41)	0,31 (7,27)	11,45 (5,95)
изменение	LS Среднее значение (SE)/4 неделя	-0,09 (0,13)	-0,07 (0,18)	-0,2 (0,18)	0,14 (0,18)	-0,12 (0,18)	0,24 (0,13)
	LS Среднее различие (SE)/4 неделя		0,02 (0,22)	-0,11 (0,22)	0,23 (0,22)	-0,03 (0,22)	0,33 (0,18)
	LS Среднее значение (SE)/8 неделя	-0,17 (0,17)	-0,13 (0,24)	-0,02 (0,24)	-0,08 (0,25)	-0,22 (0,24)	0,2 (0,17)
	LS Среднее различие (SE)/8 неделя		0,04 (0,3)	0,15 (0,3)	0,09 (0,3)	-0,05 (0,3)	0,37 (0,24)
Сумма внутримышечной и межмышечной жировой ткани (IMAT)/% изменение	LS Среднее значение (SE)/4 неделя	0,98 (1,4)	-3,09 (1,98)	1,63 (1,99)	-2,09 (2,03)	1,75 (1,99)	-1,54 (1,4)
	LS Среднее различие (SE)/4 неделя		-4,07 (2,43)	0,65 (2,43)	-3,07 (2,47)	0,77 (2,43)	-2,52 (1,98)
	LS Среднее значение (SE)/8 неделя	0,94 (1,49)	-0,12 (2,12)	0,26 (2,13)	-0,5 (2,17)	-1,63 (2,12)	-2,76 (1,49)
	LS Среднее различие (SE)/8 неделя		-1,06 (2,6)	-0,68 (2,59)	-1,44 (2,64)	-2,57 (2,59)	-3,7 (2,11)
Изменение	LS Среднее значение (SE)/4 неделя	1,05 (1,65)	-3,45 (2,34)	2,29 (2,35)	-3,2 (2,4)	1,93 (2,35)	-1,75 (1,65)
	LS Среднее различие (SE)/4 неделя		-4,5 (2,87)	1,24 (2,87)	-4,25 (2,92)	0,88 (2,87)	-2,8 (2,33)
	LS Среднее значение (SE)/8 неделя	0,69 (1,8)	0,28 (2,56)	0,48 (2,57)	-1,73 (2,62)	-1,97 (2,57)	-3,04 (1,81)

	LS Среднее различие (SE)/8 неделя	-0,4 (3,14)	-0,21 (3,13)	-2,42 (3,19)	-2,66 (3,13)	-3,73 (2,55)
Объем Подкожной Жировой ткани	LS Среднее значение (SE)/4 неделя	-1,27 (1,02)	0,05 (1,45)	-0,26 (1,47)	-1,67 (1,44)	-1,98 (1,44)
(см ³)/% изменение	LS Среднее различие (SE)/4 неделя	1,32 (1,78)	1,01 (1,82)	-0,4 (1,76)	-0,71 (1,76)	-0,49 (1,44)
	LS Среднее значение (SE)/8 неделя	1,31 (1,21)	1,01 (1,71)	1,56 (1,75)	-3,73 (1,71)	-3,04 (1,7)
	LS Среднее различие (SE)/8 неделя	-0,31 (2,11)	0,25 (2,15)	-5,04 (2,09)*	-4,36 (2,09)*	-2,77 (1,7)
изменение	LS Среднее значение (SE)/4 неделя	-3,94 (3,83)	0,35 (5,42)	-0,74 (5,52)	-8,23 (5,39)	-3,02 (5,39)
	LS Среднее различие (SE)/4 неделя	4,29 (6,68)	3,19 (6,8)	-4,3 (6,6)	0,92 (6,6)	-3,35 (5,39)
	LS Среднее значение (SE)/8 неделя	4,74 (4,74)	5,7 (6,7)	5,53 (6,83)	-17,58 (6,67)	-8,75 (6,66)
	LS Среднее различие (SE)/8 неделя	0,95 (8,26)	0,79 (8,41)	-22,33 (8,16)*	-13,5 (8,17)	-10,3 (6,66)
Сумма жировой массы рук и ног	LS Среднее значение (SE)/4 неделя	-0,8 (1,01)	-0,59 (1,44)	1,89 (1,42)	0,48 (1,42)	-2,87 (1,42)
(кг)/% изменение	LS Среднее различие (SE)/4 неделя	0,21 (1,78)	2,69 (1,74)	1,28 (1,74)	-2,07 (1,74)	-2,51 (1,42)
	LS Среднее значение (SE)/8 неделя	-0,47 (1,34)	-2,44 (1,9)	0,11 (1,87)	0,27 (1,87)	-3,51 (1,87)
	LS Среднее различие (SE)/8 неделя	-1,97 (2,35)	0,58 (2,31)	0,74 (2,3)	-3,04 (2,3)	-4,73 (1,88)*
изменение	LS Среднее значение (SE)/4 неделя	-0,09 (0,12)	-0,06 (0,17)	0,21 (0,16)	0,01 (0,16)	-0,33 (0,16)
	LS Среднее различие (SE)/4 неделя	0,02 (0,2)	0,3 (0,2)	0,09 (0,2)	-0,25 (0,2)	-0,33 (0,16)
	LS Среднее значение (SE)/8 неделя	-0,05 (0,15)	-0,26 (0,22)	-0,03 (0,21)	-0,07 (0,21)	-0,41 (0,21)
	LS Среднее различие (SE)/8 неделя	-0,21 (0,27)	0,02 (0,26)	-0,02 (0,26)	-0,37 (0,26)	-0,58 (0,22)*
Общая Минеральных веществ в костной ткани (BMD)	LS Среднее значение (SE)/4 неделя	0,05 (0,25)	-0,22 (0,36)	-0,48 (0,35)	-0,04 (0,36)	0,47 (0,36)
(г/см ²)/% изменение	LS Среднее различие (SE)/4 неделя	-0,27 (0,43)	-0,53 (0,43)	-0,09 (0,44)	0,42 (0,44)	0,5 (0,35)

