

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 384 176**

51 Int. Cl.:  
**C07K 16/22** (2006.01)  
**G01N 33/53** (2006.01)  
**C07K 16/00** (2006.01)  
**A61K 39/40** (2006.01)  
**A61K 39/42** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**C12P 21/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05734951 .6**  
96 Fecha de presentación: **17.03.2005**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1733041**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.12.2006**

54 Título: **Anticuerpos anti-miostatina**

30 Prioridad:  
**23.03.2004 US 555456 P**  
**05.04.2004 US 559621 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**02.07.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**02.07.2012**

73 Titular/es:  
**ELI LILLY & COMPANY**  
**LILLY CORPORATE CENTER**  
**INDIANAPOLIS, IN 46285, US**

72 Inventor/es:  
**SMITH, Rosamund Carol;**  
**KIKLY, Kristine Kay;**  
**TOBIAS, Linda O. y**  
**HAN, Bomie**

74 Agente/Representante:  
**Carpintero López, Mario**

ES 2 384 176 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-miostatina

**Campo de la invención**

La presente invención se encuentra en el campo de la medicina, en particular en el campo de los anticuerpos monoclonales contra la miostatina. En forma más específica la invención se refiere a la neutralización de anticuerpos monoclonales anti-miostatina que se unen a un epítipo novedoso identificado sobre la forma madura de la miostatina. Los anticuerpos de la invención pueden ser murinos, quiméricos, o anticuerpos humanizados, inmunocombinados de los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos. Los anticuerpos de la invención son útiles en mamíferos para incrementar la masa muscular, aumentar la densidad ósea, o para el tratamiento de afecciones en las que la presencia de miostatina origina o contribuye a efectos patológicos indeseables o en las que una disminución en los niveles de miostatina contribuye a un efecto terapéutico deseable.

**Antecedentes de la invención**

Los miembros de la superfamilia de proteínas del factor de crecimiento transformador beta (TGF- $\beta$ ) están involucrados en el desarrollo embrionario y en la homeostasis del tejido adulto. Los miembros de la superfamilia del TGF- $\beta$  comparten una estructura común que incluye una secuencia de señal peptídica corta necesaria para la secreción de la proteína y un fragmento amino terminal que está proteolíticamente escindido aproximadamente 105 a 140 aminoácidos del terminal carboxi de la proteína precursora grande ("proteína") para producir la proteína madura. La proteína madura se caracteriza por los residuos de cisteína muy conservados, mientras que la forma activa de la proteína es un dímero enlazado por disulfuro de la proteína madura (Gray, A., and Maston, A., Science, 247:1328, 1990). Además se han detectado heterodímeros de los miembros de la superfamilia del TGF- $\beta$  y parecen tener diferentes propiedades biológicas que los homodímeros.

La miostatina, también denominada factor-8 de diferenciación del crecimiento (GDF-8) es un miembro de la superfamilia de proteínas del TGF- $\alpha$ . La miostatina se expresa principalmente en el desarrollo y el músculo esquelético adulto y funciona como un regulador negativo del músculo esquelético. La miostatina está muy conservada a través de las especies; la secuencia de aminoácidos de la forma madura de la miostatina en el ser humano, el ratón, la rata y la vaca es 100% idéntica. El epítipo inmunogénico identificado en la presente invención es 100% idéntico en el ser humano, el ratón, la rata, el pollito, el perro, el caballo, la cabra, la oveja, la vaca y el cerdo. El factor-11 de diferenciación del crecimiento, también denominado GDF-11 o BMP-11, es el miembro de la superfamilia de proteínas del TGF- $\beta$  que es el más homólogo a la miostatina. La miostatina humana y el GDF-11 son 90% idénticos en el nivel aminoácido dentro de sus cadenas maduras.

La Patente Estadounidense número 5.827.733 enseña la secuencia polinucleotídica y la secuencia de aminoácidos de la miostatina humana mientras que la Patente Estadounidense número 6.096.506 reivindica un anticuerpo específicamente reactivo con el polipéptido GDF-8 o un epítipo del mismo. La Patente Estadounidense número 2003/0138422 reivindica un anticuerpo que se une específicamente a una proteína del GDF-8 que comprende un péptido particular. La Patente Estadounidense número 6.468.535 reivindica un procedimiento para aumentar la masa muscular animal mediante la administración de un anticuerpo anti-GDF-8. La Patente Estadounidense número 6.368.597 enseña el uso de un anticuerpo GDF-8 para tratar la diabetes.

Actualmente hay tratamientos efectivos limitados para los trastornos o las afecciones que se beneficiarían de un incremento en la masa muscular y/o la resistencia muscular incluyendo la distrofia muscular, fragilidad, miopatía de cuidado intensivo, y caquexia que surgen del cáncer u otros trastornos, incluyendo pero sin limitación infección por VIH, cuidado intensivo y miopatías. Debido a su función como regulador negativo del crecimiento del músculo esquelético, la miostatina es una diana deseable para la intervención quirúrgica para estos trastornos. Existe una enorme necesidad terapéutica de obtener un medio para inhibir específicamente la actividad de la miostatina mientras no se inhiba o se inhiba mínimamente la actividad de otras proteínas de la superfamilia del TGF- $\beta$ . Además existe la necesidad terapéutica de disminuir específicamente el nivel de miostatina presente en un paciente mientras no disminuya de manera correspondiente el nivel de otras proteínas de la superfamilia del TGF- $\beta$ . En particular, un anticuerpo monoclonal específicamente reactivo a la miostatina (por ej., que se une específicamente o reconoce la miostatina o una porción de la misma) y significativamente menos reactiva o no reactiva con otros miembros de la superfamilia de proteínas del TGF- $\beta$  (por ej., GDF-11) puede proporcionar una terapia particularmente beneficiosa para incrementar la masa muscular y/o aumentar la resistencia muscular. De particular utilidad terapéutica son las formas quiméricas o humanizadas de este tipo de anticuerpo monoclonal. La miostatina es muy conservada en secuencia y en función a través de la especie; por lo tanto, no sólo puede este tipo de anticuerpo ser útil para el tratamiento de estos trastornos en humanos, sino además en otros mamíferos incluyendo, por ej., animales domésticos (por ej., canino y felino), animales para el deporte (por ej., equinos) y animales para la alimentación (por ej., bovinos, porcinos, aves y ovinos) particularmente cuando las regiones de marco y constantes del anticuerpo se originan sustancialmente de la especie animal en la cual el anticuerpo debe ser terapéuticamente usado. Los anticuerpos anti-miostatina de la invención además pueden ser útiles para tratar trastornos o afecciones que se benefician de un incremento de los niveles de miostatina incluyendo, pero sin limitación, aquéllas que se benefician del incremento de la densidad ósea (por ej., osteoporosis), diabetes tipo II, síndrome metabólico,

obesidad, osteoartritis, sepsia, trastorno pulmonar obstructivo crónico ("TPOC") y trastornos que están asociados con el desgaste muscular tales como enfermedad renal, enfermedad o insuficiencia cardíaca y enfermedad hepática.

Los anticuerpos anti-miostatina de la presente invención ofrecen ventajas sobre otros anticuerpos anti-miostatina en la técnica. La invención presenta la neutralización de anticuerpos monoclonales anti-miostatina capaces de unir un polipéptido que consiste de aminoácidos en los residuos 40-64 (por ej., SEC ID NO: 46 para miostatina humana) de la forma madura de miostatina y neutralizan una actividad de miostatina *in vitro*, *in vivo* o *in situ*. Dado que los miembros de la familia del TGF- $\beta$  tiene un elevado grado de homología (por ej., la miostatina es aproximadamente 90% homóloga al GDF-11) se prefieren los anticuerpos anti-miostatina tales como los de la presente invención, que no son de reacción cruzada o de una reacción cruzada mínima con el GDF-11 que tiene una importante función en el establecimiento del patrón esquelético (McPherron, A., et al., Nature Genetics, 22:260-265, 1999), para el uso terapéutico en comparación con los anticuerpos que tienen una reacción cruzada con el GDF-11 en un mayor grado.

### Sumario de la invención

Los anticuerpos monoclonales anti-miostatina, o sus fragmentos de unión al antígeno, que se unen específicamente o reconocen un polipéptido que consiste de aminoácidos 40-64 de la forma madura de miostatina de origen mamífero, preferentemente humano, ANYCSGECEFLVFLQKYPHTHLVHQA (SEC ID NO: 46), o un polipéptido que consiste de la secuencia: ANYCSGESEFVFLQKYPHTHLVHQA (SEC ID NO: 43) se describen en la presente invención. Estos anticuerpos se denominan en la presente "anticuerpos monoclonales de la invención" o "anticuerpos de la invención". Un anticuerpo monoclonal de la invención puede ser murino, quimérico, o anticuerpos humanizados, inmunoconjugados de estos anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno de los mismos. Con preferencia, un anticuerpo monoclonal de la invención existe en una población homogénea o sustancialmente homogénea. Con preferencia, un anticuerpo monoclonal de la invención se une a la miostatina (o bien la proproteína o la forma madura de la proteína, monomérica o dimérica) dentro del dominio que abarca los aminoácidos ANYCSGECEFLVFLQKYPHTHLVHQA (SEC ID NO: 46) y de esta forma antagoniza o neutraliza al menos una actividad o propiedad biológica *in vitro*, *in vivo* o *in situ* asociada con la miostatina o una porción de la misma.

De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención se proporciona un anticuerpo monoclonal anti-miostatina o un fragmento funcional del mismo que se une específicamente a un polipéptido que consiste de aminoácidos 40-64 de una forma madura de miostatina humana como se muestra en la SEC ID NO: 46:

Ala Asn Tyr Cys Ser Gly Glu Cys Glu Phe Val Phe Leu Gln Lys Tyr

Pro His Thr His Leu Val His Gln Ala

Preferentemente, el anticuerpo monoclonal o un fragmento funcional del mismo de la presente invención es inhibido competitivamente de unirse a la miostatina humana madura por un anticuerpo monoclonal que comprende dos polipéptidos con secuencias seleccionadas de:

- (i) SEC ID NOs: 3 y 12,
- (ii) SEC ID NOs: 4 y 13,
- (iii) SEC ID NOs: 3 y 14,
- (iv) SEC ID NOs: 5 y 12,
- (v) SEC ID NOs: 6 y 15,
- (vi) SEC ID NOs: 7 y 17,
- (vii) SEC ID NOs: 8 y 12,
- (viii) SEC ID NOs: 9 y 16,
- (ix) SEC ID NOs: 10 y 12, y
- (x) SEC ID NOs: 11 y 12.

Los anticuerpos monoclonales de la invención se unen preferentemente o reconocen la miostatina en el GDF-11, un miembro de la superfamilia del TGF- $\beta$  cuya forma madura tiene aproximadamente 90% de homología de aminoácido a la forma madura de miostatina. Preferentemente dichos anticuerpos se unen a la miostatina con mayor afinidad o especificidad que con la que se unen al GDF-11 según se determinó, por ejemplo, mediante el ensayo ELISA, el ensayo ELISA competitivo o los valores  $K_D$  en un ensayo BIAcore® (por ej., véase el ejemplo 4). Más aún, los anticuerpos monoclonales de la invención pueden tener más valores  $K_{on}$ ,  $K_{off}$ , o  $K_a$  más favorables con respecto a la unión de miostatina que con respecto a la unión del GDF-11. Con preferencia un anticuerpo de la invención no es de reacción cruzada con el GDF-11 o de reacción cruzada a un nivel del 5%, 4%, 3%, 2%, 1 % o menos con el GDF-11.

El anticuerpo monoclonal o el fragmento funcional del mismo se une preferentemente a la miostatina con al menos 20 veces más de afinidad que con la que se une al GDF-11.

5 En una realización, un anticuerpo monoclonal anti-miostatina de la invención comprende un polipéptido de la región variable de cadena liviana ("LCVR") con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de las SECs ID NOs: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11.

10 En otra realización, un anticuerpo monoclonal anti-miostatina de la invención comprende un polipéptido de la región variable de cadena pesada ("HCVR") con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de las SECs ID NOs: 12, 13, 14, 15, 16 y 17. En otra realización, un anticuerpo monoclonal anti-miostatina de la invención comprende un polipéptido de HCVR con la SEC ID NO: 12 con aminoácidos 26-37 reemplazados con las SEC ID NOs: 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53 o 54. Las secuencias asociadas con cada número de SEC ID se muestran en las tablas 1 y 2 y en las figuras 4 y 5 en la presente.

15 En otra realización, un anticuerpo monoclonal anti-miostatina de la invención comprende un (a) polipéptido de LCVR con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de las SECs ID NOs: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11 y (b) un polipéptido de HCVR con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de las SECs ID NOs: 12, 13, 14, 15, 16 y 17 o un polipéptido de HCVR con la SEC ID NO: 12 con aminoácidos 26-37 reemplazados con las SEC ID NOs: 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53 o 54. Se contempla un anticuerpo de la invención que comprende cualquier combinación de los anteriores polipéptidos de la LCVR y la HCVR, pero se prefieren los anticuerpos que comprenden las siguientes combinaciones de las LCVR y HCVR: (i) SEC ID NOs: 3 y 12; (ii) SEC ID NOs: 4 y 13; (iii) SEC ID NOs: 3 y 14; (iv) SEC ID NOs: 5 y 12; (v) SEC ID NOs: 6 y 15; (vi) SEC ID NOs: 7 y 17; (vii) SEC ID NOs: 8 y 12; (viii) SEC ID NOs: 9 y 16; (ix) SEC ID NOs: 10 y 12; (x) SEC ID NOs: 11 y 12; (xi) SEC ID NOs: 3 y la SEC ID NO: 12 con aminoácidos 26-37 reemplazados con las SEC ID NOs: 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53 o 54.

20 En otra realización, un anticuerpo monoclonal de la invención es uno que puede competir para la unión a la miostatina humana o una porción de la miostatina humana con un anticuerpo competidor que comprende dos polipéptidos con las secuencias que se muestran en el grupo que consiste de: (i) SEC ID NOs: 3 y 12, (ii) SEC ID NOs: 4 y 13, (iii) SEC ID NOs: 3 y 14, (iv) SEC ID NOs: 5 y 12, (v) SEC ID NOs: 6 y 15, (vi) SEC ID NOs: 7 y 17, (vii) SEC ID NOs: 8 y 12, (viii) SEC ID NOs: 9 y 16, (ix) SEC ID NOs: 10 y 12, (x) SEC ID NOs: 11 y 12, y (xi) SEC ID NOs: 3 y la SEC ID NO: 12 con aminoácidos 26-37 reemplazados con las SEC ID NOs: 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53 o 54.

25 En otra realización, una LCVR de un anticuerpo monoclonal anti-miostatina de la invención comprende 1, 2 o 3 péptidos seleccionados del grupo que consiste de péptidos con una secuencia como se muestra en las SECs ID NOs: 38, 23 y 56 (véase la tabla 1). Preferentemente un péptido con la secuencia que se muestra en la SEC ID NO: 38, cuando está presente en dicho anticuerpo, está en la CDR1 de la LCVR. Preferentemente, un péptido con la secuencia que se muestra en la SEC ID NO: 23, cuando está presente en dicho anticuerpo, está en la CDR2 de la LCVR. Preferentemente, un péptido con la secuencia que se muestra en la SEC ID NO: 56, cuando está presente en dicho anticuerpo, está en la CDR3 de la LCVR.

30 En otra realización, una LCVR de un anticuerpo monoclonal anti-miostatina de la invención comprende 1, 2 o 3 péptidos seleccionados del grupo que consiste de péptidos con una secuencia como se muestra en (a) las SECs ID NOs: 18, 19, 20, 21 o 22; (b) SEC ID NO: 23, y (c) la SEC ID NO: 24, 25, 26, 27 o 28. Preferentemente, un péptido con la secuencia que se muestra en las SECs ID NOs: 18, 19, 20, 21, o 22, cuando está presente en un anticuerpo de la invención, está en la CDR1 de la LCVR. Preferentemente un péptido con la secuencia que se muestra en la SEC ID NO: 23, cuando está presente en un anticuerpo de la invención, está en la CDR2 de la LCVR. Preferentemente un péptido con la secuencia que se muestra en la SEC ID NO: 24, 25, 26, 27 o 28, cuando está presente en un anticuerpo de la invención, está en la CDR3 de la LCVR. La LCVR además comprenderá la secuencia de marco. En un anticuerpo humanizado para uso terapéutico en humanos, la secuencia de marco puede ser sustancialmente de origen humano. En un anticuerpo para uso en un animal no humano, la secuencia de la región de marco puede originarse sustancialmente del genoma del animal en la cual debe usarse terapéuticamente.

35 En otra realización, una HCVR de un anticuerpo monoclonal anti-miostatina de la invención comprende 1, 2 o 3 péptidos seleccionados del grupo que consiste de péptidos con una secuencia como se muestra en las SECs ID NOs: 55, 41 y 42 (véase la tabla 2). Preferentemente un péptido con la secuencia que se muestra en la SEC ID NO: 55, cuando está presente en dicho anticuerpo, está en la CDR1 de la HCVR. Preferentemente, un péptido con la secuencia que se muestra en la SEC ID NO: 41, cuando está presente en dicho anticuerpo, está en la CDR2 de la HCVR. Preferentemente, un péptido con la secuencia que se muestra en la SEC ID NO: 42, cuando está presente en dicho anticuerpo, está en la CDR3 de la HCVR.

40 En otra realización, una HCVR de un anticuerpo monoclonal anti-miostatina de la invención comprende 1, 2 o 3 péptidos seleccionados del grupo que consiste de péptidos con una secuencia como se muestra en (a) las SECs ID NOs: 29, 30, 31, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53 o 54; (b) SEC ID NO: 32, 33, 34, o 35 y (c) 36 o 37. Preferentemente, un péptido con la secuencia que se muestra en las SECs ID NOs: 29, 30, 31, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53 o 54, cuando está presente en un anticuerpo de la invención, está en la CDR1 de la HCVR. Preferentemente un péptido con la secuencia que se muestra en la SEC ID NO: 32, 33, 34, o 35, cuando está presente en un anticuerpo de la

invención, está en la CDR2 de la HCVR. Preferentemente un péptido con la secuencia que se muestra en la SEC ID NO: 36 o 37, cuando está presente en un anticuerpo de la invención, está en la CDR3 de la HCVR. La HCVR además comprenderá la secuencia de marco. En un anticuerpo humanizado para uso terapéutico en humanos, la secuencia de marco puede ser sustancialmente de origen humano. En un anticuerpo para uso en un animal no humano, la secuencia del marco puede originarse sustancialmente del genoma del animal en la cual debe usarse terapéuticamente.

Una realización de la invención proporciona un anticuerpo monoclonal anti-miostatina que comprende los seis péptidos con la secuencia que se muestra en las SECs ID NOs: 38, 23, 56, o 55, 41 y 42. Preferentemente, en dicho anticuerpo, el péptido con la secuencia que se muestra en la SEC ID NO: 38 se localiza en la CDR1 de la LCVR, el péptido con la secuencia que se muestra en la SEC ID NO: 23 se localiza en la CDR2 de la LCVR, el péptido con la secuencia que se muestra en la SEC ID NO: 56 se localiza en la CDR3 de la LCVR, el péptido con la secuencia que se muestra en la SEC ID NO: 55 se localiza en la CDR1 de la HCVR, el péptido con la secuencia que se muestra en la SEC ID NO: 41 se localiza en la CDR2 de la HCVR, y el péptido con la secuencia que se muestra en la SEC ID NO: 42 se localiza en la CDR3 de la HCVR.

Otra realización proporciona un anticuerpo monoclonal anti-miostatina que comprende los seis péptidos con las secuencias que se muestran en las SECs ID NOs: (i) 18; (ii) 23; (iii) 24; (iv) 29, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53 o 54; (v) 32; y (vi) 36. Preferentemente, en dicho anticuerpo, el péptido con la secuencia que se muestra en la SEC ID NO: 18 se localiza en la CDR1 de la LCVR, el péptido con la secuencia que se muestra en la SEC ID NO: 23 se localiza en la CDR2 de la LCVR, el péptido con la secuencia que se muestra en la SEC ID NO: 24 se localiza en la CDR3 de la LCVR, el péptido con la secuencia que se muestra en las SECs ID NOs: 29, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53 o 54 se localiza en la CDR1 de la HCVR, el péptido con la secuencia que se muestra en la SEC ID NO: 32 se localiza en la CDR2 de la HCVR, y el péptido con la secuencia que se muestra en la SEC ID NO: 36 se localiza en la CDR3 de la HCVR.

Otra realización proporciona un anticuerpo monoclonal anti-miostatina que comprende los seis péptidos con las secuencias que se muestran en las SECs ID NOs: 19, 23, 25, o 30, 33 y 37. Preferentemente, en dicho anticuerpo, el péptido con la secuencia que se muestra en la SEC ID NO: 19 se localiza en la CDR1 de la LCVR, el péptido con la secuencia que se muestra en la SEC ID NO: 23 se localiza en la CDR2 de la LCVR, el péptido con la secuencia que se muestra en la SEC ID NO: 25 se localiza en la CDR3 de la LCVR, el péptido con la secuencia que se muestra en la SEC ID NO: 30 se localiza en la CDR1 de la HCVR, el péptido con la secuencia que se muestra en la SEC ID NO: 33 se localiza en la CDR2 de la HCVR, y el péptido con la secuencia que se muestra en la SEC ID NO: 37 se localiza en la CDR3 de la HCVR.