изменение	LS Среднее значение (SE)/8 неделя	-0,01 (0,28)	-0,47 (0,4)	-0,72 (0,4)	-0,08 (0,4)	-0,22 (0,41)	0,16 (0,28)	
	LS Среднее различие (SE)/8 неделя		-0,46 (0,49)	-0,71 (0,49)	-0,07 (0,5)	-0,21 (0,5)	0,17 (0,4)	
	LS Среднее значение (SE)/4 неделя	0 (0,003)	-0,002 (0,004)	-0,005 (0,004)	0 (0,004)	0,005 (0,004)	0,006 (0,003)	
	LS Среднее различие (SE)/4 неделя		0 (0)	-0,01 (0)	0 (0)	0 (0)	0,01 (0)	
	LS Среднее значение (SE)/8 неделя	0 (0,003)	-0,006 (0,004)	-0,008 (0,004)	0 (0,004)	-0,002 (0,004)	0,002 (0,003)	
	LS Среднее различие (SE)/8 неделя		-0,01 (0,01)	-0,01 (0,01)	0 (0,01)	0 (0,01)	0 (0)	
Общее массовое содержание минеральных веществ в костной ткани (BMC) (кг)/% изменение	LS Среднее значение (SE)/4 неделя	0,1 (0,28)	-0,16 (0,4)	-0,23 (0,4)	0,25 (0,4)	-0,19 (0,4)	0,62 (0,28)	
	LS Среднее различие (SE)/4 неделя		-0,26 (0,49)	-0,33 (0,49)	0,15 (0,49)	-0,29 (0,49)	0,52 (0,4)	
	LS Среднее значение (SE)/8 неделя	-0,42 (0,26)	-0,27 (0,36)	-0,48 (0,36)	-0,08 (0,36)	-0,56 (0,36)	0,65 (0,25)	
	LS Среднее различие (SE)/8 неделя		0,16 (0,45)	-0,05 (0,44)	0,34 (0,44)	-0,14 (0,44)	1,07 (0,36)*	
	LS Среднее значение (SE)/4 неделя	0,002 (0,006)	-0,003 (0,009)	-0,005 (0,009)	0,006 (0,009)	-0,003 (0,009)	0,014 (0,006)	
	LS Среднее различие (SE)/4 неделя		-0,01 (0,01)	-0,01 (0,01)	0 (0,01)	-0,01 (0,01)	0,01 (0,01)	
	LS Среднее значение (SE)/8 неделя	-0,009 (0,006)	-0,007 (0,008)	-0,011 (0,008)	-0,001 (0,008)	-0,012 (0,008)	0,014 (0,006)	
	LS Среднее различие (SE)/8 неделя		0 (0,01)	0 (0,01)	0,01 (0,01)	0 (0,01)	0,02 (0,01)*	
	T-показатель для Общего Тела/% изменение	LS Среднее значение (SE)/4 неделя	-18,26 (18,01)	-51,19 (25,74)	-2,95 (25,45)	-6,66 (25,7)	-39,76 (25,87)	-0,9 (17,96)
		LS Среднее различие (SE)/4 неделя		-32,93 (31,23)	15,31 (31,1)	11,6 (31,56)	-21,5 (31,73)	17,37 (25,43)
		LS Среднее значение (SE)/8 неделя	-20,87 (17,94)	-58,54 (25,64)	3,83 (25,35)	5,16 (25,6)	23,12 (25,77)	8,49 (17,89)
		LS Среднее различие (SE)/8 неделя		-37,67 (31,11)	24,71 (30,98)	26,04 (31,44)	44 (31,61)	29,36 (25,33)
изменение	LS Среднее значение (SE)/4 неделя	0,01 (0,03)	-0,03 (0,05)	-0,07 (0,05)	0 (0,05)	0,06 (0,05)	0,08 (0,03)	
	LS Среднее различие (SE)/4 неделя		-0,04 (0,06)	-0,07 (0,06)	-0,01 (0,06)	0,06 (0,06)	0,07 (0,05)	
	LS Среднее значение (SE)/8 неделя	0 (0,04)	-0,07 (0,05)	-0,1 (0,05)	-0,01 (0,05)	-0,03 (0,06)	0,03 (0,04)	
	LS Среднее различие (SE)/8 неделя		-0,07 (0,07)	-0,1 (0,07)	-0,01 (0,07)	-0,03 (0,07)	0,03 (0,05)	

Примечание: Средние значения методом наименьших квадратов (LS), стандартные ошибки (SE) и р-значение взяты из ANCOVA. Модель содержит базовое измерение в качестве ковариаты и лечение в качестве фиксированного фактора. * обозначает р-значение < 0,05; ** обозначает р-значение < 0,001.

По сравнению с плацебо комбинация R2477+R1033 значительно увеличивала объем мышц бедра и общую безжировую массу в группах средней и высокой дозы (фиг. 8 и 9), значительно увеличивала апендикулярную безжировую массу тела в группах всех доз (фиг. 10) и значительно уменьшала общую жировую массу, а также андройдную жировую массу в группе высокой дозы (табл. 10). R2477+R1033 в группе высокой дозы значительно увеличивала все основные показатели объема мышц и безжировой массы по сравнению с плацебо, как на 4 неделе, так и на 8 неделе; влияние на 4 неделе было в целом менее выраженным, чем на 8 неделе (табл. 10). На 8 неделе в группе высокой дозы R2477 против активина A+R1033 против GDF8 наблюдалось увеличенное % изменение общего содержания минеральных веществ в костной ткани по сравнению с плацебо, которое измеряют с помощью DXA, хотя общая минеральная плотность костной ткани не изменилась (табл. 10).

Безопасность

Все возникшие при лечении нежелательные явления (ТЕАЕ) имели тяжесть от легких до средних за исключением одного тяжелого ТЕАЕ "перелома лучевой кости", о котором сообщил субъект из группы плацебо. Серьезных нежелательных явлений, смертей и прекращений лечения из-за ТЕАЕ не было. Головная боль была наиболее частым ТЕАЕ в каждой из групп лечения, возникая у 58,3% всех субъектов исследования и у 50% субъектов плацебо. Мышечные спазмы, тошнота и изъязвление во рту были другими частыми ТЕАЕ в группах REGN2477+REGN1033, которые возникали у 25% или более субъектов в группах с комбинацией R2477+R1033; эти ТЕАЕ встречались реже в группе плацебо, но, по-видимому, не было четкой зависимости от дозы. Не было четких сигналов о кровотечении или диарее, нежелательных явлениях, связанных с блокадой рецепторов активина. Одно ТЕАЕ в виде носового кровотечения (предпочтительный термин эпистаксиса) произошло в группе, получавшей дозу R2477+R1033 - оно исчезло через 9 мин.

Обзор потенциально клинически значимых значений (PCSV) не выявил значительных различий между REGN2477+REGN1033 и плацебо в лабораторных исследованиях, показателях жизненно важных функций и ЭКГ, которые указывали бы на отрицательные эффекты REGN2477+REGN1033. В категориях лабораторий, показателей жизненно важных функций и ЭКГ в группах комбинированной дозировки REGN2477+REGN1033 было 0-2 субъекта с PCSV (N из 24); однако процент субъектов с PCSV был равен или ниже, чем в группе плацебо. Не было выявлено вызванных лечением PCSV, связанных с функциональными тестами печени.

Выводы

У здоровых женщин в постменопаузе однократные внутривенные дозы REGN2477+REGN1033 увеличивали объем мышц бедра, общую безжировую массу и аппендикулярную безжировую массу тела. Одним из неожиданных открытий была однородность изменений мышц бедра: у всех лиц, подвергшихся воздействию комбинации, наблюдалось увеличение объема мышц бедра, как показано на фиг. 4. Кроме того, однократные внутривенные дозы REGN2477+REGN1033 снижали общее количество жира и, в частности андройдную жировую массу. Обработка только REGN1033 увеличивала объем мышц бедра.