Otra realización proporciona un anticuerpo monoclonal anti-miostatina que comprende los seis péptidos con las secuencias que se muestran en las SECs ID NOs: 18, 23, 24, 31, 32 y 36. Preferentemente, en dicho anticuerpo, el péptido con la secuencia que se muestra en la SEC ID NO: 18 se localiza en la CDR1 de la LCVR, el péptido con la secuencia que se muestra en la SEC ID NO: 23 se localiza en la CDR2 de la LCVR, el péptido con la secuencia que se muestra en la SEC ID NO: 24 se localiza en la CDR3 de la LCVR, el péptido con la secuencia que se muestra en la SEC ID NO: 31 se localiza en la CDR1 de la HCVR, el péptido con la secuencia que se muestra en la SEC ID NO: 32 se localiza en la CDR2 de la HCVR, y el péptido con la secuencia que se muestra en la SEC ID NO: 36 se localiza en la CDR3 de la HCVR.

Otra realización proporciona un anticuerpo monoclonal anti-miostatina que comprende los seis péptidos con las secuencias que se muestran en las SECs ID NOs: 20, 23, 25, 29, 32 y 36. Preferentemente, en dicho anticuerpo, el péptido con la secuencia que se muestra en la SEC ID NO: 20 se localiza en la CDR1 de la LCVR, el péptido con la secuencia que se muestra en la SEC ID NO: 23 se localiza en la CDR2 de la LCVR, el péptido con la secuencia que se muestra en la SEC ID NO: 25 se localiza en la CDR3 de la LCVR, el péptido con la secuencia que se muestra en las SECs ID NOs: 29 se localiza en la CDR1 de la HCVR, el péptido con la secuencia que se muestra en la SEC ID NO: 32 se localiza en la CDR2 de la HCVR, y el péptido con la secuencia que se muestra en la SEC ID NO: 36 se localiza en la CDR3 de la HCVR.

Otra realización proporciona un anticuerpo monoclonal anti-miostatina que comprende los seis péptidos con las secuencias que se muestran en las SECs ID NOs: 20, 23, 26, 30, 34 y 36. Preferentemente, en dicho anticuerpo, el péptido con la secuencia que se muestra en la SEC ID NO: 20 se localiza en la CDR1 de la LCVR, el péptido con la secuencia que se muestra en la SEC ID NO: 23 se localiza en la CDR2 de la LCVR, el péptido con la secuencia que se muestra en la SEC ID NO: 26 se localiza en la CDR3 de la LCVR, el péptido con la secuencia que se muestra en las SECs ID NOs: 30 se localiza en la CDR1 de la HCVR, el péptido con la secuencia que se muestra en la SEC ID NO: 34 se localiza en la CDR2 de la HCVR, y el péptido con la secuencia que se muestra en la SEC ID NO: 36 se localiza en la CDR3 de la HCVR.

Otra realización proporciona un anticuerpo monoclonal anti-miostatina que comprende los seis péptidos con las secuencias que se muestran en las SECs ID NOs: 18, 23, 24, 29, 35 y 36. Preferentemente, en dicho anticuerpo, el péptido con la secuencia que se muestra en la SEC ID NO: 18 se localiza en la CDR1 de la LCVR, el péptido con la secuencia que se muestra en la SEC ID NO: 23 se localiza en la CDR2 de la LCVR, el péptido con la secuencia que se muestra en la SEC ID NO: 24 se localiza en la CDR3 de la LCVR, el péptido con la secuencia que se muestra en las SECs ID NOs: 29 se localiza en la CDR1 de la HCVR, el péptido con la secuencia que se muestra en la SEC

ID NO: 35 se localiza en la CDR2 de la HCVR, y el péptido con la secuencia que se muestra en la SEC ID NO: 36 se localiza en la CDR3 de la HCVR.

Otra realización proporciona un anticuerpo monoclonal anti-miostatina que comprende los seis péptidos con las secuencias que se muestran en las SECs ID NOs: 18, 23, 27, 29, 32 y 36. Preferentemente, en dicho anticuerpo, el péptido con la secuencia que se muestra en la SEC ID NO: 18 se localiza en la CDR1 de la LCVR, el péptido con la secuencia que se muestra en la SEC ID NO: 23 se localiza en la CDR2 de la LCVR, el péptido con la secuencia que se muestra en la SEC ID NO: 27 se localiza en la CDR3 de la LCVR, el péptido con la secuencia que se muestra en la SECs ID NOs: 29 se localiza en la CDR1 de la HCVR, el péptido con la secuencia que se muestra en la SEC ID NO: 32 se localiza en la CDR2 de la HCVR, y el péptido con la secuencia que se muestra en la SEC ID NO: 36 se localiza en la CDR3 de la HCVR.

Otra realización proporciona un anticuerpo monoclonal anti-miostatina que comprende los seis péptidos con las secuencias que se muestran en las SECs ID NOs: 21, 23, 28, 29, 32, 36. Preferentemente, en dicho anticuerpo, el péptido con la secuencia que se muestra en la SEC ID NO: 21 se localiza en la CDR1 de la LCVR, el péptido con la secuencia que se muestra en la SEC ID NO: 23 se localiza en la CDR2 de la LCVR, el péptido con la secuencia que se muestra en la SEC ID NO: 28 se localiza en la CDR3 de la LCVR, el péptido con la secuencia que se muestra en la SECs ID NOs: 29 se localiza en la CDR1 de la HCVR, el péptido con la SEC ID NO: 32 se localiza en la CDR2 de la HCVR, y el péptido con la secuencia que se muestra en la SEC ID NO: 36 se localiza en la CDR3 de la HCVR.

Otra realización proporciona un anticuerpo monoclonal anti-miostatina que comprende los seis péptidos con las secuencias que se muestran en las SECs ID NOs: 20, 23, 24, 29, 32 y 36. Preferentemente, en dicho anticuerpo, el péptido con la secuencia que se muestra en la SEC ID NO: 20 se localiza en la CDR1 de la LCVR, el péptido con la secuencia que se muestra en la SEC ID NO: 23 se localiza en la CDR2 de la LCVR, el péptido con la secuencia que se muestra en la SEC ID NO: 24 se localiza en la CDR3 de la LCVR, el péptido con la secuencia que se muestra en la SECs ID NOs: 29 se localiza en la CDR1 de la HCVR, el péptido con la secuencia que se muestra en la SEC ID NO: 32 se localiza en la CDR2 de la HCVR, y el péptido con la secuencia que se muestra en la SEC ID NO: 36 se localiza en la CDR3 de la HCVR.

Otra realización proporciona un anticuerpo monoclonal anti-miostatina que comprende los seis péptidos con las secuencias que se muestran en las SECs ID NOs: 22, 23, 27, 29, 32 y 36. Preferentemente, en dicho anticuerpo, el péptido con la secuencia que se muestra en la SEC ID NO: 22 se localiza en la CDR1 de la LCVR, el péptido con la secuencia que se muestra en la SEC ID NO: 23 se localiza en la CDR2 de la LCVR, el péptido con la secuencia que se muestra en la SEC ID NO: 27 se localiza en la CDR3 de la LCVR, el péptido con la secuencia que se muestra en la SECs ID NOs: 29 se localiza en la CDR1 de la HCVR, el péptido con la secuencia que se muestra en la SEC ID NO: 32 se localiza en la CDR2 de la HCVR, y el péptido con la secuencia que se muestra en la SEC ID NO: 36 se localiza en la CDR3 de la HCVR.

Un anticuerpo monoclonal anti-miostatina de la invención además puede comprender una región constante de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste de IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA, IgE, IgM e IgD. Un anticuerpo monoclonal anti-miostatina de la invención además puede comprender una región constante de cadena liviana lambda o kappa. Cuando el anticuerpo debe usarse como un terapéutico humano, la región constante preferentemente es sustancialmente de origen humano. Cuando el anticuerpo debe usarse como un terapéutico en un animal no humano, la región constante preferentemente se origina sustancialmente del animal en el cual el anticuerpo debe usarse como terapéutico.

Un anticuerpo monoclonal anti-miostatina de la invención puede comprender o consistir de un anticuerpo intacto (es decir, de longitud completa), un anticuerpo sustancialmente intacto, un fragmento Fab, un fragmento F(ab')<sub>2</sub> o un fragmento Fv de cadena simple.

En una realización preferida, un anticuerpo monoclonal anti-miostatina de la invención es un anticuerpo quimérico. En una realización más preferida, un anticuerpo monoclonal anti-miostatina de la invención es un anticuerpo humanizado en el cual la secuencia del marco y la secuencia de la región constante presente en el anticuerpo es sustancialmente de origen humano. El anticuerpo humanizado es preferentemente un anticuerpo de longitud completa. En forma alternativa, la región del marco, o una porción de la misma, y cualquier región constante presente en el anticuerpo puede originarse sustancialmente del genoma del animal en el cual el anticuerpo debe usarse como un terapéutico, por ej., animales domésticos (por ej., caninos, felinos), animales para el deporte (por ej., equinos) y animales para la alimentación (por ej., bovinos, porcinos, aves y ovinos).

En otra realización, la invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislado que comprende un ácido nucleico que codifica una LCVR de un anticuerpo de la invención, una HCVR de un anticuerpo de la invención o un anticuerpo monoclonal anti-miostatina de la invención. Un polinucleótido de ejemplo que codifica una LCVR de la invención tiene la secuencia que se muestra en la SEC ID NO: 44. Un polinucleótido de ejemplo que codifica una HCVR de la invención tiene la secuencia que se muestra en la SEC ID NO: 45.

En otra realización, la invención proporciona un vector, preferentemente (pero sin limitación) un plásmido, un vector de expresión recombinante, un vector de expresión de levadura, o un vector de expresión retroviral que comprende

un polinucleótido que codifica un anticuerpo monoclonal anti-miostatina de la invención. En forma alternativa, un vector de la invención comprende un polinucleótido que codifica una LCVR y/o un polinucleótido que codifica una HCVR de la invención. Cuando ambas, una LCVR y una HCVR que codifican una secuencia, están presentes en el mismo vector, éstas se pueden transcribir desde un promotor al cual ambas están operativamente enlazadas o pueden ser transcritas independientemente, cada una de un promotor separado al cual está operativamente enlazado. Si las secuencias que codifican una LCVR y una HCVR están presentes en el mismo vector y se transcriben desde un promotor al cual están ambas operativamente enlazadas, la LCVR puede ser de 5' a la HCVR o la LCVR puede ser de 3' a la HCVR, más aún la región que codifica la LCVR y la HCVR en el vector puede ser separada por una secuencia conectora de cualquier tamaño o contenido, preferentemente este conector, cuando está presente, es un polinucleótido que codifica un sitio de entrada del ribosoma interno.

En otra realización, la invención proporciona una célula hospedadora que comprende una molécula de ácido nucleico de la presente invención. Preferentemente una célula hospedadora de la invención comprende uno o más vectores o construcciones que comprenden una molécula de ácido nucleico de la presente invención. La célula hospedadora de la invención es una célula dentro de la cual se ha introducido un vector de la invención (por ej., mediante transformación, transducción, infección), dicho vector que comprende un polinucleótido que codifica una LCVR de un anticuerpo de la invención y/o un polinucleótido que codifica una HCVR de la invención. La invención además proporciona una célula hospedadora dentro de la cual se han introducido dos vectores de la invención; uno que comprende un polinucleótido que codifica una LCVR de un anticuerpo de la invención y uno que comprende un polinucleótido que codifica una HCVR presente en un anticuerpo de la invención y cada uno operativamente enlazado a una secuencia promotora. Los tipos de célula hospedadora incluyen células mamíferas, bacterianas, vegetales y de levadura. Preferentemente la célula hospedadora es una célula CHO, una célula COS, una célula SP2/0, una célula NSO, una célula de levadura o un derivado o progenie de cualquier tipo de célula preferida.

En otra realización, la invención proporciona un procedimiento para preparar un anticuerpo monoclonal anti-miostatina de la invención que comprende mantener una célula hospedadora de la invención (es decir, célula hospedadora que ha sido transformada, transducida o infectada con un vector (o vectores) de la invención) en condiciones apropiadas para la expresión de un anticuerpo monoclonal de la invención, por la cual se expresa dicho anticuerpo. El procedimiento además puede comprender el paso de aislar el anticuerpo monoclonal de la invención de la célula o preferentemente del medio de cultivo en el cual dicha célula se desarrolla.

La invención abarca el procedimiento de producir un anticuerpo de la invención inyectando a un animal no humano, preferentemente un roedor, más preferentemente un ratón con (i) un péptido inmunogénico que consiste de un péptido con una secuencia como se muestra en la SEC ID NO: 46 o 43, o (ii) un péptido inmunogénico que consiste de 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6 o 5 aminoácidos contiguos de un péptido con una secuencia como se muestra en las SEC ID NO: 46 o 43, preferentemente dicho péptido inmunogénico abarca residuos de aminoácidos en los cuales 1, 2, 3, 4 o 5 de dichos aminoácidos contiguos se seleccionan del grupo que consiste de aminoácidos en los números de residuo 46, 49, 50, 52 y 62 de miostatina madura donde el aminoácido en dicho número de residuo difiere del aminoácido presente en la posición equivalente del GDF-11 (véase figura 3), o (iii) un péptido inmunogénico que consiste de aminoácidos en las posiciones 40-64 de la forma madura de miostatina de cualquier mamífero, o (iv) un péptido inmunogénico que consiste de 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6 o 5 aminoácidos contiguos de un péptido que consiste de los aminoácidos en las posiciones 40-64 de la forma madura de miostatina de cualquier mamífero, preferentemente dicho péptido inmunogénico abarca residuos de aminoácidos en los cuales 1, 2, 3, 4 o 5 de dichos aminoácidos contiguos son aminoácidos que difieren del aminoácido presente en la posición equivalente del GDF-11 en el mismo mamífero. Los anticuerpos monoclonales anti-miostatina se generan a partir de animales inmunizados que usan cualquier procedimiento conocido en la técnica, preferentemente por síntesis de hibridoma. Los anticuerpos monoclonales anti-miostatina se muestrean mediante cualquier procedimiento disponible en la técnica (por ej., visualización de fago, visualización de ribosoma, visualización de levadura, visualización bacteriana, ensayo ELISA) para unirse a la miostatina madura, o una porción de la misma que comprende el péptido inmunogénico, o al péptido inmunogénico. Opcionalmente, los anticuerpos monoclonales anti-miostatina se muestrean mediante cualquier procedimiento disponible en la técnica para la unión al GDF-11 maduro o una porción del mismo. Los anticuerpos monoclonales anti-miostatina se seleccionan de aquéllos que específica o preferentemente se unen a la miostatina con respecto al GDF-11. La invención además abarca un anticuerpo monoclonal producido mediante este procedimiento. Preferentemente dicho anticuerpo monoclonal se une a la miostatina al menos, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, o 100 veces más que con el que se une al GDF-11; más preferentemente al menos 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550 o 600 veces más que con el que se une al GDF-11, como se determina mediante un procedimiento conocido por un experto en la técnica, por ej., mediante ELISA, ELISA Competitivo o los valores  $K_D$  en un ensayo BIAcore®. Con máxima preferencia los anticuerpos monoclonales no se unen al GDF-11 por encima de los niveles de fondo en cualquier ensayo de unión en la técnica.

La invención además abarca el procedimiento de producir un anticuerpo de la invención inyectando a un animal no humano, preferentemente un roedor, más preferentemente un ratón con (i) un péptido inmunogénico que comprende una secuencia como se muestra en la SEC ID NO: 46 o 43, o (ii) un péptido inmunogénico que comprende 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6 o 5 aminoácidos contiguos de un péptido que consiste de una secuencia como se muestra en la SEC ID NO: 46 o 43, preferentemente dicho péptido inmunogénico abarca residuos de aminoácidos en los cuales 1, 2, 3, 4 o 5 de dichos aminoácidos contiguos se seleccionan del grupo que

- comprende aminoácidos en los números de residuo 46, 49, 50, 52 y 62 de miostatina madura donde el aminoácido en dicho número de residuo difiere del aminoácido presente en la posición equivalente del GDF-11 (véase figura 3), o (iii) un péptido inmunogénico que comprende aminoácidos en las posiciones 40-64 de la forma madura de miostatina de cualquier mamífero, o (iv) un péptido inmunogénico que comprende 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6 o 5 aminoácidos contiguos de un péptido que consiste de los aminoácidos en las posiciones 40-64 de la forma madura de miostatina de cualquier mamífero, preferentemente dicho péptido inmunogénico abarca residuos de aminoácidos en los cuales 1, 2, 3, 4 o 5 de dichos aminoácidos contiguos son aminoácidos que difieren del aminoácido presente en la posición equivalente del GDF-11 en el mismo mamífero. Los anticuerpos monoclonales anti-miostatina se generan a partir de animales inmunizados que usan cualquier procedimiento conocido en la técnica, preferentemente por síntesis de hibridoma. Los anticuerpos monoclonales anti-miostatina se muestrean mediante cualquier procedimiento disponible en la técnica (por ej., visualización de fago, visualización de ribosoma, visualización de levadura, visualización bacteriana, ensayo ELISA) para unirse a (i) un péptido antigénico que consiste de una secuencia como se muestra en la SEC ID NO: 46 o 43, o (ii) un péptido antigénico que consiste de 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6 o 5 aminoácidos contiguos de un péptido que consiste de una secuencia como se muestra en la SEC ID NO: 46 o 43, preferentemente dicho péptido antigénico abarca residuos de aminoácidos en los cuales 1, 2, 3, 4 o 5 de dichos aminoácidos contiguos se seleccionan del grupo que consiste de aminoácidos en los números de residuo 46, 49, 50, 52 y 62 de miostatina madura donde el aminoácido en dicho número de residuo difiere del aminoácido presente en la posición equivalente del GDF-11 (véase figura 3), o (iii) un péptido antigénico que consiste de los aminoácidos en las posiciones 40-64 de la forma madura de miostatina de cualquier mamífero, o (iv) un péptido antigénico que consiste de 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6 o 5 aminoácidos contiguos de un péptido que consiste de los aminoácidos en las posiciones 40-64 de la forma madura de miostatina de cualquier mamífero, preferentemente dicho péptido inmunogénico abarca residuos de aminoácidos en los cuales 1, 2, 3, 4 o 5 de dichos aminoácidos contiguos son aminoácidos que difieren del aminoácido presente en la posición equivalente del GDF-11 en el mismo mamífero. Opcionalmente, los anticuerpos monoclonales anti-miostatina se muestrean mediante cualquier procedimiento disponible en la técnica para la unión al GDF-11 maduro o una porción del mismo. Se seleccionan los anticuerpos monoclonales anti-miostatina que específica o preferentemente se unen a la miostatina con respecto al GDF-11. La invención además abarca un anticuerpo monoclonal producido mediante este procedimiento. Preferentemente dicho anticuerpo monoclonal se une a la miostatina al menos, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, o 100 veces más que con el que se une al GDF-11; más preferentemente al menos 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550 o 600 veces más que con el que se une al GDF-11, como se determina mediante un procedimiento conocido por un experto en la técnica, por ej., mediante ELISA, ELISA Competitivo o los valores  $K_D$  en un ensayo BIAcore<sup>®</sup>. Con máxima preferencia los anticuerpos monoclonales no se unen al GDF-11 por encima de los niveles de fondo en cualquier ensayo de unión en la técnica.
- Se contempla que dicho anticuerpo producido mediante cualquier procedimiento de la invención puede ser alterado posteriormente en un anticuerpo quimérico en el cual al menos una porción de la región del marco y/o constante se origina a partir de un mamífero diferente del que se inmunizó para generar el anticuerpo monoclonal e incluso están dentro del alcance de la invención. Los anticuerpos de la invención pueden ser humanizados en los cuales las regiones de CDR murinas existen dentro de una región del marco sustancialmente humana, y la región constante, en la medida que esté presente en el anticuerpo, también es sustancialmente de origen humano. Los anticuerpos de la invención pueden ser tales que las regiones de CDR murina existen dentro de una región del marco y la región constante (en la medida que esté presente el anticuerpo) se origina a partir de la secuencia de línea germinal del animal en el cual el anticuerpo debe ser usado terapéuticamente.
- En la presente se contemplan varias formas de los anticuerpos de la invención. Por ejemplo, un anticuerpo monoclonal anti-miostatina de la invención puede ser un anticuerpo de longitud completa (por ej., que tiene una región constante de inmunoglobulina) o un fragmento de anticuerpo (por ej., un  $F(ab')_2$ ). Se entiende que todas estas formas de los anticuerpos se engloban en la presente dentro del término "anticuerpo". Más aún, el anticuerpo puede ser etiquetado con una etiqueta detectable, inmovilizado sobre una fase sólida y/o conjugado con un compuesto heterólogo (por ej., una enzima o toxina) de acuerdo con los procedimientos conocidos en la técnica.
- Se contemplan los usos diagnósticos para los anticuerpos monoclonales de la invención. En una aplicación de diagnóstico, la invención proporciona un procedimiento para determinar la presencia de la proteína miostatina que comprende exponer una muestra de prueba que está sospechada de contener la proteína miostatina a un anticuerpo anti-miostatina de la invención y determinar la unión específica del anticuerpo a la muestra. Un anticuerpo anti-miostatina de la invención se puede usar para determinar los niveles de miostatina en las muestras de prueba comparando los valores de la muestra de prueba con una curva estándar generada por la unión de dicho anticuerpo a las muestras con las cantidades conocidas de miostatina. La invención además proporciona un kit que comprende un anticuerpo de la invención y, preferentemente, instrucciones para usar el anticuerpo para detectar la proteína miostatina, por ej., en una muestra de prueba.
- En otra realización, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo monoclonal anti-miostatina de la invención. La composición farmacéutica de la invención además puede comprender un vehículo aceptable para uso farmacéutico. En dicha composición farmacéutica, el anticuerpo monoclonal anti-miostatina de la invención es el ingrediente activo. Preferentemente la composición farmacéutica comprende una población homogénea o sustancialmente homogénea de un anticuerpo monoclonal anti-miostatina de la invención.