В общем, REGN2477, REGN1033 и REGN2477+REGN1033 в этом клиническом исследовании, как считается, имеют приемлемый профиль безопасности и хорошо переносятся. Не было серьезных нежелательных явлений.

Объем настоящего изобретения не следует ограничивать конкретными вариантами осуществления, описанными в данном документе. Действительно, специалистам в данной области из вышеперечисленного описания и сопровождающих фигур станет очевидно множество модификаций изобретения в дополнение к тем, что описаны в данном документе. Предполагается, что такие модификации подпадают в объем прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ увеличения мышечной массы и уменьшения жировой массы у субъекта, включающий введение субъекту первой композиции, содержащей эффективное количество ингибитора GDF8, и второй композиции, содержащей эффективное количество ингибитора активина А,

где ингибитор GDF8 представляет собой выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывает GDF8,

причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывает GDF8, содержит определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR) вариательной области тяжелой цепи (HCVR), содержащие SEQ ID NO: 360, и определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR) вариательной области легкой цепи (LCVR), содержащие SEQ ID NO: 368,

где ингибитор активина А представляет собой выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывает активин А, и

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывает активин А, содержит определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR) вариательной области тяжелой цепи (HCVR), содержащие SEQ ID NO: 553, и определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR) вариательной области легкой цепи (LCVR), содержащие SEQ ID NO: 537.

2. Способ увеличения мышечной массы и уменьшения жировой массы у субъекта, включающий введение субъекту композиции, содержащей эффективное количество ингибитора GDF8 и эффективное количество ингибитора активина А,

где ингибитор GDF8 представляет собой выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывает GDF8,

причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывает GDF8, содержит определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR) вариательной области тяжелой цепи (HCVR), содержащие SEQ ID NO: 360, и определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR) вариательной области легкой цепи (LCVR), содержащие SEQ ID NO: 368,

где ингибитор активина А представляет собой выделенное антитело или его антигенсвязывающий

фрагмент, который специфически связывает активин А, и

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывает активин А, содержит определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR) варибельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащие SEQ ID NO: 553, и определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR) варибельной области легкой цепи (LCVR), содержащие SEQ ID NO: 537.

3. Способ по п.1 или 2, причем эффективное количество ингибитора GDF8 включает в себя режим дозирования, выбираемый из группы, состоящей из по меньшей мере 0,01 мг/кг до 10 г/кг, от 1 мг/кг до 1 г/кг и от 10 до 100 мг/кг.

4. Способ по любому из пп.1-3, в котором эффективное количество ингибитора активина А включает в себя режим дозирования, выбираемый из группы, состоящей из по меньшей мере от 0,01 мг/кг до 10 г/кг, от 1 мг/кг до 1 г/кг и от 10 до 100 мг/кг.

5. Способ по п.1 или 2, в котором эффективное количество ингибитора GDF8 включает в себя режим дозирования, выбираемый из группы, состоящей из разовой дозы от 0,01 до 20 мг/кг массы тела, от 0,1 до 10 мг/кг массы тела и от 0,1 до 5 мг/кг массы тела.

6. Способ по пп.1, 2 или 5, в котором эффективное количество ингибитора активина А включает в себя режим дозирования, выбираемый из группы, состоящей из разовой дозы от 0,01 до 20 мг/кг массы тела, от 0,1 до 10 мг/кг массы тела и от 0,1 до 5 мг/кг массы тела.

7. Способ по любому из пп.1-6, в котором эффективное количество ингибитора GDF8 составляет 6 мг/кг массы тела субъекта.

8. Способ по любому из пп.1-7, в котором эффективное количество ингибитора активина А составляет 3 или 10 мг/кг массы тела субъекта.

9. Способ по п.1, в котором первая композиция составлена для внутривенного, подкожного или перорального введения.

10. Способ по п.1, в котором вторая композиция составлена для внутривенного, подкожного или перорального введения.

11. Способ по п.1, в котором первую и вторую композиции объединяют перед введением в третью композицию.

12. Способ по п.11, в котором третья композиция составлена для внутривенного, подкожного или перорального введения.

13. Способ по п.2, в котором композиция составлена для внутривенного, подкожного или перорального введения.

14. Способ по любому из пп.1-13, дополнительно включающий измерение общей жировой массы и/или андронидной жировой массы у субъекта перед введением.

15. Способ по п.14, дополнительно включающий измерение общей жировой массы и/или андронидной жировой массы у субъекта после введения и введение композиции до тех пор, пока общая жировая масса и/или андронидная жировая масса у субъекта не снизится по меньшей мере на 2-8%, по меньшей мере на 2,5-6%, по меньшей мере 3-4% или по меньшей мере 3,5%.