La composición para uso terapéutico es estéril y puede ser liofilizada.

La invención proporciona un procedimiento para inhibir la actividad de la miostatina en un mamífero, preferentemente un humano, que lo necesita que comprende administrar a dicho mamífero, una cantidad eficaz desde el punto de vista terapéutico, o una cantidad eficaz desde el punto de vista profiláctico, de un anticuerpo monoclonal anti-miostatina de la invención. La invención además proporciona un procedimiento para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno aliviado por la inhibición de la transducción de señal que surge de la unión de la miostatina a su receptor que comprende administrar a un paciente (por ej., un humano) que necesita dicho tratamiento o prevención, una cantidad eficaz desde el punto de vista terapéutico o profiláctico de un anticuerpo monoclonal de la invención. Como se usa en la presente memoria, "tratar o prevenir" se refiere a una enfermedad o trastorno asociado con niveles de miostatina anormales o beneficiados por la inhibición de una actividad de la miostatina o beneficiado por un cambio en el nivel existente de miostatina. Las enfermedades o los trastornos que se tratan o se previenen con un anticuerpo de la invención incluyen, pero sin limitación, caquexia, sarcopenia relacionada con la edad, pérdida de masa muscular, miopatía, distrofia muscular, osteoporosis, obesidad, TPOC, insuficiencia o enfermedad renal, insuficiencia o enfermedad hepática, insuficiencia o enfermedad cardíaca, síndrome metabólico y diabetes tipo II. La invención además proporciona un procedimiento para incrementar la masa muscular, aumentar la fuerza muscular, e incrementar la densidad ósea en un mamífero, preferentemente un humano, que lo necesita mediante la administración de una cantidad eficaz desde el punto de vista terapéutico de un anticuerpo monoclonal anti-miostatina de la invención.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención se proporciona un anticuerpo monoclonal o un fragmento funcional del mismo para uso como medicamento.

Preferentemente, el anticuerpo monoclonal o un fragmento funcional del mismo de la presente invención es para uso en la prevención o el tratamiento de pérdida de masa muscular, miopatía, distrofia muscular, debilidad muscular, fragilidad, caquexia, insuficiencia o enfermedad renal, insuficiencia o enfermedad hepática, insuficiencia o enfermedad cardíaca, diabetes tipo II, síndrome metabólico osteoporosis, obesidad, o TPOC en un humano. Más preferentemente, el anticuerpo monoclonal o un fragmento funcional del mismo de la presente invención se usa para incrementar la masa muscular en un mamífero.

La invención abarca un anticuerpo monoclonal anti-miostatina de la invención para usar en la producción de un medicamento para la administración a un mamífero, preferentemente un humano, para el tratamiento, por ej., de pérdida de masa muscular, miopatía, distrofia muscular, osteoporosis, obesidad, TPOC, insuficiencia o enfermedad renal, insuficiencia o enfermedad hepática, insuficiencia o enfermedad cardíaca, síndrome metabólico y diabetes tipo II en un mamífero, preferentemente un humano, que lo necesita mediante la administración a dicho mamífero de una cantidad eficaz desde el punto de vista terapéutico, o una cantidad eficaz desde el punto de vista profiláctico, de un anticuerpo monoclonal anti-miostatina de la invención.

La invención abarca un artículo de producción que comprende un material de envasado y un anticuerpo de la invención contenido dentro de dicho material de envasado y en el que el material de envasado comprende un inserto en el envase que indica que el anticuerpo neutraliza específicamente una actividad de la miostatina o disminuye el nivel de miostatina. Opcionalmente, el inserto del paquete además indica que el anticuerpo neutraliza preferentemente una actividad de la miostatina con respecto a la actividad del GDF-11 o preferentemente disminuye el nivel de miostatina con respecto a la disminución del nivel de GDF-11 uniendo la miostatina con respecto a la unión del GDF-11.

**Tabla 1** Secuencias de la CDR – Región variable de cadena liviana (LCVR).

FAb	CDR1	CDR2	CDR3
3	SASSSISYMH (SEC ID NO: 18)	DTSKLAS (SEC ID NO: 23)	QQWYSNPLT (SEC ID NO: 24)
5	SASSSVHYMH (SEC ID NO: 19)	DTSKLAS (SEC ID NO: 23)	QQWSSNPLT (SEC ID NO: 25)
7	SASSSISYMH (SEC ID NO: 18)	DTSKLAS (SEC ID NO: 23)	QQWYSNPLT (SEC ID NO: 24)
8	SASSSVSYMH (SEC ID NO: 20)	DTSKLAS (SEC ID NO: 23)	QQWSSNPLT (SEC ID NO: 25)
9	SASSSVSYMH (SEC ID NO: 20)	DTSKLAS (SEC ID NO: 23)	QQWSRNPLT (SEC ID NO: 26)

ES 2 384 176 T3

10	SASSSISYMH (SEC ID NO: 18)	DTSKLAS (SEC ID NO: 23)	QQWYSNPLT (SEC ID NO: 24)
11	SASSSISYMH (SEC ID NO: 18)	DTSKLAS (SEC ID NO: 23)	QQWNSNPLT (SEC ID NO: 27)
12	SASSSVYYMH (SEC ID NO: 21)	DTSKLAS (SEC ID NO: 23)	QQWTYNPLT (SEC ID NO: 28)
14	SASSSVSYMH (SEC ID NO: 20)	DTSKLAS (SEC ID NO: 23)	QQWYSNPLT (SEC ID NO: 24)
15	SASSSINYMH (SEC ID NO: 22)	DTSKLAS (SEC ID NO: 23)	QQWNSNPLT (SEC ID NO: 27)
Consenso	SASSSX <sub>29</sub> X <sub>30</sub> *YMH (SEC ID NO: 38)	DTSKLAS (SEC ID NO: 23)	QQWX <sub>91</sub> X <sub>92</sub> NPLT** (SEC ID NO: 56)
* X <sub>29</sub> es un aminoácido hidrófobo, X <sub>30</sub> es S, T, H, Y o N			
**X <sub>91</sub> es Y, S, N o T, X <sub>92</sub> es R, K, Y, S o T			

**Tabla 2** Secuencia de la CDR – Región variable de cadena pesada (HCVR).

FAb	CDR1	CDR2	CDR3
3	GFSLRTSGMSVS (SEC ID NO: 29)	HIYWDDDKRYNPSLRN (SEC ID NO: 32)	RAITTVIGGGTMDY (SEC ID NO: 36)
5	GFSLSTSGMSVS (SEC ID NO: 30)	HIYWDDDKRYNPSLRS (SEC ID NO: 33)	RGITTVLGGGTMDY (SEC ID NO: 37)
7	GFSLTTSGMIVS (SEC ID NO: 31)	HIYWDDDKRYNPSLRN (SEC ID NO: 32)	RAITTVIGGGTMDY (SEC ID NO: 36)
8	GFSLRTSGMSVS (SEC ID NO: 29)	HIYWDDDKRYNPSLRN (SEC ID NO: 32)	RAITTVIGGGTMDY (SEC ID NO: 36)
9	GFSLSTSGMSVS (SEC ID NO: 30)	HIYWDDDKRYNPSLKS (SEC ID NO: 34)	RAITTVIGGGTMDY (SEC ID NO: 36)
10	GFSLRTSGMSVS (SEC ID NO: 29)	HIYWDDDERYNPSLRN (SEC ID NO: 35)	RAITTVIGGGTMDY (SEC ID NO: 36)
11	GFSLRTSGMSVS (SEC ID NO: 29)	HIYWDDDKRYNPSLRN (SEC ID NO: 32)	RAITTVIGGGTMDY (SEC ID NO: 36)
12	GFSLRTSGMSVS (SEC ID NO: 29)	HIYWDDDKRYNPSLRN (SEC ID NO: 32)	RAITTVIGGGTMDY (SEC ID NO: 36)
14	GFSLRTSGMSVS (SEC ID NO: 29)	HIYWDDDKRYNPSLRN (SEC ID NO: 32)	RAITTVIGGGTMDY (SEC ID NO: 36)
15	GFSLRTSGMSVS (SEC ID NO: 29)	HIYWDDDKRYNPSLRN (SEC ID NO: 32)	RAITTVIGGGTMDY (SEC ID NO: 36)
16	GFSLRTSGSSVS (SEC ID NO: 47)	HIYWDDDKRYNPSLRN (SEC ID NO: 32)	RATTTVIGGGTMDY (SEC ID NO: 36)

17	GFSLRKS <sub>5</sub> GMSVS (SEC ID NO: 48)	HIYWDDDKRYNPSLRN (SEC ID NO: 32)	RAITTVIGGGTMDY (SEC ID NO: 36)
18	GFSLR <sub>1</sub> TVGMSVS (SEC ID NO: 49)	HIYWDDDKRYNPSLRN (SEC ID NO: 32)	RAITTVIGGGTMDY (SEC ID NO: 36)
19	GFSLR <sub>1</sub> TLGMSVS (SEC ID NO: 50)	HIYWDDDKRYNPSLRN (SEC ID NO: 32)	RAITTVIGGGTMDY (SEC ID NO: 36)
20	GFSLR <sub>1</sub> TLGSSVS (SEC ID NO: 51)	HIYWDDDKRYNPSLRN (SEC ID NO: 32)	RAITTVIGGGTMDY (SEC ID NO: 36)
21	GFSLR <sub>1</sub> KVGSSVS (SEC ID NO: 52)	HIYWDDDKRYNPSLRN (SEC ID NO: 32)	RAITTVIGGGTMDY (SEC ID NO: 36)
22	GFSLR <sub>1</sub> KLGSSVS (SEC ID NO: 53)	HIYWDDDKRYNPSLRN (SEC ID NO: 32)	RAITTVIGGGTMDY (SEC ID NO: 36)
23	GFSLR <sub>1</sub> KSGSSVS (SEC ID NO: 54)	HIYWDDDKRYNPSLRN (SEC ID NO: 32)	RAITTVIGGGTMDY (SEC ID NO: 36)
Consenso	GFSLX <sub>5</sub> X <sub>6</sub> X <sub>7</sub> GX <sub>9</sub> X <sub>10</sub> VS * (SEC ID NO: 55)	HIYWDDDX <sub>8</sub> RYNPSLX <sub>15</sub> X <sub>16</sub> ** (SEC ID NO: 41)	RX <sub>2</sub> ITTVX <sub>7</sub> GGGTMDY*** (SEC ID NO: 42)
<p>*X<sub>5</sub> es R, K, T o S; X<sub>6</sub> es T o K, X<sub>7</sub> es S, V o L, X<sub>9</sub> es M o S, X<sub>10</sub> es S, T, I, L o V</p> <p>**X<sub>8</sub> es K, R, E o D; X<sub>15</sub> es K o R; X<sub>16</sub> es S, T, N o Q</p> <p>***X<sub>2</sub> es A o G; X<sub>7</sub> es I, L o V</p>			

**Breve descripción de los dibujos**

5 La figura 1 muestra la secuencia de aminoácidos de promiostatina humana con la secuencia de señal subrayada y la porción de la proteína en el terminal carboxi que compone un monómero de la forma madura de miostatina en letras en negrita.

La figura 2 muestra la secuencia de aminoácidos de miostatina madura humana. El epitopo antigénico de la presente invención está subrayado.

10 La figura 3 muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la miostatina humana forma madura y el GDF-11 humano con el epitopo antigénico de la presente invención subrayado, los residuos dentro del epitopo antigénico que difieren entre la miostatina y el GDF-11 impresos en negrita. El símbolo (+) indica una diferencia del aminoácido conservador entre la miostatina y el GDF-11 en esa posición mientras el símbolo (-) indica una diferencia del aminoácido no conservador entre la miostatina y el GDF-11 en esa posición.

La figura 4 muestra el alineamiento de la LCVR de los Fabs 3, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14 y 15 con los dominios de la CDR impresos en negrita. El símbolo (\*) indica un residuo de aminoácidos donde hay variante entre los Fabs.

15 La figura 5 muestra el alineamiento de la HCVR de los Fabs 3, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14 y 15 con los dominios de la CDR impresos en negrita. El símbolo (\*) indica un residuo de aminoácidos donde hay variante entre los Fabs.

**Descripción detallada de la invención**

20 La presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales o fragmentos funcionales de los mismos (por ej., un fragmento de unión al antígeno) que se une específicamente a una miostatina mamífera o porción de la misma. El epitopo antigénico al cual se unen los anticuerpos monoclonales de la invención se localiza en los residuos 40-64 de la miostatina madura. En una realización, un anticuerpo monoclonal de la invención bloquea la unión de un ligando (por ej., receptor de miostatina) a la miostatina o inhibe una actividad biológica de la miostatina.

25 Los anticuerpos de la invención se unen específicamente a la miostatina madura o a una porción de la misma con una afinidad de al menos aproximadamente  $1 \times 10^{-7}$  M, preferentemente al menos aproximadamente  $9 \times 10^{-8}$  M o  $7 \times 10^{-8}$  M, y más preferentemente al menos aproximadamente  $5 \times 10^{-8}$  M. Preferentemente los anticuerpos de la invención no se unen al GDF-11 más que los niveles de fondo de cualquier ensayo de unión estándar conocido en la técnica. En una realización, los anticuerpos de la invención muestran la inhibición de la actividad biológica de la

miostatina *in retro* o *in vivo* a menos de 150 µg/ml, preferentemente menos de 100 µg/ml, más preferentemente menos de 90, 80, 70, 60 o 50 µg/ml, e incluso más preferentemente menos de aproximadamente 20 µg/ml, e incluso más preferentemente menos de aproximadamente 2 o 0,2 o 0,02 µg/ml. Cuando se usa en la presente, el término “miostatina madura” puede referirse a la forma monomérica o dimérica, preferentemente homodimérica, de la proteína que surge después de la escisión proteolítica de la forma proproteína de la miostatina.

Un anticuerpo de longitud completa como existe en forma natural es una molécula de inmunoglobulina compuesta de cuatro cadenas peptídicas, dos cadenas pesadas (H) (aproximadamente 50-70 kDa cuando son de longitud completa) y dos cadenas livianas (L) (aproximadamente 25 kDa cuando son de longitud completa) interconectadas por enlaces disulfuros. La porción amino terminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 – 110 o más aminoácidos esencialmente responsables del reconocimiento del antígeno. La porción carboxi terminal de cada cadena define una región constante esencialmente responsable por la función efectora.

Las cadenas livianas se clasifican como kappa o lambda y se caracterizan por una región constante particular. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta, o epsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgD, e IgE, respectivamente. Cada tipo de cadena pesada se caracteriza por una región constante particular.

Cada cadena pesada está compuesta de una región variable de cadena pesada (en adelante “HCVR”) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada está compuesta de tres dominios (CH1, CH2, y CH3) para IgG, IgD, e IgA; y 4 dominios (CH1, CH2, CH3, y CH4) para IgM e IgE. Cada cadena liviana está compuesta de una región variable de cadena liviana (en adelante “LCVR”) y una región constante de cadena liviana. La región constante de cadena liviana está compuesta de un dominio, CL. Las regiones de HCVR y LCVR además pueden ser subdivididas en regiones de hipervariabilidad, regiones determinantes de complementariedad calificadas (CDRs), intercaladas con regiones que son más conservadoras, regiones de marco calificadas (FR). Cada HCV y LCVR está compuesta de tres CDRs y cuatro FRs, dispuestas desde el amino terminal hasta el carboxi terminal en el siguiente orden. FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio está de acuerdo con convenciones bien conocidas [por ej., Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991) o el esquema de numeración Chothia como se describe en Al-Lazikani et al., J. Mol. Biol. 273:927-948, 1997, véase además el sitio de Internet <http://www.rubic.rdg.ac.uk/~andrew/bioinf.orglabs>. La capacidad funcional de un anticuerpo a unirse a un antígeno particular se determina colectivamente mediante las seis CDRs. Sin embargo, incluso un único dominio variable que comprende sólo tres CDRs específicas para un antígeno puede tener la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, si bien a una afinidad inferior que un Fab completo.

El término “anticuerpo”, con referencia a un anticuerpo monoclonal anti-miostatina de la invención (o simplemente, “anticuerpo monoclonal de la invención”), como se usa en la presente memoria, se refiere a un anticuerpo monoclonal. Un “anticuerpo monoclonal” como se usa en la presente memoria se refiere a un roedor, preferentemente, anticuerpo murino, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo primatizado o un anticuerpo humanizado. Los anticuerpos monoclonales de la invención se pueden producir usando, por ej., técnicas de hibridoma bien conocidas en la técnica, como también tecnologías recombinantes, tecnologías de visualización de fago, tecnologías de síntesis, o combinaciones de estas tecnologías fácilmente conocidas en la técnica. El término “anticuerpo monoclonal” como se usa en la presente memoria no se limita a los anticuerpos producidos a través de la tecnología del hibridoma. “Anticuerpo monoclonal” se refiere a un anticuerpo que deriva de una única copia o clon, incluyendo por ej., cualquier clon eucariota, procariota o fabo, y no al procedimiento mediante el cual se produce. Un “anticuerpo monoclonal” puede ser un anticuerpo intacto (de longitud completa o total), un anticuerpo sustancialmente intacto, o una porción o fragmento de un anticuerpo que comprende una porción de unión al antígeno, por ej., un fragmento Fab, fragmento Fab' o fragmento F(ab')<sub>2</sub> de un anticuerpo murino o de un anticuerpo quimérico o de un anticuerpo humanizado.

Como se usa en la presente memoria, la “porción de unión al antígeno” o la “región de unión al antígeno” o el “dominio de unión al antígeno” se refiere intercambiabilmente en la presente a esa porción de una molécula del anticuerpo que contiene los residuos de aminoácidos que interactúan con un antígeno y confieren sobre el anticuerpo su especificidad y afinidad para el antígeno. Esta porción del anticuerpo incluye los residuos de aminoácidos del “marco” necesarios para mantener la conformación apropiada de los residuos de unión al antígeno. Preferentemente, las CDRs de la región de unión al antígeno de los anticuerpos de la invención serán de origen murino. En otras realizaciones, la región de unión al antígeno puede derivar de otras especies no humanas incluyendo, pero sin limitación, conejos, ratas o hámsteres.

Además, un “anticuerpo monoclonal” como se usa en la presente memoria puede ser un fragmento Fv de cadena simple que puede producirse uniendo el ADN que codifica al LCVR y la HCVR con una secuencia conectora. (Véase, Pluckthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, págs. 269-315, 1994). Se entiende que a pesar de que se especifiquen los fragmentos, el término “anticuerpo” como se usa en la presente incluye estos fragmentos como también las formas de cadena simple. En la medida que la proteína retenga la capacidad de unir específica o preferentemente su diana prevista (es decir el epitopo o el antígeno), se incluye dentro del término “anticuerpo”. Los anticuerpos pueden o no ser glucosilados e incluso estar dentro de los límites de la invención.

Una población de “anticuerpos monoclonales”, se refiere a una población de anticuerpos homogéneos o sustancialmente homogéneos (o puros) (es decir, al menos aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, más preferentemente al menos aproximadamente 97% o 98% o con máxima preferencia al menos 99% de los anticuerpos en la población son idénticos y competirían en un ensayo ELISA por el mismo antígeno o epitopo.

5 La expresión “se une específicamente” o “se une preferentemente” como se usa en la presente memoria se refiere a la situación en la cual un miembro de un par de unión específica no se une significativamente a las moléculas que no sean sus socias de unión específica. El término además se aplica donde, por ej., un dominio de unión al antígeno de un anticuerpo de la invención es específico para un epitopo particular que es transportado por un número de antígenos, en cuyo caso el anticuerpo específico que transporte el dominio de unión al antígeno podrá unirse a los  
10 diversos antígenos que transportan el epitopo. En consecuencia, un anticuerpo monoclonal de la invención se une específica y/o preferentemente a la miostatina mientras no se une específicamente o preferentemente al GDF-11.

En una realización, un anticuerpo monoclonal de la invención tiene menos de aproximadamente 20% de reactividad cruzada (más preferentemente 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 por ciento de reactividad cruzada) con una proteína o péptido no-miostatina (tal como, por ej., GDF11) o una proteína que no comprende 17,  
15 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6 o 5 aminoácidos contiguos de la secuencia que se muestra en la SEC ID NO: 46 o 43 como se mide mediante una técnica estándar en el arte tal como un ensayo ELISA, un ensayo ELISA competitivo o valores  $K_D$  según se miden en un ensayo a BIAcore®. Preferentemente un anticuerpo de la invención se une a la miostatina al menos, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, o 100 veces más que con el que se une al GDF-11; más preferentemente al menos 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550 o 600 veces más que con el que se une al  
20 GDF-11, como se determina mediante ELISA Competitivo o un ensayo BIAcore®. Más preferentemente, los anticuerpos de la invención no se unen a los niveles del GDF-11 mayores que los niveles de fondo de cualquier ensayo de unión disponible en la técnica. Un anticuerpo monoclonal de la invención puede unirse a una forma monomérica o dimérica de miostatina o una porción de la misma.

Las expresiones “propiedad biológica” o “característica biológica” o los términos “actividad” o “bioactividad”, con  
25 referencia a un anticuerpo de la presente invención, se usan intercambiamente en la presente e incluyen, pero sin limitación, afinidad al epitopo/ antígeno y especificidad (por ej., anticuerpo monoclonal anti-miostatina que se une a la miostatina o un péptido que consiste de la secuencia que se muestra en la SEC ID NO: 46 o 43), capacidad de antagonizar una actividad de miostatina *in vivo*, *in vitro*, o *in situ*, la estabilidad *in vivo* del anticuerpo y las propiedades inmunogénicas del anticuerpo. Otras propiedades biológicas o características identificables de un anticuerpo  
30 reconocidas en la técnica incluyen, por ejemplo, la reactividad cruzada (es decir, con homólogos no humanos del péptido localizado, o con otras proteínas o tejidos, en general), y la capacidad de preservar los niveles altos de expresión de la proteína en células mamíferas. Las propiedades o características antes mencionadas se pueden observar o medir o evaluar usando técnicas reconocidas en el arte incluyendo, pero sin limitación, ELISA, ELISA Competitivo, análisis de resonancia del plasmón superficial BIAcore®, ensayos de neutralización *in vitro* e *in vivo* sin  
35 límite, unión del receptor, producción y/o secreción del factor de crecimiento, desarrollo del capuchón del animal *Xenopus*, transducción de señal e inmunohistoquímica con secciones de tejido de diferentes fuentes incluyendo humanos, primates o cualquier otra fuente que pueda ser necesaria.

El término “inhibir” o “neutralizar” como se usa en la presente memoria con respecto a una actividad de un anticuerpo de la invención significa la capacidad de antagonizar, prohibir, prevenir, restringir, disminuir, interrumpir,  
40 eliminar, detener, o invertir sustancialmente por ej., el avance o severidad de la que se está inhibiendo incluyendo, pero sin limitación, una actividad o propiedad biológica, una enfermedad o afección.

El término “aislado” cuando se usa con relación a un ácido nucleico o proteína (por ej., un anticuerpo) se refiere a una secuencia de ácido nucleico o proteína que se identifica y se separa de al menos un contaminante con el cual se asocia ordinariamente en su fuente natural. Preferentemente, un “anticuerpo aislado” es un anticuerpo que es  
45 sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ej., composiciones farmacéuticas de la invención comprenden un anticuerpo aislado que se une específicamente a la miostatina y es sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a los antígenos diferentes de la miostatina).

Las expresiones “numeración Kabat” y “etiquetado Kabat” se usan intercambiamente en la presente. Estos términos, que se reconocen en el arte, se refieren a un sistema de numeración de residuos de aminoácidos que son más variables (es decir, hipervariable) que otros residuos de aminoácidos en las regiones variables de cadena pesada y liviana de un anticuerpo (Kabat, et al., Ann. NY Acad. Sci. 190:382-93 (1971); Kabat, et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, Publicación NIH No. 91-3242 (1991)).

Un polinucleótido está “operativamente enlazado” cuando se coloca dentro de una relación funcional con otro polinucleótido. Por ejemplo, un promotor o potenciador se enlaza operativamente a una secuencia codificadora si afecta la transcripción de la secuencia.

Los términos “individuo”, “sujeto” y “paciente”, se usan intercambiamente en la presente, se refieren a un mamífero, incluyendo, pero sin limitación, murinos, simios, humanos, animales de granja mamíferos, animales para el deporte mamíferos, y mascotas mamíferas; preferentemente el término se refiere a los humanos.

El término "vector" incluye una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al cual ha sido enlazada incluyendo, pero sin limitación, plásmidos y vectores virales. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula hospedadora dentro de la cual éstos se introducen mientras otros vectores pueden integrarse en el genoma de una célula hospedadora al cabo de la introducción en la célula hospedadora, y de este modo, se replican junto con el genoma hospedadora. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de los genes a los cuales están operativamente enlazados. Estos vectores se denominan, en la presente, "vectores de expresión recombinante" (o simplemente "vectores de expresión") y los ejemplos de vectores son bien conocidos en la técnica.

La expresión "célula hospedadora" incluye una célula individual o cultivo celular que es un receptor de cualquier polinucleótido aislado de la invención o cualquier vector o vectores recombinantes que comprende una HCVR, una LCVR o un anticuerpo monoclonal de la invención. Las células hospedadora incluyen la progenie de una única célula hospedadora, y la progenie no necesariamente puede ser completamente idéntica (en morfología o en el complemento de ADN total) a la célula principal original debido a la mutación y/o al cambio natural, accidental, o deliberado. Una célula hospedadora incluye células transformadas, transducidas o infectadas *in vivo*, *in situ* o *in vitro* con un vector recombinante o un polinucleótido que expresa un anticuerpo monoclonal de la invención o una cadena liviana o una cadena pesada de la misma. Una célula hospedadora que comprende un vector recombinante de la invención (o bien incorporada establemente en el cromosoma hospedadora o no) también puede denominarse "célula hospedadora recombinante". Las células hospedadora preferidas para su uso en la invención son las células CHO (por ej., ATCC CRL-9096), células NS0, células SP2/0 células COS (ATCC, por ej., CRL-1650, CRL-1651), HeLa (ATCC CCL-2). Las células hospedadora adicionales para uso en la invención incluyen células vegetales, células de levadura, otras células mamíferas y células procariotas.

La presente invención se refiere a anticuerpos aislados, monoclonales que se unen a la miostatina. Específicamente, los anticuerpos de la invención se unen a la región de la forma madura de miostatina que abarca los aminoácidos 40-64. Más aún, los anticuerpos de la invención neutralizan una actividad biológica de la miostatina *in vivo*, *in vitro* o *in situ*. La unión específica de los anticuerpos monoclonales anti-miostatina de la invención, (incluyendo porciones de unión al antígeno de los mismos), y anticuerpos monoclonales humanizados con igual especificidad) a la miostatina permite que dichos anticuerpos se usen como productos terapéuticos o profilácticos para las enfermedades o los trastornos asociados con la miostatina, es decir, enfermedades o trastornos que se benefician de la disminución de los niveles de miostatina o la inhibición de una actividad biológica de la miostatina.

El epitopo al cual los anticuerpos de la invención se unen ("epitopo de miostatina de la invención") se localiza dentro del péptido que abarca aminoácidos 40 y 64 de miostatina madura de cualquier especie mamífera, preferentemente humana. Los anticuerpos que unen dicho epitopo, se unen específica o preferentemente a la miostatina cuando se compara con su unión al GDF-11.

El término "epitopo" se refiere a esa porción de una molécula capaz de ser reconocida por y unida por un anticuerpo en una o más de las regiones de unión al antígeno del anticuerpo. Los epitopos a menudo consisten de un agrupamiento químicamente tensioactivo de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y tienen características estructurales tridimensionales específicas como también características de carga específicas. Por "epitopo inhibidor" y/o "epitopo neutralizante" se entiende un epitopo, que cuando en el contexto de la molécula intacta (en este caso, miostatina) y cuando se une mediante un anticuerpo, da por resultado la pérdida o la disminución de una actividad biológica de la molécula o el organismo que contiene la molécula *in vivo*, *in vitro* o *in situ*.

El término "epitopo", como se usa en la presente memoria, se refiere además a una porción de un polipéptido que tiene actividad antigénica y/o inmunogénica en un animal, preferentemente un mamífero, por ej., un ratón o un humano. El término "epitopo antigénico", como se usa en la presente memoria, se define como una porción de un polipéptido al cual un anticuerpo puede unirse específicamente como se determina mediante cualquier procedimiento bien conocido en la técnica, por ejemplo, mediante inmunoensayos convencionales. Los epitopos antigénicos no necesariamente deben ser inmunogénicos, pero pueden ser inmunogénicos. Un "epitopo inmunogénico", como se usa en la presente memoria, se define como una porción de un polipéptido que permite una respuesta del anticuerpo en un animal, como se determina mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica. (véase, por ej., Geysen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3998-4002 (1983)). El epitopo antigénico de miostatina humana de la presente invención tiene la secuencia de aminoácidos como se muestra en las SECs ID NOs: 43 y 46. Un epitopo antigénico de miostatina de la presente invención para cualquier especie mamífera existe dentro de un péptido que consiste de aminoácidos 40-64 de la forma madura de miostatina.

Los anticuerpos monoclonales anti-miostatina de la invención se unen a un epitopo antigénico descubierto para ser localizado a los aminoácidos 40 a 64 de la miostatina madura. Un epitopo inmunogénico y/o antigénico de miostatina de la invención consiste de una secuencia como se muestra en la SEC ID NO: 46 o 43, o consiste de 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6 o 5 aminoácidos contiguos de un péptido que consiste de una secuencia como se muestra en la SEC ID NO: 46 o 43, preferentemente el epitopo inmunogénico abarca residuos de aminoácidos en el cual 1, 2, 3, 4, o 5 de dichos aminoácidos contiguos se seleccionan del grupo que consiste de aminoácidos en los números de residuos 46, 49, 50, 52 y 62 de miostatina madura, es decir, donde el aminoácido en dicho número de residuo difiere del aminoácido presente en la posición equivalente del GDF-11 (véase la figura 3).

Más aún, un epitopo inmunogénico de miostatina de la invención está dentro de las posiciones 40-64 de la forma madura de miostatina de cualquier mamífero o consiste de 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6 o 5 aminoácidos contiguos de un péptido que consiste de los aminoácidos en las posiciones 40-64 de la forma madura de miostatina de cualquier mamífero, preferentemente dicho epitopo inmunogénico abarca residuos de aminoácidos en los cuales 1, 2, 3, 4 o 5 de dichos aminoácidos contiguos son aminoácidos que difieren del aminoácido presente en la posición equivalente del GDF-11 en el mismo mamífero. Además se contempla al epitopo inmunogénico de la invención como un epitopo antigénico. El epitopo antigénico puede poseer residuos de miostatina adicionales fuera de los aminoácidos 40-64 de miostatina madura, pero los anticuerpos monoclonales de la invención no requieren estos residuos adicionales para unirse específicamente a la miostatina. Además, los residuos de miostatina fuera de los aminoácidos 40-64 (es decir, el epitopo antigénico) pueden afectar la estructura conformacional del dominio antigénico y de este modo alterar la unión de un anticuerpo de la invención al epitopo antigénico. Los anticuerpos monoclonales de la invención se unen a la miostatina al menos, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, o 100 veces más que con el que se une al GDF-11 (por ej., mayor afinidad o mayor especificidad); más preferentemente al menos 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550 o 600 veces más que con el que se une al GDF-11, como se determina mediante el ensayo ELISA, ELISA Competitivo o los valores  $K_D$  en un ensayo BIAcore®.

El dominio que abarca los aminoácidos 40-64 (inclusive) de miostatina madura o cualquier péptido que consiste de un epitopo inmunogénico como se describe en la presente se puede usar como un péptido inmunogénico, preferentemente conjugado a una proteína portadora, por ej., KLH, para generar anticuerpos monoclonales de la invención. El péptido inmunogénico puede ser usado para inmunizar un animal no humano, preferentemente un mamífero, más preferentemente un ratón. Los anticuerpos anti-miostatina se aíslan del animal inmunizado y se seleccionan mediante procedimientos bien conocidos en la técnica para aislar esos anticuerpos que se unen específicamente a los aminoácidos 40-64 de miostatina.

En general, un hibridoma se puede producir fusionando una línea celular inmortal adecuada (por ej., una línea celular de mieloma tal como SP2/0) con las células que producen anticuerpos del animal inmunizado. La célula que produce el anticuerpo, preferentemente aquéllos del bazo o los de los ganglios linfáticos, se obtienen de animales inmunizados con el antígeno de interés. Las células fusionadas (hibridomas) se pueden aislar usando condiciones de cultivo selectivas, y se pueden clonar al limitar la dilución. Las células que producen anticuerpos con las propiedades de unión deseadas se pueden seleccionar mediante un ensayo adecuado. Los procedimientos para este aislamiento y selección son bien conocidos en la técnica. La selección de los fragmentos del anticuerpo a partir de las bibliotecas usando tecnologías de enriquecimiento tales como la visualización de fago (Matthews DJ and Wells JA. *Science*. 260:1113-7, 1993), visualización de ribosoma (Hanes, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 95:14130-5, 1998), visualización bacteriana (Samuelson P., et al., *Journal of Biotechnology*, 96:129-54, 2002) o la visualización de levadura (Kieckhefer MC, et al., *Protein Engineering*, 10:1303-10, 1997) han demostrado ser alternativas exitosas a la clásica tecnología del hibridoma (revisiones recientes: Little M. et al., *Immunology Today*, 21:364-70, 2000;). Los anticuerpos de la invención se pueden alterar a una forma quimérica o humanizado usando procedimientos bien conocidos en la técnica.

Se pueden usar otros procedimientos adecuados para producir o aislar anticuerpos que se unen a los aminoácidos 40-64 de miostatina madura, incluyendo anticuerpos humanos o artificiales, incluyendo, por ejemplo, procedimientos que seleccionan un anticuerpo recombinante (por ej., cadena simple Fv o Fab) a partir de una biblioteca, o que confían en la inmunización de animales transgénicos (por ej., ratones) capaces de producir un repertorio de anticuerpos humanos (véase por ej., Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551-2555, 1993; Jakobovits et al., *Nature*, 362:255-258, 1993; Lonberg et al., Patente Estadounidense número 5,545,806; Surani et al., Patente Estadounidense número 5,545,807).

Los anticuerpos de cadena simple, y los anticuerpos quiméricos, humanizados o primatizados (injertos de CDR), como también los anticuerpos quiméricos o de cadena única de injerto de CDR, y similares, que comprenden porciones que derivan de diferentes especies, también se encuentran comprendidos en la presente invención y en el término "anticuerpo". Las diversas porciones de estos anticuerpos se pueden unir químicamente mediante técnicas convencionales, de síntesis, o se pueden separar en forma de una proteína contigua usando técnicas de ingeniería genética. Por ejemplo, los ácidos nucleicos que codifican una cadena quimérica o humanizada se pueden expresar para producir una proteína contigua. Véase por ejemplo la Patente Estadounidense No. 4,816,567; la Patente Europea No. 0,125,023 B1; Patente Estadounidense No. 4,816,397; Patente Europea No. 0,120,694 B1; WO 86/01533; Patente Europea No. 0,194,276 B1; Patente Estadounidense No. 5,225,539; Patente Europea No. 0,239,400 B1 y Patentes Estadounidenses Nos. 5,585,089 y 5,698,762. Véase además, Newman, R. et al. *BioTechnology*, 10:1455-1460, 1993, con respecto a anticuerpos primatizados, y Ladner et al., Patente Estadounidense No. 4,946,778 y Bird, R.E. et al., *Science*, 242:423-426, 1988, con respecto a anticuerpos de cadena simple.

Además, se pueden producir los fragmentos funcionales de los anticuerpos, incluyendo fragmentos de anticuerpos quiméricos, humanizados, primatizados o de cadena simple. Los fragmentos funcionales de los anticuerpos anteriores retienen al menos una función de unión y/o una función biológica del anticuerpo de longitud completa de los cuales derivan. Los fragmentos funcionales preferidos retienen una función de unión al antígeno de un anticuerpo de longitud completa correspondiente (por ej., la capacidad de unirse a una forma madura mamífera de miostatina). Los fragmentos funcionales particularmente preferidos retienen la capacidad de inhibir una o más funciones o

bioactividades características de una miostatina madura mamífera, tal como una actividad de unión, una actividad de señalización, y/o estimulación de una respuesta celular. Por ejemplo, en una realización, un fragmento funcional puede inhibir la interacción de miostatina madura con uno o más de sus ligandos y/o puede inhibir una o más funciones mediadas por el receptor.

- 5 Los fragmentos del anticuerpo capaces de unirse a una miostatina madura mamífera o porción de la misma, incluyen, pero sin limitación, los fragmentos Fv, Fab, Fab' y F(ab')<sub>2</sub> y están comprendidos en la invención. Estos fragmentos se pueden producir por escisión enzimática o por técnicas recombinantes. Por ejemplo, la escisión de papaína o pepsina puede generar fragmentos Fab o F(ab')<sub>2</sub>, respectivamente. Los anticuerpos pueden producirse además en una variedad de formas truncadas usando genes del anticuerpo en los cuales uno o más codones de  
10 parada han sido introducidos corriente arriba del sitio de parada natural. Por ejemplo, un gen quimérico que codifica una porción de la cadena pesada de F(ab')<sub>2</sub> se puede diseñar para incluir secuencias de ADN que codifican el dominio CH<sub>1</sub> y la región de bisagra de la cadena pesada.

- En una realización preferida, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal anti-miostatina que surge del procedimiento que se describe que une preferentemente la miostatina madura o una porción de la misma con una  
15 afinidad de al menos aproximadamente  $1 \times 10^{-7}$  M, preferentemente al menos aproximadamente  $9 \times 10^{-8}$  M o  $7 \times 10^{-8}$  M, y más preferentemente al menos aproximadamente  $5 \times 10^{-8}$  M. (como se determina por ej., mediante el ensayo de resonancia del plasmón superficial BIAcore<sup>®</sup> de fase sólida) y tiene la capacidad de antagonizar una actividad biológica de una miostatina madura.

- Un anticuerpo monoclonal preferido de la invención tiene una LCVR que comprende un péptido con una secuencia  
20 seleccionada del grupo que consiste de las SECs ID NOs: 3, 4, 5, 6, 7,8, 9, 10 y 11 y/o una HCVR que comprende un péptido con una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SECs ID NOs: 12, 13, 14, 15, 16, 17, y la SEC ID NO: 12 con aminoácidos 26-37 reemplazados con los aminoácidos en las SEC ID NOs: 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53 o 54. (véase las tablas 1 y 2; y las figuras 4 y 5 en la presente para las secuencias y sus ubicaciones en los Fabs). Más aún, un anticuerpo monoclonal de la invención es uno que es inhibido competitivamente a partir de la unión de  
25 la miostatina humana madura (o una porción del mismo) mediante un anticuerpo monoclonal que comprende dos polipéptidos con las secuencias que se muestran en el grupo que consiste de (i) SECs ID NOs: 3 y 12, (ii) SEC ID NOs: 4 y 13, (iii) SEC ID NOs: 3 y 14, (iv) SEC ID NOs: 5 y 12, (v) SEC ID NOs: 6 y 15, (vi) SEC ID NOs: 7 y 17, (vii) SEC ID NOs: 8 y 12, (viii) SEC ID NOs: 9 y 16, (ix) SEC ID NOs: 10 y 12, y (x) SEC ID NOs: 11 y 12, y (xi) SEC ID NOs: 3 y la SEC ID NO: 12 con aminoácidos 26-37 reemplazados con los aminoácidos en las SEC ID NOs: 47, 48,  
30 49, 50, 51, 52, 53 o 54.

- En otra realización, una LCVR de n anticuerpo monoclonal anti-miostatina de la invención comprende 1, 2 o 3  
péptidos seleccionados del grupo que consiste de péptidos con una secuencia como se muestra en las SECs ID NOs: 38, 23 y 56 (véase la tabla 1). Una HCVR de un anticuerpo monoclonal anti-miostatina de la invención comprende 1, 2 o 3 péptidos seleccionados del grupo que consiste de péptidos con una secuencia como se muestra  
35 en las SECs ID NOs: 55, 41 y 42 (véase la tabla 2).

En una realización preferida, un anticuerpo monoclonal anti-miostatina de la invención es un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado. En forma alternativa, el marco y cualquier región constante presente en el anticuerpo puede originarse sustancialmente a partir del genoma del animal en el cual el anticuerpo debe usar como terapéutico. Un anticuerpo preferido es un anticuerpo de longitud completa.

- 40 La presente invención además se refiere a las líneas celulares que expresan un anticuerpo monoclonal anti-miostatina de la invención o una porción del mismo. La creación y el aislamiento de las líneas celulares que producen un anticuerpo monoclonal de la invención puede obtenerse usando técnicas estándares conocidas en el arte. Las líneas celulares preferidas incluyen COS, CHO, SP2/0, NS0 y levadura (disponible de depósitos públicos tales como ATCC, American Type Culture Collection, Manassas, VA).