16. Способ по любому из пп.1-15, в котором антитело или антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывает GDF8, содержит три HCDR, содержащие SEQ ID NO: 362, SEQ ID NO: 364 и SEQ ID NO: 366, и три LCDR, содержащие SEQ ID NO: 370, SEQ ID NO: 372 и SEQ ID NO: 374.

17. Способ по любому из пп.1-16, в котором антитело или антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывает активин А, содержит три HCDR, содержащие SEQ ID NO: 555, SEQ ID NO: 557 и SEQ ID NO: 559, и три LCDR, содержащие SEQ ID NO: 539, SEQ ID NO: 541 и SEQ ID NO: 543.

18. Способ по любому из пп.1-17, в котором ингибитор активина А представлен в количестве, выбираемом из группы, состоящей из от 100 до 200% количества ингибитора GDF8, от 100 до 250% количества ингибитора GDF8, от 100 до 300% количества ингибитора GDF8 и от 100 до 400% по массе количества ингибитора GDF8.

19. Способ по п.18, в котором количество ингибитора активина А в 1,5-2,0 раза больше по массе, чем количество ингибитора GDF8.

20. Способ по любому из пп.1-19, в котором уменьшением жировой массы у субъекта является уменьшение общей жировой массы, которую измеряют с помощью DXA (двухэнергетической рентгеновской абсорбциометрии).

21. Способ по любому из пп.1-19, в котором уменьшением жировой массы у субъекта является уменьшение андронидной жировой массы, которую измеряют с помощью DXA (двухэнергетической рентгеновской абсорбциометрии).

22. Способ по любому из пп.1-21, в котором у субъекта стимулируется увеличение объема мышц после введения.

23. Способ по любому из пп.1-22, в котором у субъекта отсутствует состояние или заболевание мышечного истощения.

24. Применение ингибитора GDF8 для лечения заболевания или расстройства, характеризующегося повышенной жировой массой, причем ингибитор GDF8 и ингибитор активина А вводятся субъекту, где ингибитор GDF8 представляет собой выделенное антитело или его антигенсвязывающий фраг-

мент, который специфически связывает GDF8,

причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывает GDF8, содержит определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR) варибельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащие SEQ ID NO: 360, и определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR) варибельной области легкой цепи (LCVR), содержащие SEQ ID NO: 368,

где ингибитор активина А представляет собой выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывает активин А, и

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывает активин А, содержит определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR) варибельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащие SEQ ID NO: 553, и определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR) варибельной области легкой цепи (LCVR), содержащие SEQ ID NO: 537, и

где у субъекта стимулируется уменьшение жировой массы.

25. Применение ингибитора активина А для лечения заболевания или расстройства, характеризующегося повышенной жировой массой, причем ингибитор активина А и ингибитор GDF8 вводятся субъекту,

где ингибитор GDF8 представляет собой выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывает GDF8,

причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывает GDF8, содержит определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR) варибельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащие SEQ ID NO: 360, и определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR) варибельной области легкой цепи (LCVR), содержащие SEQ ID NO: 368,

где ингибитор активина А представляет собой выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывает активин А, и

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывает активин А, содержит определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR) варибельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащие SEQ ID NO: 553, и определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR) варибельной области легкой цепи (LCVR), содержащие SEQ ID NO: 537, и

где у субъекта стимулируется уменьшение жировой массы.

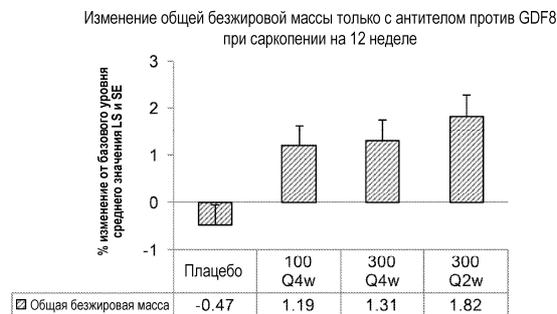
26. Способ уменьшения жировой массы у субъекта, причем способ включает введение субъекту ингибитора активина А и ингибитора GDF8,

где ингибитор GDF8 представляет собой выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывает GDF8,

причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывает GDF8, содержит определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR) варибельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащие SEQ ID NO: 360, и определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR) варибельной области легкой цепи (LCVR), содержащие SEQ ID NO: 368,

где ингибитор активина А представляет собой выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывает активин А, и

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывает активин А, содержит определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR) варибельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащие SEQ ID NO: 553, и определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR) варибельной области легкой цепи (LCVR), содержащие SEQ ID NO: 537.