- 45 Una amplia variedad de sistemas de expresión hospedadoras se pueden usar para expresar un anticuerpo de la presente invención incluyendo los sistemas de expresión procariota (bacteriano) y eucariota (tales como células de levadura, baculovirus, vegetales, mamíferas y otros animales, animales transgénicos y células del hibridoma), como también sistemas de expresión de visualización de fago. Un ejemplo de un vector de expresión bacteriano adecuado es pUC 119 y un vector de expresión eucariota adecuado es un vector de pcDNA3.1 modificado con un sistema de  
50 selección DHFR debilitado. Otros sistemas de expresión del anticuerpo también se conocen en la técnica y se contemplan en la presente.

- Un anticuerpo de la invención se puede preparar mediante la expresión recombinante de los genes de cadena liviana y pesada de inmunoglobulina en una célula hospedadora. Para expresar un anticuerpo en forma recombinante, una célula hospedadora se transforma, transluce, infecta o similar con uno o más vectores de  
55 expresión recombinante que portan los fragmentos de ADN que codifican las cadenas livianas y/o pesadas de inmunoglobulina del anticuerpo de modo que las cadenas hilvanadas y/o pesadas se expresan en la célula huésped. La cadena pesada y la cadena liviana pueden expresarse independientemente de diferentes promotores a los cuales están operativamente enlazados en un vector, o en forma alternativa, la cadena pesada y la cadena liviana pueden expresarse independientemente de diferentes promotores a los cuales están operativamente enlazados en dos



vectores - uno que expresa la cadena pesada y uno que expresa la cadena liviana. Opcionalmente la cadena pesada y la cadena liviana pueden expresarse en diferentes células hospedadoras. Preferentemente, los anticuerpos recombinantes se secretan en el medio en el cual las células hospedadoras se cultivan, de los cuales los anticuerpos pueden ser recuperados o purificados. Las metodologías de ADN recombinantes estándares se usan para obtener los genes de la cadena pesada y liviana del anticuerpo, incorporan estos genes en los vectores de expresión recombinante, e introducen los vectores en células hospedadoras. Se describen estas tecnologías de ADN recombinante estándares, por ejemplo, en Sambrook, Fritsch, and Maniatis (Eds.), *Molecular Cloning; A Laboratory Manual*, segunda edición, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; Ausubel, et al (Eds.) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates, 1989.

Un ADN aislado que codifica una región de HCVR puede convertirse a un gen de cadena pesada de longitud completa enlazando operativamente el ADN que codifica la HCVR a otra molécula de ADN que codifica las regiones constantes de cadena pesada (CH1, CH2, y CH3). Las secuencias de los genes de la región constante de cadena pesada humana se conocen en la técnica. Véase, por ej., Kabat, et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, Publicación NIH No. 91-3242 (1991). Los fragmentos de ADN que abarcan estas regiones se pueden obtener por ej., mediante amplificación de PCR estándar. La región constante de cadena pesada puede ser de cualquier tipo, (por ej., IgG, IgA, IgE, IgM o IgD), clase (por ej., IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> e IgG<sub>4</sub>) o región constante de subclase y cualquier variante alotípica de la misma como se describe en Kabat (*supra*). En forma alternativa, la porción de unión al antígeno puede ser un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento F(ab')<sub>2</sub>, Fd, o un fragmento Fv de cadena simple (scFv). Para un gen de cadena pesada del fragmento Fab, el ADN que codifica la HCVR puede estar enlazado operativamente a otra molécula de ADN que codifica sólo una región constante CH1 de cadena pesada.

Un ADN aislado que codifica la región de LCVR puede convertirse a un gen de cadena liviana de longitud completa (como también un gen de cadena liviana Fab) enlazando operativamente el ADN que codifica la LCVR a otra molécula de ADN que codifica una región constante de cadena liviana, CL. Las secuencias de los genes de la región constante de cadena liviana humana son conocidas en la técnica. Véase, por ej., Kabat, *supra*. Los fragmentos de ADN que abarcan estas regiones se pueden obtener mediante amplificación de PCR estándar. La región constante de cadena liviana puede ser una región constante kappa o lambda.

Para crear un gen scFv, los fragmentos de ADN que codifican la HCVR y la LCVR se enlazan operativamente a otro fragmento que codifica un conector flexible, por ej., que codifica la secuencia de aminoácidos (Gly<sub>4</sub>-Ser)<sub>3</sub>, de modo que las secuencias de HCVR y LCVR pueden expresarse como una proteína de cadena simple contigua, con las regiones de LCVR y HCVR unidas por el conector flexible. Véase por ej., Bird, et al., *Science* 242:423-6, 1988; Huston, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-83, 1988; McCafferty, et al., *Nature* 348:552-4, 1990.

Para expresar un anticuerpo de la invención, un ADN que codifica una cadena pesada y/o liviana de longitud parcial o total, obtenida como se describió anteriormente, se inserta dentro de un vector de expresión de modo que el gen se enlaza operativamente a las secuencias de control transcripcionales y traslacionales. El vector de expresión y las secuencias de control de expresión se eligen para que sean compatibles con las células hospedadoras de la expresión usada. El gen de cadena liviana del anticuerpo y el gen de la cadena pesada del anticuerpo pueden estar insertos en vectores separados o, más típicamente, ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión. Los genes del anticuerpo se insertan en el vector de expresión mediante procedimientos estándares. Además, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido de señal que facilita la secreción de la cadena liviana y/o pesada del anticuerpo monoclonal anti-miostatina a partir de una célula hospedadora. El gen de la cadena liviana y/o pesada del anticuerpo monoclonal anti-miostatina puede ser clonado en el vector de modo que el péptido de señal se enlace operativamente en el marco al terminal amino del gen de la cadena del anticuerpo. El péptido de señal puede ser un péptido de señal de inmunoglobulina o un péptido de señal heterólogo.

Además de los genes de la cadena pesada y/o liviana del anticuerpo, un vector de la expresión recombinante transporta secuencias reguladoras que controlan la expresión del gen o los genes de la cadena del anticuerpo en una célula hospedadora. El término "secuencia reguladora" incluye los promotores, potenciadores y otros elementos del control de expresión (por ej., señales de poliadenilación), según sea necesario, que controlan la transcripción o traducción del gen o los genes de la cadena del anticuerpo. El diseño del vector de expresión, que incluye la selección de secuencias reguladoras puede depender de factores tales como la elección de la célula hospedadora que va a ser transformada, el nivel de expresión de proteína deseado. Las secuencias reguladoras preferidas para la expresión de la célula hospedadora mamífera incluyen los elementos virales que dirigen los elevados niveles de la expresión de la proteína en las células mamíferas, tales como los promotores y/o potenciadores que derivan del citomegalovirus (CMV), el virus de los simios 40 (SV40), el adenovirus (por ej., el promotor tardío principal de adenovirus (AdMLP) y el poliomavirus.

Además de los genes de la cadena pesada y/o liviana del anticuerpo y las secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinante de la invención pueden transportar secuencias adicionales, tales como las secuencias que regulan la replicación del vector en las células hospedadoras (por ej., orígenes de replicación) y uno o más genes marcadores seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección de las células hospedadoras dentro de las cuales se ha introducido el vector. Por ejemplo, típicamente el gen marcador seleccionable confiere resistencia a los fármacos, tales como G418, higromicina, o metotrexato, sobre una célula hospedadora dentro de la

cual se ha introducido el vector. Los genes del marcador seleccionable preferido incluyen el gen de dihidrofolato reductasa (DHFR) (para uso en las células hospedadoras DHFR-minus con selección/ amplificación de metotrexato), el gen *neo* (para la selección de G418), y la glutamina sintetasa (GS) en una línea celular negativa del GS (tal como NS0) para selección/amplificación.

5 Para la expresión de las cadenas liviana y/o pesada, el vector o los vectores de expresión que codifican las cadenas pesadas y/o livianas es introducido en una célula hospedadora mediante técnicas estándares por ej., electroporación, precipitación del fosfato de calcio, transfección de la DEAE-dextrano, transducción, infección y similares. Si bien es teóricamente posible expresar los anticuerpos de la invención en células hospedadoras procariotas o eucariotas, preferentemente células eucariotas, y con máxima preferencia células hospedadoras mamíferas, porque estas células tienen mayor probabilidad de ensamblarse y secretar un anticuerpo inmunológicamente activo y adecuadamente plegado. Las células hospedadoras preferidas para expresar los anticuerpos recombinantes de la invención incluyen células de ovario de hámster chino (células CHO) (que incluyen células DHFR-CHO, que se describen en Urlaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-20, 1980, que se usan con un marcador seleccionable DHFR, por ej., como se describe en Kaufman and Sharp, J. Mol. Biol. 159:601-21, 1982, células de mieloma NS0, células COS, y células SP2/0. Cuando los vectores de expresión recombinante que codifican los genes del anticuerpo se introducen en las células hospedadoras mamíferas, los anticuerpos se produce por el cultivo de las células hospedadoras durante un período de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células hospedadoras o, más preferentemente, la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el cual se desarrollan las células hospedadoras. Los anticuerpos se pueden recuperar de la célula hospedadora y/o del medio de cultivo usando procedimientos de purificación estándares.

Las células hospedadoras además se pueden usar para producir porciones, o fragmentos, de anticuerpos intactos, por ej., fragmentos de Fab o moléculas de scFv mediante técnicas que son convencionales *per se*. Se entenderá que las variantes en el procedimiento anterior están dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, puede ser deseable transfectar una célula hospedadora con ADN que codifica o bien la cadena liviana o la cadena pesada de un anticuerpo de esta invención. La tecnología de ADN recombinante además se puede usar para remover parte o todo el ADN que codifica cualquiera o ambas cadenas pesada y liviana que no se a necesaria para la unión a la miostatina. Las moléculas expresadas a partir de estas moléculas de ADN truncadas también están comprendidas en los anticuerpos de la invención.

En un sistema preferido para la expresión recombinante de un anticuerpo de la invención, un vector de expresión recombinante que codifica tanto la cadena pesada del anticuerpo como la cadena liviana del anticuerpo es introducido en las células DHFR-CHO, por ej., mediante la transfección mediada por fosfato. Dentro del vector e expresión recombinante, los genes de la cadena pesada y liviana se enlazan operativamente a los elementos reguladores del potenciador/ promotor (por ej., que deriva de SV40, CMV, adenovirus y similares, tales como un elemento regulador del potenciador de CMV/ promotor del AdMLP o un elemento regulador del potenciador de SV40/ promotor del AdMLP) para conducir niveles elevados de transcripción de los genes. El vector de expresión recombinante además transporta un gen DHFR, que permite la selección /amplificación de metotrexato. Las células hospedadoras transformantes seleccionadas se cultivan para la expresión de las cadenas pesada y liviana del anticuerpo y el anticuerpo intacto se recupera del medio de cultivo. Las técnicas de biología molecular estándares se usan para preparar el vector de expresión recombinante, transfectar las células hospedadoras, seleccionar los transformantes, cultivar las células hospedadoras y recuperar el anticuerpo del medio de cultivo. Los anticuerpos o las porciones de unión al antígeno de los mismos, de la invención, se pueden expresar en un animal (por ej., un ratón) que es transgénico para los genes de inmunoglobulina (véase, por ej., Taylor, et al., Nucleic Acids Res. 20:6287-95, 1992).

Una vez que se expresan, los anticuerpos intactos, sus dímeros, las cadenas individuales liviana y pesada, u otras formas de inmunoglobulina de la presente invención se pueden purificar de acuerdo con los procedimientos estándares de la técnica, que incluyen la precipitación del sulfato de amonio, el intercambio iónico, la afinidad, la fase inversa, la cromatografía de columna de interacción hidrófoba, electroforesis en gel y similares. Las inmunoglobulinas sustancialmente puras de al menos aproximadamente 90%, 92%, 94% o 96% de homogeneidad son las preferidas, y 98 a 99% o más de homogeneidad son las más preferidas, para usos farmacéuticos. Una vez purificados, en forma parcial o hasta homogeneidad según se desee, los péptidos se pueden usar terapéutica o profilácticamente, como se indica en la presente.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "anticuerpo quimérico" incluye inmunoglobulinas monovalentes, divalentes o polivalentes. Un anticuerpo quimérico monovalente es un dímero que se forma mediante una cadena pesada quimérica asociada a través de los puentes disulfuro con una cadena liviana quimérica. Un anticuerpo quimérico divalente es un tetrámero formado por dos dímeros de cadena liviana-cadena pesada asociados a través de al menos un puente disulfuro.

Una cadena pesada quimérica de un anticuerpo para uso en humanos comprende una región de unión al antígeno que deriva de la cadena pesada de un anticuerpo no humano específico para miostatina, que se enlaza al menos a una porción de una región constante de cadena pesada humana, tal como CH1 o CH2. Una cadena liviana quimérica de un anticuerpo para uso en humanos comprende una región de unión al antígeno que deriva de la cadena liviana de un anticuerpo no humano específico para miostatina, que se enlaza al menos a una porción de

una región constante de cadena liviana humana (CL). Los anticuerpos, los fragmentos o derivados que tienen cadenas pesadas quiméricas y cadenas livianas de la misma o diferente especificidad de unión a la región variable, también se pueden preparar por asociación apropiada de las cadenas polipeptídicas individuales, de acuerdo con los pasos del procedimiento conocidos.

5 Con este enfoque, las hospedadoras que expresan las cadenas pesadas quiméricas se cultivan en forma separada de las hospedadoras que expresan las cadenas livianas quiméricas, y las cadenas de inmunoglobulina se recuperan en forma separada y luego se asocian. En forma alternativa, las hospedadoras se co-cultivan y las cadenas se dejan asociar espontáneamente en el medio de cultivo, seguido de la recuperación de la inmunoglobulina o el fragmento ensamblado.

10 Los procedimientos para producir anticuerpos quiméricos son conocidos en la técnica (véase, por ej., las Patentes Estadounidenses Nos: 6.284.471, 5.807.715, 4.816.567 y 4.816.397).

15 En una realización preferida, se crea un gen que comprende un primer segmento de ADN que codifica al menos la región de unión al antígeno de origen no humano (por ej., el de los Fabs 3, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14 o 15 como en la tabla 1, 2 y las figuras 4 y 5 en la presente), tal como la región variable (V) funcionalmente redispuesta con el segmento de unión (J), enlazado a un segundo segmento de ADN que codifica al menos una parte de una región constante (C) humana como se describe en la Patente Estadounidense No. 6.284.471.

20 Preferentemente un anticuerpo de la invención que se va a usar para fines terapéuticos, tendría la secuencia del marco y la región constante como existe en el anticuerpo que deriva del mamífero en el cual sería usado como terapéutico para disminuir la posibilidad de que el mamífero manipule una respuesta inmune contra el anticuerpo terapéutico.

Los anticuerpos humanizados son de particular interés, dado que se consideran valiosos para aplicación terapéutica, evitando la respuesta del anticuerpo anti-ratón humano observada frecuentemente con los anticuerpos del roedor. El término "anticuerpo humanizado" como se usa en la presente memoria se refiere a una inmunoglobulina que comprende porciones de anticuerpos de diferente origen, en los que al menos una porción es de origen humano. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado puede comprender porciones que derivan de un anticuerpo de origen no humano con la especificidad necesaria, tal como un ratón, y de un anticuerpo de origen humano, unido química mediante técnicas convencionales (por ej., síntesis) o preparado como un polipéptido contiguo usando técnicas de ingeniería genética. Preferentemente, un "anticuerpo humanizado" tiene CDRs que se originan de un anticuerpo no humano (preferentemente un anticuerpo monoclonal de ratón) mientras el marco y la región constante, en la medida que esté presente, (o una porción significativa o sustancial del mismo, es decir, al menos aproximadamente 90%, 92%, 94%, 96%, 98% o 99%) se codifican mediante la información de la secuencia de ácido nucleico que se produce en la región de inmunoglobulina de la línea germinal humana (véase, por ej., la base de datos ImMunoGeneTics Internacional) o en las formas recombinadas o mutadas de la misma ya sea que dichos anticuerpos se produzcan o no en la célula humana. Un anticuerpo humanizado puede ser un anticuerpo intacto, un anticuerpo sustancialmente intacto, una porción de un anticuerpo que comprende un sitio de unión al antígeno, o una porción de un anticuerpo que comprende un fragmento Fab, fragmento Fab', F(ab')<sub>2</sub>, o un fragmento Fv de cadena simple. Se contempla que en el procedimiento de crear un anticuerpo humanizado, el aminoácido en cualquier terminal de una CDR (véase por ej., las tablas 1 y 2) puede ser sustituido con un aminoácido que se produce en la línea germinal humana para ese segmento de la secuencia marco de unión.

40 Los anticuerpos humanizados pueden ser sometidos a mutagénesis *in vitro* usando procedimientos de rutina que se usan en la técnica (o, cuando se usa un animal transgénico para las secuencias de Ig humanas, mutagénesis somática *in vivo*) y, de este modo las secuencias de aminoácidos de la región marco de las regiones de HCVR y LCVR de los anticuerpos recombinantes humanizados son secuencias que, mientras derivan de las relacionadas con las secuencias de HCVR y LCVR de la línea germinal humana, pueden no existir naturalmente dentro del repertorio de la línea germinal del anticuerpo humano *in vivo*. Se contempla que estas secuencias de aminoácidos de las regiones marco de HCVR y LCVR de los anticuerpos recombinantes humanizados son al menos 90%, 92%, 94%, 96%, 98% o con más preferencia la menos 99% idénticas a la secuencia de la línea germinal humana.

50 Los anticuerpos humanizados tienen al menos tres ventajas potenciales sobre los anticuerpos no humanos y quiméricos para uso en terapia humana: (i) la porción efectora es humana, puede interactuar mejor con las otras partes del sistema inmune humano (por ej., destruir las células diana en forma más eficiente por citotoxicidad dependiente del complemento o por citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo); (ii) el sistema inmune humano no debe reconocer la región constante o marco del anticuerpo humanizado como foráneo, y por lo tanto la respuesta al anticuerpo contra un anticuerpo de este tipo inyectado debe ser inferior que aquella contra un anticuerpo no humano totalmente foráneo o un anticuerpo quimérico parcialmente foráneo; y (iii) se ha informado que anticuerpos no humanos inyectados tiene una semivida en la circulación humana mucho más corta que la semivida de los anticuerpos humanos. Los anticuerpos humanizados inyectados pueden tener una semivida muy similar a la de los anticuerpos humanos que se producen en forma natural, permitiendo de este modo que se suministren dosis más pequeñas y menos frecuentes.

En algunos casos la humanización puede afectar adversamente la unión al antígeno del anticuerpo. Preferentemente

un anticuerpo monoclonal anti-miostatina humanizado de la presente invención tendrá afinidad de unión para la miostatina no inferior a aproximadamente 50%, más preferentemente no inferior a aproximadamente 30%, y con máxima preferencia no inferior a aproximadamente 25%, 20%, 15%, 10% o 5% de la afinidad de unión del anticuerpo murino principal, preferentemente Fab 3, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14 o 15 para la miostatina (véase las figuras 4 y 5 en la presente). Preferentemente, un anticuerpo humanizado de la presente invención unirá el mismo epitopo como lo hace Fab 3, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14 o 15 que se describe en la presente. Dicho anticuerpo puede ser identificado sobre la base de su capacidad para competir con los Fabs 3, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14 o 15 para la unión a la miostatina madura o un péptido con la secuencia como se muestra en las SECs ID NOs 46 o 43.

En general, los anticuerpos humanizados se producen mediante la obtención de las secuencias de ácido nucleico que codifican la HCVR y la LCVR de un anticuerpo que se une a un epitopo de miostatina de la invención, identificando las CDRs en dicha HCVR y LCVR (no humana), e injertando estas secuencias de ácido nucleico que codifican la CDR en secuencias de ácido nucleico que codifican el marco humano. Preferentemente, las secuencias de aminoácidos de marco humanas se seleccionan de modo que el anticuerpo resultante probablemente sea adecuado para la administración *in vivo* en humanos. Esto puede determinarse, por ej., basado en el uso previo de los anticuerpos que contienen esta secuencia de marco humana. Preferentemente, la secuencia de marco humana será en sí misma significativamente inmunogénica.

En forma alternativa, las secuencias de aminoácidos de los marcos para el anticuerpo que va a ser humanizado (por ej., Fabs 3, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14 o 15) se compararán con las de las secuencias de marco humano conocidas; las secuencias de marco humanas que se van a usar para el injerto de la CDR serán seleccionadas basado en sus secuencias que las comprenden muy similares a las del anticuerpo principal, por ej., un anticuerpo murino que se une a la miostatina. Numerosas secuencias de marco humanas han sido aisladas y sus secuencias se informaron en la técnica. Esto mejora la probabilidad de que el anticuerpo humanizado injertado en al CDR resultante, que contiene las CDRs del anticuerpo principal (por ej., murino) injertado en los cuadros humanos seleccionados (y posiblemente además la región constante humana) retendrá sustancialmente la estructura de unión al antígeno y de este modo retendrá la afinidad de unión del anticuerpo principal. Para retener un grado significativo de afinidad de unión al antígeno, las regiones de marco humanas seleccionadas serán preferentemente aquéllas que se espera sean adecuadas para la administración *in vivo*, es decir, no inmunogénica.

En cualquier procedimiento, se obtiene la secuencia de ADN que codifica las regiones de HCVR y LCVR del anticuerpo anti-miostatina preferentemente murino. Los procedimientos para clonar las secuencias de ácido nucleico que codifican las inmunoglobulinas son bien conocidos en la técnica. Estos procedimientos, por ejemplo, pueden involucrar la amplificación de la secuencias que codifican la inmunoglobulina que van a ser clonadas usando los cebadores apropiados mediante la reacción en cadena de polimerasa (PCR). Los cebadores adecuados para amplificar las secuencias de ácido nucleico de inmunoglobulina, y las secuencias de HCVR y LCVR específicamente murinas han sido informadas en la literatura. Después de que estas secuencias que codifican inmunoglobulina han sido clonadas, serán secuencias obtenidas mediante procedimientos bien conocidos en la técnica.

Una vez que las secuencias de ADN que codifican las CDRs y los marcos del anticuerpo que debe ser humanizado han sido identificados, las secuencias de aminoácidos que codifican las CDRs se identifican (deducido sobre la base de las secuencias de ácido nucleico y el código genético y por comparación con las secuencias de anticuerpos anteriores) y la secuencias de ácido nucleico que codifican la CDR se injertan en las secuencias que codifican el marco humano seleccionadas. Esto puede obtenerse mediante el uso de cebadores y conectores apropiados. Los procedimientos para seleccionar cebadores y conectores adecuados para cebar la unión de las secuencias de ácido nucleico deseadas están bien dentro de la capacidad de un experto en la técnica.

Después de que las secuencias que codifican la CDR se injertan en las secuencias que codifican el marco humano seleccionadas, las secuencias de ADN resultantes que codifican las secuencias livianas variables y pesadas variables "humanizadas" se expresan para producir un anticuerpo Fv humanizado o humanizado que se une a la miostatina. Típicamente, la HCVR y la LCVR humanizadas se expresan como parte de una molécula del anticuerpo anti-miostatina completa, es decir, como una proteína de fusión con secuencias de dominio constante humano cuyas secuencias de ADN codificadoras se han obtenido de una biblioteca disponible en el comercio o se han obtenido usando, por ej., uno de los procedimientos antes descritos para obtener las secuencias de ADN, o están en la técnica. Sin embargo, las secuencias de HCVR y LCVR también pueden expresarse en ausencia de las secuencias constantes para producir un Fv anti-miostatina humanizado. No obstante, la fusión de las secuencias constantes humanas es potencialmente deseable porque el anticuerpo anti-miostatina humanizado resultante puede tener funciones efectoras humanas.

Los procedimientos para sintetizar el ADN que codifica una proteína de secuencia conocida son bien conocidos en la técnica. Usando estos procedimientos, las secuencias de ADN que codifican las secuencias de HCVR y LCVR humanizadas del tema (con o sin regiones constantes) se sintetizan, y luego se expresan en un sistema de vector adecuado para la expresión de anticuerpos recombinantes. Esto puede efectuarse en cualquier sistema de vector que proporciona las secuencias de HCVR y LCVR humanizadas del tema para ser expresadas como una proteína de fusión con secuencias de dominio constante humano y para asociarse para producir anticuerpos funcionales (de unión al antígeno) o fragmentos del anticuerpo.

Las secuencias de dominio constante humanas son bien conocidas en la técnica, y han sido informadas en la literatura. Las secuencias de cadena liviana constante humanas preferidas incluyen las secuencias de cadena liviana constante kappa y lambda. Las secuencias de cadena pesada constante humanas preferidas incluyen humana gamma 1, humana gamma 2, humana gamma 3, humana gamma r, y las versiones mutadas de las mismas que proporcionan un efecto o función alterada, por ej., semivida *in vivo* mejorada, unión al receptor Fc reducida, y similar.

Si están presentes, las regiones de marco humanas derivan preferentemente de una región variable del anticuerpo humano que tiene similitud de secuencia con la región análoga o equivalente del donante de la región de unión al antígeno. Otras fuentes de regiones de marco para las porciones de origen humano de un anticuerpo humanizado incluyen secuencias de consenso variables humanas (véase por ej., Kettleborough, C.A. et al. *Protein Engineering* 4:773-783 (1991); Carter et al., WO 94/04679. Por ejemplo, la secuencia del anticuerpo o región variable que se usa para obtener la porción no humana puede ser comparada con las secuencias humanas como se describe en Kabat et al. *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, NIH, U.S. Government Printing Office (1991). En una realización particularmente preferida, las regiones de marco de una cadena del anticuerpo humanizado derivan de una región variable humana que tiene al menos aproximadamente 60% de identidad de secuencia total, preferentemente al menos aproximadamente 70% de identidad de secuencia total y más preferentemente al menos aproximadamente 85% de identidad de secuencia total, con la región variable del donante no humano. Una porción humana además puede derivar de un anticuerpo humano que tiene al menos aproximadamente 65% de identidad de secuencia, y preferentemente al menos aproximadamente 70% de identidad de secuencia, dentro de la porción particular (por ej., FR) que se usa, cuando se compara con la porción equivalente (por ej., FR) del donante no humano.

En algunos casos, los anticuerpos humanizados producidos por el injerto de las CDRs (a partir de un anticuerpo que se une a la miostatina) en los marcos humanos seleccionados puede proporcionar anticuerpos humanizados que tienen la afinidad deseada a la miostatina. Sin embargo, puede ser necesario o deseable modificar además los residuos específicos del marco humano seleccionado a fin de potenciar la unión al antígeno. Preferentemente, esos residuos de marco del anticuerpo principal (por ej., murino) que mantienen o afectan la combinación de las estructuras del sitio serán retenidos. Estos residuos pueden ser identificados por cristalografía de rayos X del anticuerpo principal o el fragmento Fab, identificando de este modo la estructura tridimensional del sitio de unión al antígeno.

Las referencias que además describen procedimientos involucrados en la humanización de un anticuerpo de ratón que se puede usar son por ej., Queen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:2869, 1991; Patente Estadounidense No. 5.693.761; Patente Estadounidense No. 4.816.397; Patente Estadounidense No. 5.225.539; programas de computadora ABMOD y ENCAD como se describe en Levitt, M., *J. Mol. Biol.* 168:595-620, 1983.

Los anticuerpos de la presente invención son útiles en aplicaciones terapéuticas, de diagnóstico y de investigación como se describe en la presente. Un anticuerpo de la invención se puede usar para diagnosticar un trastorno o enfermedad asociada con la expresión de la miostatina humana. De manera similar, el anticuerpo de la invención se puede usar en un ensayo para controlar los niveles de miostatina en un sujeto que se trata por una afección asociada con la miostatina. Los ensayos diagnósticos incluyen procedimientos que usan el anticuerpo de la invención y una etiqueta para detectar la miostatina en una muestra, por ej., en el fluido corporal humano o en una célula o extracto de tejido. Las composiciones de enlace, tales como, por ej., anticuerpos, se usan con o sin modificación, y se marcan mediante la unión covalente o no covalente de un resto detectable. El resto detectable puede ser cualquiera que sea capaz de producir, ya sea directa o indirectamente, una señal detectable. Por ejemplo, el resto detectable puede ser un radioisótopo tal como, por ej., <sup>3</sup>H, <sup>14</sup>C, <sup>32</sup>P, <sup>35</sup>S o <sup>125</sup>I, un compuesto fluorescente o quimioluminiscente, tal como fluoresceína isotiocianato, rodamina, o luciferina; o una enzima, tal como alcalina fosfatasa, beta-galactosidasa, o peroxidasa del rábano picante. Se puede emplear cualquier procedimiento conocido en la técnica para conjugar en forma separada el anticuerpo al resto detectable, incluyendo aquellos procedimientos que se describen en Hunter, et al., *Nature* 144:945, 1962; David, et al., *Biochemistry* 13: 1014, 1974; Pain, et al., *J. Immunol. Meth.* 40: 219, 1981; and Nygren, *J. Histochem. And Cytochem.* 30: 407, 1982.

Una variedad de protocolos convencionales para medir la miostatina, incluyendo por ej., ELISA, RIAs, y FACS, son conocidos en la técnica y proporcionan una base para diagnosticar niveles alterados o anormales de la expresión de miostatina. Los valores de expresión normal o estándar se establecen usando cualquier técnica conocida en el arte, por ej., combinando una muestra que comprende un polipéptido de miostatina con, por ej., anticuerpos en condiciones adecuadas para formar un complejo de antígeno: anticuerpo. El anticuerpo es marcado directa o indirectamente con una sustancia detectable para facilitar la detección del anticuerpo unido o sin unir. Las sustancias detectables adecuadas incluyen varias enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes y materiales radiactivos. Ejemplos de enzimas adecuadas incluyen la peroxidasa de rábano picante, alcalina fosfatasa, β-galactosidasa, o acetilcolinesterasa; ejemplos de complejos del grupo prostético adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbelliferone, fluoresceína, fluoresceína isotiocianato, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, dansyl cloruro o ficoeritrin; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; y ejemplos de un material radiactivo incluyen <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I, <sup>35</sup>S, o <sup>3</sup>H. (Véase, por ej., Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, CRC Press, Inc. (1987)).

La cantidad de un complejo estándar formado se cuantifica mediante varios procedimientos, tales como, por ej., medios fotométricos. Las cantidades del polipéptido de miostatina que se expresa en el sujeto, en el control y en las muestras (por ej., del tejido de biopsia) se comparan posteriormente con los valores estándares. Las desviación entre los valores estándares y del sujeto, establece parámetros para correlacionar un trastorno, estado, afección, síndrome o enfermedad particular con un cierto nivel de expresión (o falta de la misma) para un polipéptido de miostatina.

Una vez que se establece la presencia del trastorno, estado, afección, síndrome o enfermedad y se inicia un protocolo de tratamiento, se repiten los ensayos sobre una base regular para controlar el nivel de expresión de la miostatina. Los resultados obtenidos de ensayos sucesivos se usan para mostrar la eficacia del tratamiento en un período que oscila entre varios días hasta meses. Con respecto a un trastorno particular (por ej., fragilidad o caquexia) la presencia de una cantidad alterada de miostatina en el tejido o fluido de biopsia (por ej., suero u orina) de un sujeto puede indicar una predisposición para el desarrollo de un trastorno, estado, afección, síndrome, o enfermedad antes de la aparición de los síntomas clínicos reales o puede definir una población con mayor probabilidad de responder terapéuticamente a un anticuerpo de la invención. Una detección inicial más definitiva puede permitir un tratamiento más temprano evitando y/o aliviando de este modo un mayor avance de la proliferación celular.

Se puede incorporar un anticuerpo de la invención a las composiciones farmacéuticas adecuadas para su administración a un sujeto. Los compuestos de la invención se pueden administrar solos o en combinación con un vehículo, portador, diluyente, y/o excipiente aceptable desde el punto de vista farmacéutico, en dosis simples o múltiples. Las composiciones farmacéuticas para administración se diseñan para que sean apropiadas para el modo de administración seleccionado, y se usan como apropiados los diluyentes, portadores y/o excipientes aceptables desde el punto de vista farmacéutico tales como agentes dispersantes, buffers, tensioactivos, conservantes, agentes solubilizantes, agentes de isotonicidad, agentes estabilizantes y similares. Dichas composiciones se diseñan de acuerdo con técnicas convencionales como por ej., en Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 19<sup>o</sup> Edición, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA 1995 que proporciona un compendio de técnicas de formulación como las conocen generalmente los profesionales.

Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo monoclonal anti-miostatina de la presente invención se puede administrar a un sujeto en riesgo de exhibir o que exhibe patologías como las que se describen en la presente usando técnicas de administración estándares que incluyen la administración oral, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, pulmonar, transdérmica, intramuscular, intranasal, bucal, sublingual, o supositorio.

Una composición farmacéutica de la invención preferentemente es una "cantidad eficaz desde el punto de vista terapéutico" o una "cantidad eficaz desde el punto de vista profiláctico" de un anticuerpo de la invención. Una "cantidad eficaz desde el punto de vista terapéutico" se refiere a una cantidad eficaz, en dosificaciones y durante períodos de tiempo necesaria para obtener el resultado terapéutico deseado. Una cantidad eficaz desde el punto de vista terapéutico del anticuerpo puede variar de acuerdo con los factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo, y el peso del individuo, y la capacidad del anticuerpo o la porción del anticuerpo para obtener una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad eficaz desde el punto de vista terapéutico además es una en la cual cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo, es superado por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una "cantidad eficaz desde el punto de vista profiláctico" se refiere a una cantidad eficaz, en dosificaciones y durante períodos de tiempo necesaria para obtener el resultado terapéutico deseado. Típicamente, dado que una dosis profiláctica se usa en los sujetos antes, o en la etapa más temprana de la enfermedad, la cantidad eficaz desde el punto de vista profiláctico será menor que la cantidad eficaz desde el punto de vista terapéutico.

Una cantidad eficaz desde el punto de vista terapéutico es al menos la dosis mínima, pero inferior a una dosis tóxica, de un agente activo que es necesaria para impartir el beneficio terapéutico a un sujeto. Dicho de otra forma, una cantidad eficaz desde el punto de vista terapéutico es una cantidad que en mamíferos, preferentemente humanos, aumenta la masa muscular, aumenta la densidad ósea, o trata afecciones en las que la presencia de miostatina origina o contribuye a efectos patológicos indeseables o la disminución de los niveles de miostatina da por resultado un efecto terapéutico beneficioso en un mamífero, preferentemente un humano, incluyendo, pero sin limitación, pérdida de masa muscular, fragilidad, sarcopenia relacionada con la edad, osteoporosis, obesidad, distrofia muscular de cualquier tipo, miopatía de cuidado intensivo, sepsia, caquexia, (por ej., relacionada con el cáncer o inducida por el VIH), TPOC, osteoartritis, insuficiencia renal, insuficiencia hepática, insuficiencia o enfermedad cardíaca, síndrome metabólico y diabetes tipo II.

La vía de administración de un anticuerpo de la presente invención puede ser oral, parenteral, por inhalación, o tópica. Preferentemente, los anticuerpos de la invención se pueden incorporar a una composición farmacéutica adecuada para administración parenteral. El término parenteral como se usa en la presente memoria incluye la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, rectal, vaginal, o intraperitoneal. Se prefiere la administración sistémica periférica por inyección intravenosa o intraperitoneal o subcutánea. Los vehículos adecuados para estas inyecciones son claros y concisos en la técnica.

La composición farmacéutica típicamente debe ser estéril y estable conforme las condiciones de producción y almacenamiento en el envase provisto, que incluye por ej., un recipiente cerrado o una jeringa. Por lo tanto, las

composiciones farmacéuticas pueden ser filtradas estériles después de producir la formulación, o aparte de eso pueden hacerse aceptables desde el punto de vista microbiológico. Una composición típica para infusión intravenosa podría tener un volumen de 250 – 1000 ml de fluido, tal como la solución de Ringer estéril, la solución salina fisiológica, la solución de dextrosa y la solución de Hank y una dosis eficaz desde el punto de vista terapéutico (por ej., 1 a 100 mg/ml, o más) de concentración del anticuerpo. La dosis puede variar dependiendo del tipo y la severidad de la enfermedad. Como es bien conocido en la técnica médica, las dosificaciones para cualquier sujeto depende de muchos factores, incluyendo la talla del paciente, el área de superficie corporal, la edad, el compuesto particular que se va a administrar, el sexo, el tiempo y la vía de administración, la salud general, y otros fármacos que se administran en forma concurrente. Una dosis típica puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 0,001 a 1000 µg; sin embargo, las dosis por debajo o por encima de este intervalo de ejemplo se prevén, especialmente considerando los factores antes mencionados. El régimen de dosificación parenteral diario puede ser aproximadamente 0,1 µg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg del peso corporal total, preferentemente desde aproximadamente 0,3 µg/kg hasta 1 mg/kg, incluso más preferentemente desde aproximadamente 0,5 hasta 10 mg/kg de peso corporal por día. El avance puede ser controlado por evaluación periódica. Para las administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento se repite hasta que se produce una eliminación deseada de los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, otros regímenes de dosificación pueden ser útiles y no están excluidos de la presente. La dosificación deseada puede ser administrada mediante una única administración por bolo, mediante administraciones múltiples de bolo, o mediante administración por infusión continua del anticuerpo, dependiendo del patrón de decadencia farmacocinética que el profesional desea obtener.

Estas cantidades sugeridas del anticuerpo están sujetas en gran medida al criterio terapéutico. El factor clave para seleccionar una dosis apropiada y su programación es el resultado obtenido. Los factores para consideración en este contexto incluyen el trastorno particular que se trata, el mamífero particular que se trata, la afección clínica del paciente individual, el origen del trastorno, el sitio de administración del anticuerpo, el tipo particular del anticuerpo, el procedimiento de administración, la programación de la administración, y otros factores conocidos para los profesionales médicos.

Los agentes terapéuticos de la invención pueden ser congelados o liofilizados para almacenamiento y reconstituidos en un portador estéril adecuado antes del uso. La liofilización y la reconstitución pueden conducir a grados variados de pérdida de actividad del anticuerpo. Puede ser necesario ajustar las dosificaciones para compensar. En general, se prefiere el pH entre 6 y 8.

### 30 **Uso terapéutico**

La miostatina cumple un rol en el desarrollo muscular y en un número de trastornos o enfermedades relacionadas (véase por ej., la solicitud de patente estadounidense 2003/0074680 y 2003/0082181). En los adultos, el ARNm de la miostatina se detecta esencialmente en el músculo esquelético si bien concentraciones inferiores también se encuentran en el tejido adiposo y el tejido cardíaco (Sharma, M., et al, J. Cell Physiol. 180:1, 1999). Los ratones noqueados con miostatina tienen dos a tres veces más grande la masa muscular que los miembros de su camada de tipo salvaje. El aumento de la masa muscular es el resultado de la hipertrofia fibrosa y la hiperplasia (McPherron, A., et al. Nature 387:83-90, 1997 y Zhu, X. et al., FEBS Letters 474:71). Además, los ratones noqueados con miostatina acumulan menos grasa que los miembros de su camada de tipo salvaje pero además de eso parecen normales y saludables. Recientemente se ha demostrado además que la miostatina es un importante regulador de adipogénesis (Rebbapragada, A., et al., Mol. and Cell. Bio. 23:7230-7242, 2003). Además, la estructura ósea y el contenido ha sido estudiado recientemente en los ratones deficientes en miostatina (Hamrick M.W., et al., J. Orthopaedic Research 21: 1025, 2003; Hamrick, M.W., et al., Calcif Tissue Int 71:63, 2002).

Por lo tanto, una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo monoclonal anti-miostatina de la invención puede ser usada para aumentar la masa muscular, incrementar la densidad ósea, o puede ser útil para el tratamiento de afecciones en las que la presencia de miostatina origina o contribuye a efectos patológicos indeseables o la disminución de los niveles de miostatina tiene un beneficio terapéutico en mamíferos incluyendo, pero sin limitación, las afecciones de: pérdida de masa muscular, fragilidad, sarcopenia relacionada con la edad, osteoporosis, obesidad, distrofia muscular, miopatía, caquexia, sepsia, osteoartritis, TPOC, insuficiencia renal, insuficiencia hepática, insuficiencia o enfermedad cardíaca, síndrome metabólico y diabetes tipo II.

En la presente se contempla el uso de un anticuerpo monoclonal anti-miostatina de la presente invención para tratar o prevenir al menos uno de los trastornos antes mencionados en los cuales la actividad de miostatina es perjudicial o que beneficia los niveles disminuidos de la miostatina bioactiva. Además, se contempla el uso de un anticuerpo monoclonal anti-miostatina de la presente invención para uso en la manufactura de un medicamento para el tratamiento de al menos uno de los trastornos antes mencionados.

Como se usa en la presente memoria, los términos “tratamiento”, “que trata”, y similares, se refieren a la obtención de un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de evitar completa o parcialmente una enfermedad o síntoma de la misma y/o puede ser terapéutico en términos de una cura parcial o completa para una enfermedad y/o efecto adverso atribuible a la enfermedad. “Tratamiento” como se usa en la memoria presente, incluye la administración de un compuesto de la presente invención para el tratamiento de una enfermedad o afección en un mamífero, particularmente en un humano, e incluye: (a) evitar que la enfermedad

ocurra en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad pero aún no ha sido diagnosticado que la tiene; (b) inhibir la enfermedad, es decir, detener su desarrollo, y (c) aliviar la enfermedad, es decir, originar la regresión de la enfermedad o el trastorno o aliviar los síntomas o complicaciones de los mismos. Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar la óptima respuesta deseada (por ej., una respuesta terapéutica o profiláctica).

5 Por ejemplo, se puede administrar un único bolo, se pueden administrar varias dosis divididas en el tiempo o la dosis puede ser reducida o aumentada proporcionalmente como se indica por las exigencias de la situación terapéutica.

Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo ilustrativo únicamente, y no intentan limitar el alcance de la presente invención de manera alguna.