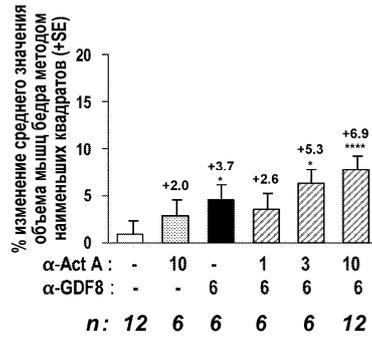


Фиг. 1

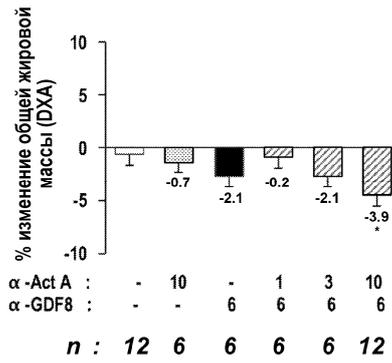
Низкая доза, панель А N = 8 (6:2)	Средняя доза, панель В N = 8 (6:2)	Высокая доза, панель В N = 8 (6:2)	Панель В N = 24 (6:6:6:6)
1 мг/кг антитела против активина А + 6 мг/кг антитела против GDF8	3 мг/кг антитела против активина А + 6 мг/кг антитела против GDF8	10 мг/кг антитела против активина А + 6 мг/кг антитела против GDF8	10 мг/кг антитела против активина А + 6 мг/кг антитела против GDF8
Плацебо	Плацебо	Плацебо	Плацебо
-	-	-	6 мг/кг антитела против GDF8
-	-	-	10 мг/кг антитела против активина А

→ N = 12 комбинированная высокая доза по сравнению с
→ N = 12 объединенное плацебо