### Ejemplos

#### 10 **Ejemplo 1:** Síntesis del Fab anti-miostatina

Los clones de los Fabs anti-miostatina se aíslan de una biblioteca de Fab creada por la inmunización de ratones tipo salvaje C57Bl/6 usando la tecnología de anticuerpos Omniclonal™ Biosite®, San Diego, CA). Los ratones se inmunizan con un polipéptido inmunogénico con la secuencia de aminoácidos: ANYCSGESEFVFLQYPHHLVHQA (SEC ID NO: 43). Esta secuencia es idéntica a la secuencia que abarca los aminoácidos 40-64 de la forma madura de miostatina humana (SEC ID NO: 2) con la excepción de que el residuo Cys en la posición 47 en la miostatina madura humana de tipo salvaje (subrayada en la SEC ID NO: 43 anterior) es cambiado a un residuo Ser para evitar el portador o el ligamiento hapteno al péptido en el residuo. Para mejorar la inmunogenicidad de este péptido la proteína transportadora, la hemocianina extraída del molusco lapa californiana, y un péptido de la célula T auxiliar se conjugan al péptido inmunogénico de acuerdo con los procedimientos estándares. Las secuencias de aminoácidos del marco y la CDR de HCVR y LCVR que se divulgan en la presente (tablas 1 y 2; figuras 4 y 5) se identifican como las secuencias de los Fabs de la biblioteca que se unen a la miostatina madura (por ej., SEC ID NO: 2) y se unen al péptido inmunogénico y neutralizan una actividad de la miostatina. Las secuencias nucleotídicas representativas que codifican la LCVR y la HCVR de los Fabs se enumeran a continuación en la tabla 3.

Tabla 3 – Secuencia nucleotídica representativa que codifica la LCVR y la HCVR del Fab

#### 25 LCVR (SEC ID NO: 44)

```
5'caaatgttctcaccagtcctccagcaatcatgtctgcatctccaggggagaaggtca
ccatgacctgcagtgccagctcaagtataagttacatgcactggtaccagcagaagccag
gcacctccccaaaagatggatttatgacacatccaaactggcttctggagtccttgctc
gcttcagtgccagtggtctgggacctcttactctctcacaatcagcagcatggaggctg
aagatgctgccacttattactgccagcagtggtatagtaaccactcacgctcgggtgctg
ggaccaagctggagctgaaacgggctgat 3'
```

#### HCVR (SEC ID NO: 45)

```
5'caggttacgctgaaagagtcctggccctgggatattgcagtcctcccagaccctcagtc
tgacttggtctctctctgggttttcaactgagaacgtctggtatgagtgtagctggattc
gtcagtcctcaggaaagggctctggagtggtggcacacatttatgggatgatgacaagc
gctataaccatccctgaggaaccgactcacaatctccaaggataccttgagaaaccagg
tcttctcaagatcaccagtggtgggactgcagatactgccacatactactgtgctcgaa
gagctattactacggtaatagggggagggactatggactactggggtcaaggaacctcag
tcaccgtctcctca 3'
```

### **Ejemplo 2:** Ensayos ELISA

#### 30 A. Fabs anti-miostatina que se unen preferentemente a la miostatina madura

Los Fabs anti-miostatina de ratón de la presente invención (véase, figuras 4 y 5) se ensayan en un ensayo ELISA, en el cual se mide la unión del Fab a la miostatina madura (forma dimérica) recubierta en varias concentraciones en una placa de 96 pocillos. También se ensaya la unión de los Fabs al GDF-11.

35 Cada pocillo de dos placas de 96 pocillos se recubre con 70 µl de miostatina de ratón recombinante (R&D systems, Cat. #788-G8/CF, libre de portador, 1Pg/ml en buffer de carbonato, pH 9,6) o 70 µl de GDF-11 humano recombinante (Peprotech, Inc., Cat. # 120-11, libre de portador, 1(µg/ml en buffer de carbonato, pH 9,6). Las placas se incuban a 4°C durante toda la noche. Los pocillos se aspiran y se lavan dos veces con buffer de lavado (20 mM de Tris (hidroximetil) aminometano, pH 7,4, 0,15 M de NaCl, 0,1% de Tween-20). Las placas se bloquean con 200 µl de buffer bloqueador por pocillo (5% de leche instantánea de clavel en el buffer de lavado anterior) durante 5 horas.



Los Fabs que se van a ensayar se diluyen en el buffer bloqueador a 10 µg/ml, 2 µg/ml, 0,4 µg/ml, 0,08 µg/ml, y 0,016 µg/ml. Cincuenta microlitros de cada solución de Fab se adiciona a los pocillos recubiertos con GDF-8 y GDF-11 en duplicado. Las placas se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente. Los pocillos se lavan a continuación 3 veces con buffer de lavado.

- 5 El anticuerpo secundario peroxidasa conjugado (50 µl de HRP kappa anti-ratón de cabra (Southern Biotech), diluido 1: 2000 en buffer bloqueador) se adiciona a cada pocillo y se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente. Los pocillos se lavan a continuación 3 veces con buffer de lavado. Cincuenta microlitros de sustrato cromogénico (es decir, sustrato OPD) se adiciona a cada pocillo y se deja desarrollar a temperatura ambiente durante 13 minutos. La reacción se detiene adicionando 100 µl de HCl 1N a cada pocillo. La absorbancia de los pocillos se lee en OD de 10 490 nm. Se determina la absorbancia promedio de los pocillos duplicados.

Estos datos muestran que los Fabs 3, 5 y 7 de la invención (figuras 4 y 5) se unen a la miostatina madura humana unida a la placa y preferentemente se une a la miostatina cuando se compara con la unión del GDF-11.

#### B. Fabs anti-miostatina se unen al inmunogen peptídico de miostatina (I).

- 15 Los Fabs anti-miostatina de ratón 3, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14 y 15 se ensayan en un ensayo ELISA, en el cual se mide la unión del Fab al polipéptido usado para la inmunización de ratones ("inmunogen del péptido"). Este polipéptido abarca los aminoácidos 40 a 64 de la miostatina madura y tiene la secuencia de aminoácidos ANYCSGESEFVFLQKYPHTLVHQA (SEC ID NO: 43) como se describe en la presente memoria.

- 20 Cada pocillo de dos placas de 96 pocillos está recubierta con 70 µl del inmunogen peptídico usado para generar los Fabs (2 µg/ml en buffer de carbonato, pH 9,6). Las placas se incuban en un horno seco a 37°C durante toda la noche sin las tapas. Los pocillos se aspiran y se lavan dos veces con buffer de lavado (20 mM de Tris (hidroximetil) aminometano, pH 7,4, 0,15 M de NaCl, 0,1% de Tween-20). Las placas se bloquean con 200 µl de buffer bloqueador por pocillo (5% de leche de grado de inmunodetección BioRad en el buffer de lavado anterior) durante 2,5 horas.

- 25 Los Fabs se diluyen en el buffer bloqueador a 10 µg/ml, 2 µg/ml, 0,4 µg/ml, 0,08 µg/ml, y 0,016 µg/ml. Un anticuerpo monoclonal anti-miostatina de rata ((R&D Systems, catálogo #MAB788, clone #84214) y un anticuerpo anti-miostatina policlonal (R&D Systems, catálogo #AF788), se usan como controles en las concentraciones anteriores y se diluyen además en el buffer bloqueador. Cincuenta microlitros de cada solución de anticuerpo se adicionan a los pocillos recubiertos con péptido por duplicado. Las placas se incuban durante 1,5 hora a temperatura ambiente. Los pocillos se lavan a continuación 3 veces con buffer de lavado.

- 30 Se adiciona a cada pocillo anticuerpo secundario peroxidasa conjugado (50 µl de HRP kappa anti-ratón de cabra (southern Biotech) para Fabs, 50 µl de anti-rata de ratón (Jackson ImmunoResearch) para monoclonal, 50 µl de anti-cabra de conejo (Jackson ImmunoResearch) para policlonal, todos diluidos 1:2000 en buffer bloqueador y se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente. Los pocillos se lavan a continuación 3 veces con buffer de lavado. Cincuenta microlitros de sustrato cromogénico (es decir, sustrato OPD) se adiciona a cada pocillo y se deja desarrollar a temperatura ambiente durante 10 minutos. La reacción se detiene adicionando 100 µl de HCl 1N a cada pocillo. La absorbancia de los pocillos se lee a 490 nm. Se determina la absorbancia promedio de los pocillos duplicados, y estos valores se enumeran en la tabla 4, a continuación.

- 40 Los Fabs se unen al inmunogen peptídico unido a la placa. El anticuerpo policlonal además se une al inmunogen peptídico en un menor grado que los Fabs. La unión al anticuerpo monoclonal R&D está en los niveles de fondo, que es consistente con el anticuerpo monoclonal R&D que reconoce un epitopo diferente al que es abarcado por el péptido inmunogénico.

#### C. Fabs anti-miostatina se unen a varios miembros de la superfamilia de TGF-β.

- 45 Los Fabs anti-miostatina de ratón 3, 5, 7 (véase las figuras 4 y 5), y un anticuerpo anti-miostatina policlonal (R&D Systems) se ensayan en un ensayo ELISA, en el cual se mide la unión de los Fabs y el anticuerpo a los miembros de la familia del antígeno (GDF\_8/miostatina) recubierto sobre una placa. Se ensaya la unión de los Fabs al siguiente panel de los miembros de la superfamilia del TGF-beta GDF-8/miostatina (control), GDF-11, BMP-2, BMP-5, BMP-6, BMP-7, Activin A, Activin B, TGF-alfa, TGF-betal, y TGF-beta2. También se ensaya IGF-1 como control negativo.

- 50 Cada pocillo de una placa de 96 pocillos está recubierto con 70 µl de uno de los factores de crecimiento mencionados anteriormente (10 µl en buffer de carbonato, pH 9,6) por duplicado. Véase la tabla 5 para Fuentes y números de catálogo. Las placas se incuban a 4°C durante toda la noche. Los pocillos se aspiran y se lavan dos veces con buffer de lavado (20 mM de Tris (hidroximetil) aminometano, pH 7,4, 0,15 M de NaCl, 0,1 % de Tween-20). Las placas se bloquean con 200 µl de buffer bloqueador por pocillo (5% de leche instantánea de clavel en el buffer de lavado anterior) durante 3 horas.

Los anticuerpos se diluyen en buffer bloqueador a 10 µl/ml. Cincuenta microlitros de cada solución de anticuerpo se adicionan a los pocillos recubiertos con factor de crecimiento. Las placas se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente. Los pocillos se lavan a continuación 3 veces con buffer de lavado.

5 Se adiciona a cada pocillo anticuerpo secundario peroxidasa conjugado (50 µl de HRP kappa anti-ratón de cabra (Southern Biotech) para los Fabs, 50 µl de anti-cabra de conejo (Jackson ImmunoResearch) para policlona, diluidos 1:2000 en buffer bloqueador) y se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente. Los pocillos se lavan a continuación 3 veces con buffer de lavado. Cincuenta microlitros de sustrato cromogénico (es decir, sustrato OPD) se adiciona a cada pocillo y se deja desarrollar a temperatura ambiente durante 10 minutos. La reacción se detiene  
10 adicionando 100 µl de HCl 1N a cada pocillo. La absorbancia de los pocillos se lee a 490 nm. Se determina la absorbancia promedio de los pocillos duplicados, y estos valores se enumeran en la tabla 6, a continuación.

Estos datos muestran que los Fabs 3, 5, y 7 se unen preferentemente a la miostatina más que a las otras proteínas ensayadas. Se detecta poca unión o ninguna por encima del fondo para los Fabs a cualquiera de los otros miembros de la superfamilia TGF-beta en estas condiciones, con la excepción de una cantidad muy pequeña de unión al GDF-11 por el Fab3. Sin embargo, el anticuerpo policlona anti-miostatina R&D también se une al GDF-11 (véase la tabla  
15 6 a continuación).

Tabla 5

	Compañía origen	Catálogo #
GDF-8	R&D Systems	788-G8/CF
GDF-11	Peprotech, Inc.	120-11
IGF-1	R&D Systems	291-G1
BMP-2	R&D Systems	355-BEC/CF
BMP-5	R&D Systems	6115-BM
BMP-6	R&D Systems	507-BP
BMP-7	R&D Systems	354-AC
Activin A	R&D Systems	338-AC
Activin B	R&D Systems	659-AB
TGF-a	R&D Systems	239-A
TGF-b1	Peprotech, Inc.	100-21R
TGF-b2	Peprotech, Inc.	100-35

Tabla 6

	GDF-8	GDF-11	IGF-1	BMP-2	BMP-5	BMP-6
R&D poly	2,941	2,621	0,045	0,0525	0,038	0,0745
Fab 3	0,4195	0,0705	0,034	0,0345	0,034	0,0335
Fab 5	0,202	0,034	0,035	0,032	0,033	0,0325
Fab 7	0,358	0,04	0,034	0,0335	0,0345	0,035
	BMP-7	Activin A	Activin B	TGF-a	TGF-b1	TGF-b2
R&D poly	0,042	0,049	0,0485	0,0445	0,0425	0,0525
Fab 3	0,033	0,033	0,032	0,033	0,034	0,034
Fab 5	0,032	0,033	0,033	0,033	0,0325	0,034
Fab 7	0,031	0,0325	0,031	0,0315	0,032	0,0345

**Ejemplo 3.** Ensayo de neutralización de miostatina

Las explantas ectodérmicas se remueven de los embriones *Xenopus* de la blástula en la etapa 8-9 mediante procedimientos estándares y se cultivan en 0,5X MBS (1X MBS: 88 mM de NaCl, 1 mM de KCl, 0,7 mM de CaCl<sub>2</sub>, 1 mM de MgSO<sub>4</sub>, 5 mM de HEPES, 2,5 mM de NaHCO<sub>3</sub>, 1:1000 v/v de gentamicina, 0,1% de albúmina de suero bovino) con la adición del factor de crecimiento (GDF8 o GDF11) más o indicado, durante 18 horas a 18°C, en cuyo momento los embriones de control alcanzan la etapa neurula temprana (etapa 15-16). Las explantas se fotografían y se mide la longitud de cada explanta usando un algoritmo de análisis de imagen para la cuantificación del capuchón del animal. Las explantas que no se tratan con el factor de crecimiento o el Fab (controles), dan vuelta en las bolas de la epidermis. La miostatina y el GDF-11 inducen al mesodermo en estas explantas ectodérmicas que hace que las explantas se alarguen y formen estructuras del tipo pesas. Los anticuerpos o los Fabs, cuando se ensayan para neutralizar la actividad, se adicionan al medio de cultivo que contiene miostatina para la extensión completa del período de cultivo y se evalúa su capacidad de inhibir los movimientos de elongación inducidos por el factor de crecimiento. La miostatina se adiciona a las explantas a 25 ng/ml. Los anticuerpos o los Fabs se adicionan a 20 µg/ml. El Fab34 es un Fab generado para un antígeno irrelevante. También se ensayó el anticuerpo policlonal anti-miostatina disponible en el comercio; este anticuerpo es producido en cabras inmunizadas con GDF8 de ratón purificado y el fabricante demostró que neutraliza la elongación de los capuchos del animal *Xenopus* obtenidos por 25 ng/ml de GDF8 murino cuando está presente a aproximadamente 10-50 µl/ml (R&D Systems, Inc. Cat. #AF788). Se ensayó el anticuerpo GDF8 anti-ratón monoclonal disponible en el comercio, el fabricante demostró que este anticuerpo neutraliza la elongación de los capuchos del animal *Xenopus* obtenidos por 25 ng/ml de GDF8 murino cuando está presente a aproximadamente 10-20 µl/ml (R&D Systems Cat. #MAB788). Obsérvese que los datos ELISA del ejemplo 2 en la presente muestran que este anticuerpo R&D se une a una región diferente de la miostatina que los Fabs de la presente invención.

El ImagePro (v4.5.1.22, de Media Cybernetics) se usa para el procesamiento de imagen. Se escribe una macro para automatizar el procesamiento de la imagen. La macro procesa la imagen y registra la longitud en unidades de bits. Se pueden usar procedimientos de medición alternativos como se conoce en la técnica. Los Fabs 3, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14 y 15 pueden neutralizar significativamente la actividad del GDF8 en el ensayo de capuchón del animal.

**Ejemplo 4:** Medición de la afinidad de los Fabs monoclonales

La afinidad y los índices de  $K_{on}$  y  $K_{off}$  de los Fabs de miostatina 3, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15 de la presente invención se miden usando un instrumento BIAcore® 2000 que contiene un chip sensor CM5. El BIAcore® utiliza las propiedades ópticas de la resonancia del plasmón superficial para detectar las alteraciones en la concentración de proteína de las moléculas interactivas dentro de una matriz biosensora de dextrano. Salvo donde se observe, todos los reactivos y materiales se adquieren de BIAcore® AB (Upsala, Suecia). Todas las mediciones se realizan a 25°C. Las muestras que contienen miostatina de rata o humana se disuelven en buffer de HBS-EP (150 mM de cloruro de sodio, 3 mM de EDTA, 0,005% (p/v) de tensioactivo P-20, y 10 mM de HEPES, pH 7,4). Un anticuerpo de captura, Kappa anti-ratón de cabra (Southern Biotechnology, Inc), se inmoviliza en las células de flujo usando química de acoplamiento de amina. Las células de flujo (1-4) se activan durante 7 minutos con una mezcla 1:1 de 0,1 M de N-hidroxisuccinimida y 0,1 M de 3-(N,N-dimetilamino)propil-N-etilcarbodiimida a un caudal de 10 µl/min. El kappa anti-ratón de cabra (30 µg/ml en 10 mM de acetato de sodio, pH 4,5) se inyecta manualmente en todas las 4 células de flujo a un caudal de 10 µl/ml. La densidad superficial se controla y se inyecta kappa anti-ratón de cabra adicional si fuera necesario a la célula individual hasta que todas las células de flujo alcancen una densidad superficial de 4500-5000 unidades de respuesta (UR). Las superficies se bloquean con una inyección de 7 minutos de 1 M de etanolamina, HCl, pH 8,5 (10 µl/min). Para asegurar la eliminación completa de cualquier kappa anti-ratón de cabra no covalentemente unido, se inyectan dos veces 15 µl de 10 mM de glicina, pH 1,5. El buffer de corrida usado para los experimentos cinéticos contenía 10 mM de HEPES, pH 7,4, 150 mM de NaCl, 0,005% de P20.

La recolección de los datos de unión cinéticos se realiza a una caudal máximo (100 µl /min) y una densidad superficial baja para minimizar los efectos de transporte de masa. Cada ciclo de análisis consiste de (i) captura de 300-350 UR de los Fabs (BioSite) por inyección de 5-10 µl de 5 µg/ml de solución sobre la célula de flujo 2, 3 y 4 para diferentes Fabs a un caudal de 10 µl/min., (ii) inyección de 200 µl (2 min) de miostatina humana (intervalo de concentración de 50 nM hasta 1,56 nM en 2 veces de incrementos dilución) sobre todas las 4 células de flujo con la célula de flujo 1 como la célula de flujo de referencia, (iii) disociación de 10 min (flujo de buffer), (iv) regeneración de la superficie de kappa anti-ratón de cabra con una inyección de 15 seg. de 10 mM de glicina, pH 1,5, (v) una inyección blanco de 30 seg. de buffer de corrida, y (vi) un tiempo de estabilización de 2 min antes del inicio del próximo ciclo. La señal se controla como la célula de flujo 2 menos la célula de flujo 1, la célula de flujo 3 menos la célula de flujo 1 y la célula de flujo 4 menos la célula de flujo 1. Las muestras y un blanco de buffer se inyectan en duplicado en un orden aleatorio. Los datos se procesan usando el software BIAevaluation 3.1 y los datos se adaptan a un modelo de unión 1:1 en el software de análisis global CLAMP.

Los Fabs 3, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14 y 15 tienen valores KD entre  $7 \times 10^{-6}$  y  $4.0 \times 10^{-8}$ .

**Ejemplo 5.** Modelo de ratón *in vivo* de eficacia músculo esquelético.

5 Ratonos ICR machos (8 semanas de vida, Taconic NY) se castran (gonadectomizan, GDX) de acuerdo con los procedimientos aprobados y se dejan debilitar durante diez semanas. También se obtienen ratones con operación simulada (Sham) de igual edad. Los ratones con operación simulada se operan de la misma manera que los castrados salvo que sus testículos no se remueven. Los animales se alojan en un cuarto con la temperatura controlada (24°C) con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas invertidos y se deja ad libitum agua y alimento.

10 Para demostrar la eficacia in vivo, el compuesto de la presente invención se administra semana por medio por inyección subcutánea a los ratones de dieciocho semanas de edad castrados (peso corporal aproximado de 48-50 g) y a los ratones con operación simulada de la misma edad. El compuesto de ensayo se administra a los animales en solución salina de buffer de fosfato (PBS). Los ratones castrados tratados solo con IgG1 de isotipo similar se usan como control negativo del tratamiento.