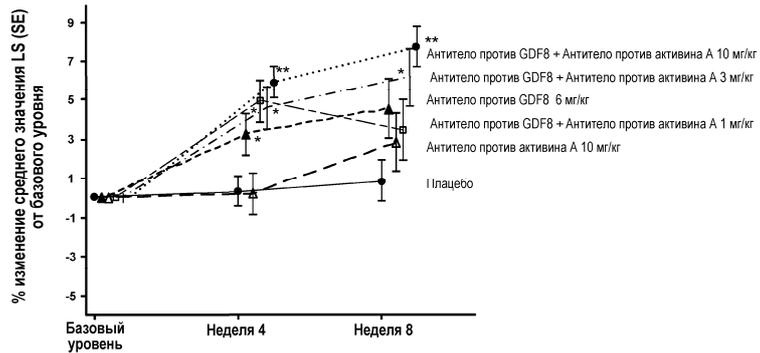
Фиг. 2А



Фиг. 2В

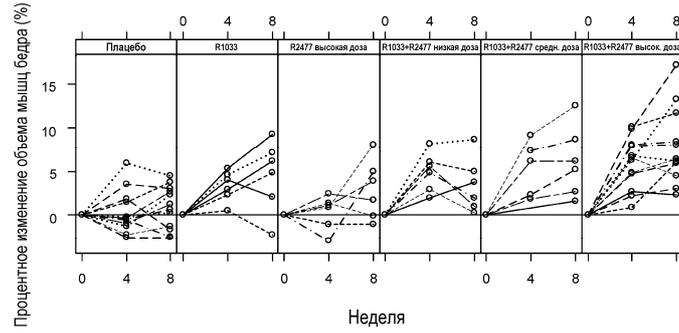


Фиг. 2С

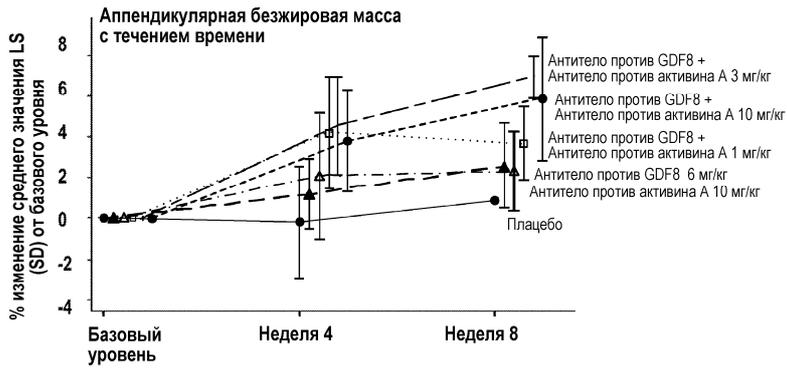


Фиг. 3

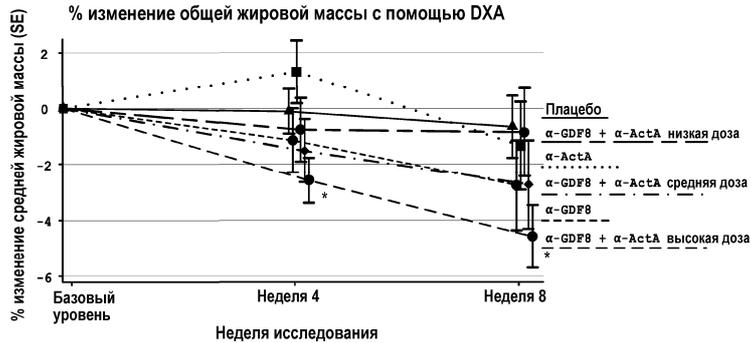
Процентное изменение объема мышц бедра от базового уровня



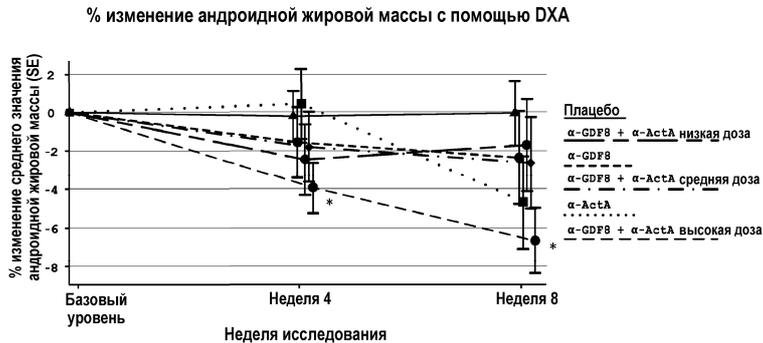
Фиг. 4



Фиг. 5

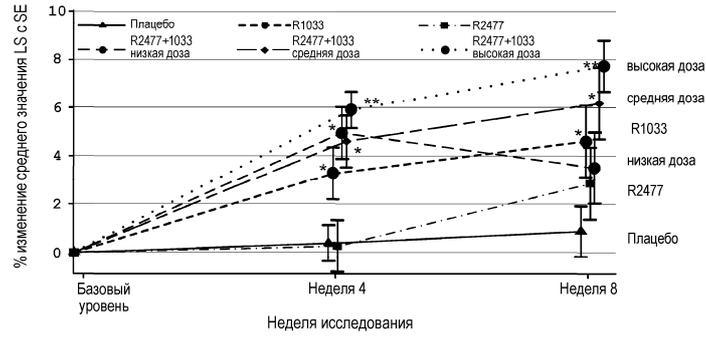


Фиг. 6



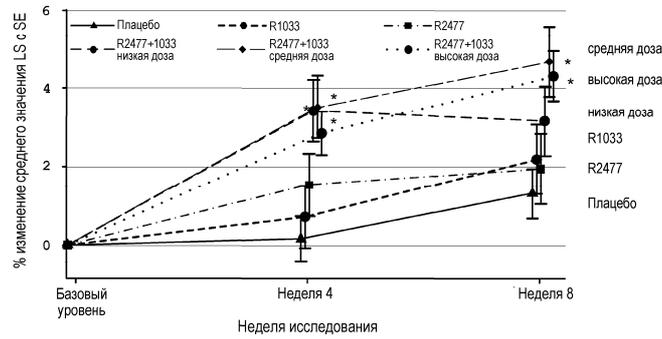
Фиг. 7

% изменение объема мышечной ткани бедра (см³) за исключением внутримышечной жировой ткани и больших сосудов



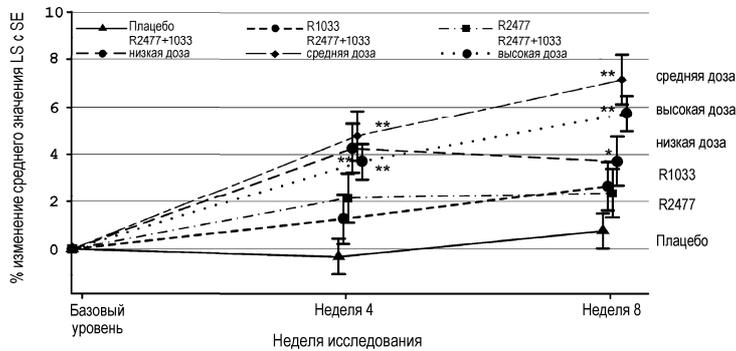
Фиг. 8

% изменение общей безжировой массы (кг)



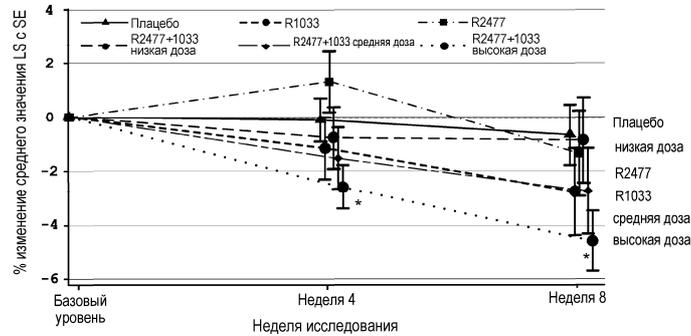
Фиг. 9

% изменение аппендикулярной безжировой массы тела

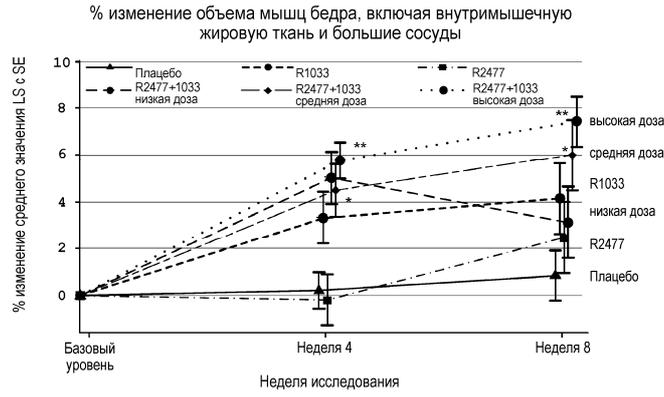


Фиг. 10

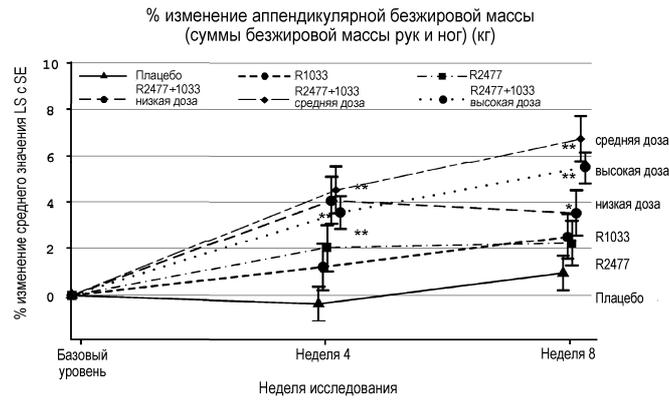
% изменение общей жировой массы (кг)



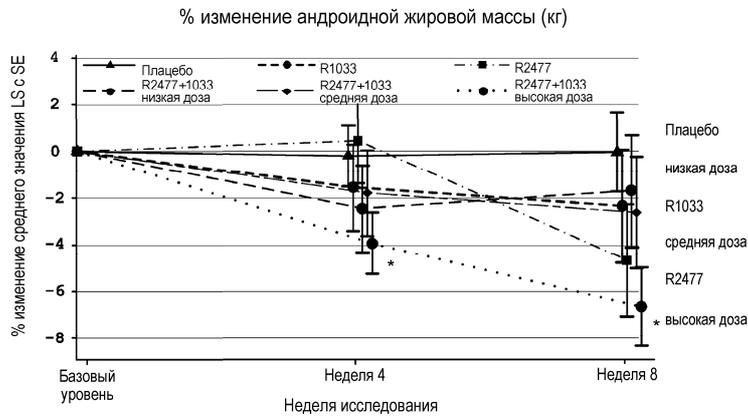
Фиг. 11



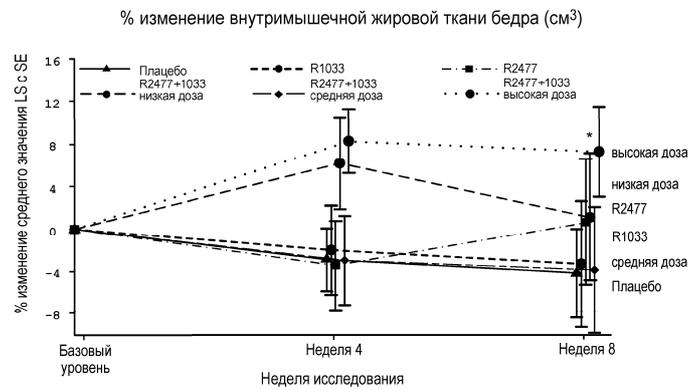
Фиг. 12



Фиг. 13



Фиг. 14



Фиг. 15