15 Los animales de ensayo (12 ratones de cada grupo) se dosifican en un marco de tiempo de 15 semanas por vía subcutánea, por ej., con 60 mg/kg /2 semanas de un compuesto de la presente invención. En cada punto de tiempo de dosificación, la dosis administrada se ajusta de acuerdo con el peso corporal de cada animal. Las siguientes mediciones se registran al inicio y al final del estudio. peso corporal, masa muscular corporal por análisis de resonancia magnética cuantitativa (QMR, Echo Medical Systems, TX) y la fuerza de sujeción corporal (Columbus Instruments, OH).

20 Después del tratamiento de 15 semanas, se determina como indicador de la actividad muscular el peso húmedo del músculo esquelético (cuadriceps) en los grupos de ensayo y se compara con los pesos en el grupo control solo Ig-G castrado. Como indicador de la actividad esquelética, la masa ósea (densidad mineral ósea, DMO, mg/cc) de los huesos femorales de los animales de ensayo se compara de manera similar a la masa ósea de los huesos femorales del grupo sólo IgG castrado, por análisis de tomografía microcomputada (qCT) (Research M, Stratec) El anticuerpo anti-miostatina que comprende el Fab3 tuvo efectos anabólicos tanto sobre el músculo como sobre el hueso en condiciones que se describen en la presente.

**LISTADO DE SECUENCIAS**

- 25 <110> Eli Lilly and company
- <120> Anticuerpos Anti-miostatina
- <130> X-16397
- <140> US 60/559.621
- <141> 2004-04-05
- 30 <150> US 60/555.456
- <151> 2004-03-24
- <160> 56
- <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
- 35 <211> 375
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens

<400> 1

Met Gln Lys Leu Gln Leu Cys Val Tyr Ile Tyr Leu Phe Met Leu Ile  
 1 5 10 15  
 Val Ala Gly Pro Val Asp Leu Asn Glu Asn Ser Glu Gln Lys Glu Asn  
 20 25 30  
 Val Glu Lys Glu Gly Leu Cys Asn Ala Cys Thr Trp Arg Gln Asn Thr  
 35 40 45  
 Lys Ser Ser Arg Ile Glu Ala Ile Lys Ile Gln Ile Leu Ser Lys Leu  
 50 55 60  
 Arg Leu Glu Thr Ala Pro Asn Ile Ser Lys Asp Val Ile Arg Gln Leu  
 65 70 75 80  
 Leu Pro Lys Ala Pro Pro Leu Arg Glu Leu Ile Asp Gln Tyr Asp Val  
 85 90 95  
 Gln Arg Asp Asp Ser Ser Asp Gly Ser Leu Glu Asp Asp Asp Tyr His  
 100 105 110  
 Ala Thr Thr Glu Thr Ile Ile Thr Met Pro Thr Glu Ser Asp Phe Leu  
 115 120 125  
 Met Gln Val Asp Gly Lys Pro Lys Cys Cys Phe Phe Lys Phe Ser Ser  
 130 135 140  
 Lys Ile Gln Tyr Asn Lys Val Val Lys Ala Gln Leu Trp Ile Tyr Leu  
 145 150 155 160

Arg Pro Val Glu Thr Pro Thr Thr Val Phe Val Gln Ile Leu Arg Leu  
 165 170 175  
 Ile Lys Pro Met Lys Asp Gly Thr Arg Tyr Thr Gly Ile Arg Ser Leu  
 180 185 190  
 Lys Leu Asp Met Asn Pro Gly Thr Gly Ile Trp Gln Ser Ile Asp Val  
 195 200 205  
 Lys Thr Val Leu Gln Asn Trp Leu Lys Gln Pro Glu Ser Asn Leu Gly  
 210 215 220  
 Ile Glu Ile Lys Ala Leu Asp Glu Asn Gly His Asp Leu Ala Val Thr  
 225 230 235 240  
 Phe Pro Gly Pro Gly Glu Asp Gly Leu Asn Pro Phe Leu Glu Val Lys  
 245 250 255  
 Val Thr Asp Thr Pro Lys Arg Ser Arg Arg Asp Phe Gly Leu Asp Cys  
 260 265 270  
 Asp Glu His Ser Thr Glu Ser Arg Cys Cys Arg Tyr Pro Leu Thr Val  
 275 280 285  
 Asp Phe Glu Ala Phe Gly Trp Asp Trp Ile Ile Ala Pro Lys Arg Tyr  
 290 295 300  
 Lys Ala Asn Tyr Cys Ser Gly Glu Cys Glu Phe Val Phe Leu Gln Lys  
 305 310 315 320  
 Tyr Pro His Thr His Leu Val His Gln Ala Asn Pro Arg Gly Ser Ala  
 325 330 335  
 Gly Pro Cys Cys Thr Pro Thr Lys Met Ser Pro Ile Asn Met Leu Tyr  
 340 345 350  
 Phe Asn Gly Lys Glu Gln Ile Ile Tyr Gly Lys Ile Pro Ala Met Val  
 355 360 365  
 Val Asp Arg Cys Gly Cys Ser  
 370 375

<210> 2

<211> 109

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 2

Asp Phe Gly Leu Asp Cys Asp Glu His Ser Thr Glu Ser Arg Cys Cys  
 1 5 10 15  
 Arg Tyr Pro Leu Thr Val Asp Phe Glu Ala Phe Gly Trp Asp Trp Ile  
 20 25 30  
 Ile Ala Pro Lys Arg Tyr Lys Ala Asn Tyr Cys Ser Gly Glu Cys Glu  
 35 40 45  
 Phe Val Phe Leu Gln Lys Tyr Pro His Thr His Leu Val His Gln Ala  
 50 55 60  
 Asn Pro Arg Gly Ser Ala Gly Pro Cys Cys Thr Pro Thr Lys Met Ser  
 65 70 75 80  
 Pro Ile Asn Met Leu Tyr Phe Asn Gly Lys Glu Gln Ile Ile Tyr Gly  
 85 90 95  
 Lys Ile Pro Ala Met Val Val Asp Arg Cys Gly Cys Ser  
 100 105

<210> 3

<211> 109

<212> PRT

5 <213> Mus sp.

<400> 3

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Ile Ser Tyr Met  
 20 25 30  
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr  
 35 40 45  
 Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60  
 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu  
 65 70 75 80  
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Tyr Ser Asn Pro Leu Thr  
 85 90 95  
 Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala Asp  
 100 105

<210> 4

ES 2 384 176 T3

<211> 109

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 4

Gln Val Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Leu Gly  
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val His Tyr Met  
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr  
35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu  
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr  
85 90 95

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala Asp  
100 105

5

<210> 5

<211> 109

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 5

10

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr  
35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu  
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr  
85 90 95



Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala Asp  
 100 105

5 <210> 6  
 <211> 109  
 <212> PRT  
 <213> Mus sp.

<400> 6

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
 20 25 30  
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr  
 35 40 45  
 Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60  
 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu  
 65 70 75 80  
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Arg Asn Pro Leu Thr  
 85 90 95  
 Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala Asp  
 100 105

10 <210> 7  
 <211> 109  
 <212> PRT  
 <213> Mus sp.

<400> 7

Gln Val Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Ile Ser Tyr Met  
 20 25 30  
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr  
 35 40 45  
 Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60  
 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu  
 15

```

65              70              75              80
Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Tyr Ser Asn Pro Leu Thr
            85                90
Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala Asp
            100                105
  
```

- <210> 8
- <211> 109
- 5 <212> PRT
- <213> Mus sp.

<400> 8

```

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1               5                10
Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Ile Ser Tyr Met
            20                25                30
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
            35                40                45
Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
            50                55                60
Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
65                70                75                80
Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ser Asn Pro Leu Thr
            85                90
Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala Asp
            100                105
  
```

- 10 <210> 9
- <211> 109
- <212> PRT
- <213> Mus sp.

15 <400> 9

```

Gln Val Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1               5                10
Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Tyr Tyr Met
            20                25                30
His Trp Tyr Gln Gln Arg Ser Gly Ala Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
            35                40                45
  
```

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu  
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Tyr Asn Pro Leu Thr  
85 90 95

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala Asp  
100 105

<210> 10  
<211> 109  
<212> PRT  
<213> Mus sp.

5

<400> 10

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr  
35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu  
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Tyr Ser Asn Pro Leu Thr  
85 90 95

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala Asp  
100 105

<210> 11  
<211> 109  
<212> PRT  
<213> Mus sp.

10

<400> 11

ES 2 384 176 T3

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly  
 1 5 10  
 Glu Glu Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Ile Asn Tyr Met  
 20 25 30  
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr  
 35 40 45  
 Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60  
 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu  
 65 70 75 80  
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ser Asn Pro Leu Thr  
 85 90 95  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala Asp  
 100 105

<210> 12  
 <211> 124  
 <212> PRT  
 <213> Mus sp.

5

<400> 12

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Ser Ser Gln  
 1 5 10 15  
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Leu Ser Gly Phe Ser Leu Arg Thr Ser  
 20 25 30  
 Gly Met Ser Val Ser Trp Ile Arg Gln Ser Ser Gly Lys Gly Leu Glu  
 35 40 45  
 Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ser  
 50 55 60  
 Leu Arg Asn Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Leu Arg Asn Gln Val  
 65 70 75 80  
 Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Gly Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
 85 90 95  
 Cys Ala Arg Arg Ala Ile Thr Thr Val Ile Gly Gly Gly Thr Met Asp  
 100 105 110  
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

10 <210> 13  
 <211> 124  
 <212> PRT  
 <213> Mus sp.

15 <400> 13

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Ser Ser Gln  
 1 5 10 15  
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser  
 20 25 30  
 Gly Met Ser Val Ser Trp Ile Arg Gln Ser Ser Gly Lys Gly Leu Glu  
 35 40 45  
 Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ser  
 50 55 60  
 Leu Arg Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Arg Asn Gln Val  
 65 70 75 80  
 Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
 85 90 95  
 Cys Ala Arg Arg Gly Ile Thr Thr Val Leu Gly Gly Gly Thr Met Asp  
 100 105 110  
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 14  
 <211> 123  
 <212> PRT  
 <213> Mus sp.

5

<400> 14

Gln Val Thr Leu Lys Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Ser Ser Gln Thr  
 1 5 10 15  
 Leu Thr Leu Thr Cys Ser Leu Ser Gly Phe Ser Leu Thr Thr Ser Gly  
 20 25 30  
 Met Ile Val Ser Trp Ile Arg Gln Ser Ser Gly Arg Gly Leu Glu Trp  
 35 40 45  
 Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ser Leu  
 50 55 60  
 Arg Asn Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Leu Arg Asn Gln Val Phe  
 65 70 75 80

Leu Trp. Ile Ser Ser Val Gly Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Arg Ala Ile Thr Thr Val Ile Gly Gly Gly Thr Met Asp Tyr  
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 15  
<211> 124  
<212> PRT  
<213> Mus sp.

5

<400> 15

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Ser Ser Gln  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser  
20 25 30

Gly Met Ser Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu  
35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ser  
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Arg Asn Gln Val  
65 70 75 80

Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
85 90 95

Cys Ala Arg Arg Ala Ile Thr Thr Val Leu Gly Gly Gly Thr Met Asp  
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 16  
<211> 124  
<212> PRT  
<213> Mus sp.

10

<400> 16

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Met Leu Gln Ser Ser Gln  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Leu Ser Gly Phe Ser Leu Arg Thr Ser  
20 25 30

15

Gly Met Ser Val Ser Trp Ile Arg Gln Ser Ser Gly Lys Gly Leu Glu  
 35 40 45  
 Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ser  
 50 55 60  
 Leu Arg Asn Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Leu Arg Asn Gln Val  
 65 70 75 80  
 Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Gly Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
 85 90 95  
 Cys Ala Arg Arg Ala Ile Thr Thr Val Ile Gly Gly Gly Thr Met Asp  
 100 105 110  
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 17  
 <211> 124  
 <212> PRT  
 5 <213> Mus sp.

<400> 17

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln  
 1 5 10 15  
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Leu Ser Gly Phe Ser Leu Arg Thr Ser  
 20 25 30  
 Gly Met Ser Val Ser Trp Ile Arg Gln Ser Ser Gly Lys Gly Leu Glu  
 35 40 45  
 Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Glu Arg Tyr Asn Pro Ser  
 50 55 60  
 Leu Arg Asn Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Leu Arg Asn Gln Val  
 65 70 75 80  
 Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Gly Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
 85 90 95  
 Cys Ala Arg Arg Ala Ile Thr Thr Val Ile Gly Gly Gly Thr Met Asp  
 100 105 110  
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

10 <210> 18  
 <211> 10

<212> PRT  
<213> Mus sp.

<400> 18

5 Ser Ala Ser Ser Ser Val His Tyr Met His  
1 5 10

<210> 20  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Mus sp.

10

<400> 20

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His  
1 5 10

<210> 21  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Mus sp.

15

<400> 21

20

Ser Ala Ser Ser Ser Val Tyr Tyr Met His  
1 5 10

<210> 22  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Mus sp.

25

<400> 22

Ser Ala Ser Ser Ser Ile Asn Tyr Met His  
1 5 10

<210> 23  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Mus sp.

30

35



<400> 23

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser

1

5

5 <210> 24  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Mus sp.

10 <400> 24

Gln Gln Trp Tyr Ser Asn Pro Leu Thr  
1 5

15 <210> 25  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Mus sp.

<400> 25

20 Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr  
1 5

25 <210> 26  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Mus sp.

<400> 26

Gln Gln Trp Ser Arg Asn Pro Leu Thr  
1 5

30 <210> 27  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Mus sp.

35 <400> 27

Gln Gln Trp Asn Ser Asn Pro Leu Thr  
1 5

40 <210> 28  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Mus sp.

<400> 28

Gln Gln Trp Thr Tyr Asn Pro Leu Thr  
1 5

5 <210> 29  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Mus sp.

<400> 29

10 Gly Phe Ser Leu Arg Thr Ser Gly Met Ser Val Ser  
1 5 10

15 <210> 30  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Mus sp.

<400> 30

20 Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met Ser Val Ser  
1 5 10

25 <210> 31  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Mus sp.

<400> 31

Gly Phe Ser Leu Thr Thr Ser Gly Met Ile Val Ser  
1 5 10

30 <210> 32  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Mus sp.

<400> 32

35 His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ser Leu Arg Asn  
1 5 10 15

40 <210> 33  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Mus sp.

<400> 33

His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ser Leu Arg Ser  
 1 5 10 15

5 <210> 34  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Mus sp.  
 <400> 34

His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser  
 1 5 10 15

10 <210> 35  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Mus sp.  
 15 <400> 35

His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Glu Arg Tyr Asn Pro Ser Leu Arg Asn  
 1 5 10 15

20 <210> 36  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Mus sp.  
 <400> 36

Arg Ala Ile Thr Thr Val Ile Gly Gly Gly Thr Met Asp Tyr  
 1 5 10

25 <210> 37  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Mus sp.  
 <400> 37

Arg Gly Ile Thr Thr Val Leu Gly Gly Gly Thr Met Asp Tyr  
 1 5 10

30 <210> 38  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Mus sp.  
 35 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (6)..(6)  
 <223> X es un aminoácido hidrófobo

40

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (7)..(7)  
 <223> X es Ser, Thr, His, Tyr o Asn  
 5  
 <400> 38  
  
**Ser Ala Ser Ser Ser Xaa Xaa Tyr Met His**  
**1 5 10**  
  
 <210> 39  
 10 <211> 109  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 15 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> X es Asp o Asn  
  
 20 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> X es Phe o Leu  
 25  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (11)..(11)  
 30 <223> X es Thr o Ser  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (46)..(46)  
 35 <223> X is Glu or Gln  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (49)..(49)  
 40 <223> X es Phe o Tyr  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (50)..(50)  
 <223> X es Val o Met  
 45  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (52)..(52)  
 <223> X es Leu o Met  
 50  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (62)..(62)  
 <223> X es His o Gln  
 55  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 60

<222> (89)..(89)  
 <223> X is Gly or Asp

<220>  
 5 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (91)..(91)  
 <223> X es Glu o Gln

<220>  
 10 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (100)..(100)  
 <223> X es Ala o Gly

<400> 39

Xaa Xaa Gly Leu Asp Cys Asp Glu His Ser Xaa Glu Ser Arg Cys Cys  
 1 5 10 15

Arg Tyr Pro Leu Thr Val Asp Phe Glu Ala Phe Gly Trp Asp Trp Ile  
 20 25 30

Ile Ala Pro Lys Arg Tyr Lys Ala Asn Tyr Cys Ser Gly Xaa Cys Glu  
 35 40 45

Xaa Xaa Phe Xaa Gln Lys Tyr Pro His Thr His Leu Val Xaa Gln Ala  
 15 50 55 60

Asn Pro Arg Gly Ser Ala Gly Pro Cys Cys Thr Pro Thr Lys Met Ser  
 65 70 75 80

Pro Ile Asn Met Leu Tyr Phe Asn Xaa Lys Xaa Gln Ile Ile Tyr Gly  
 85 90 95

Lys Ile Pro Xaa Met Val Val Asp Arg Cys Gly Cys Ser  
 100 105

<210> 40  
 <211> 109  
 <212> PRT  
 20 <213> Homo sapiens

<400> 40

Asn Leu Gly Leu Asp Cys Asp Glu His Ser Ser Glu Ser Arg Cys Cys  
 1 5 10 15

Arg Tyr Pro Leu Thr Val Asp Phe Glu Ala Phe Gly Trp Asp Trp Ile  
 20 25 30

Ile Ala Pro Lys Arg Tyr Lys Ala Asn Tyr Cys Ser Gly Gln Cys Glu  
 35 40 45

Tyr Met Phe Met Gln Lys Tyr Pro His Thr His Leu Val Gln Gln Ala  
 50 55 60

Asn Pro Arg Gly Ser Ala Gly Pro Cys Cys Thr Pro Thr Lys Met Ser  
 65 70 75 80

Pro Ile Asn Met Leu Tyr Phe Asn Asp Lys Gln Gln Ile Ile Tyr Gly  
 85 90 95

Lys Ile Pro Gly Met Val Val Asp Arg Cys Gly Cys Ser  
 100 105

<210> 41  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 5 <213> Mus sp.

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8)..(8)  
 10 <223> X es Lys, Arg, Glu o Asp

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (15)..(15)  
 15 <223> X es Lys o Arg

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16)..(16)  
 20 <223> X es Ser, Thr, Asn o Gln

<400> 41

His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Xaa Arg Tyr Asn Pro Ser Leu Xaa Xaa  
 1 5 10 15

<210> 42  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 25 <213> Mus sp.

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 30

<222> (2)..(2)  
 <223> X es Ala o Gly

5 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (7)..(7)  
 <223> X is Ile, Leu or Val

<400> 42

10 Arg Xaa Ile Thr Thr Val Xaa Gly Gly Gly Thr Met Asp Tyr  
 1 5 10

<210> 43  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 <213> Mus sp.

15 <400> 43

Ala Asn Tyr Cys Ser Gly Glu Ser Glu Phe Val Phe Leu Gln Lys Tyr  
 1 5 10 15

Pro His Thr His Leu Val His Gln Ala  
 20 25

<210> 44  
 <211> 327  
 <212> ADN  
 <213> Mus sp.

20 <400> 44

caaattgttc tcaccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc 60  
 atgacctgca gtgccagctc aagtataagt tacatgcact ggtaccagca gaagccaggc 120  
 acctcccca aaagatggat ttatgacaca tccaaactgg cttctggagt ccctgctcgc 180  
 ttcagtggca gtgggtctgg gacctcttac tctctcacia tcagcagcat ggaggctgaa 240  
 gatgctgcca cttattactg ccagcagtgg tatagtaacc cactcacgtt cggtgctggg 300

25

accaagctgg agctgaaacg ggctgat 327

<210> 45  
 <211> 372  
 <212> ADN  
 <213> Mus sp.

30 <400> 45

ES 2 384 176 T3

caggttacgc tgaagagtc tggccctggg atattgcagt cctcccagac cctcagtctg 60  
 acttgttctc tctctgggtt ttcactgaga acgtctggta tgagtgtgag ctggattcgt 120  
 cagtcttcag gaaaggtct ggagtggctg gcacacattt attgggatga tgacaagcgc 180  
 tataacccat ccctgaggaa ccgactcaca atctccaagg ataccttgag aaaccaggtc 240  
 ttctcaaga tcaccagtgt gggcactgca gatactgcca catactactg tgctcgaaga 300  
 gctattacta cggtaatagg gggagggact atggactact ggggtcaagg aacctcagtc 360  
 accgtctcct ca 372

5 <210> 46  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 <213> Mus sp.

<400> 46

Ala Asn Tyr Cys Ser Gly Glu Cys Glu Phe Val Phe Leu Gln Lys Tyr  
 1 5 10 15

Pro His Thr His Leu Val His Gln Ala  
 20 25

10 <210> 47  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Mus sp.

15 <400> 47

Gly Phe Ser Leu Arg Thr Ser Gly Ser Ser Val Ser  
 1 5 10

20 <210> 48  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Mus sp.

<400> 48

Gly Phe Ser Leu Arg Lys Ser Gly Met Ser Val Ser  
 1 5 10

30 <210> 49  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Mus sp.

<400> 49



Gly Phe Ser Leu Arg Thr Val Gly Met Ser Val Ser  
1 5 10

5 <210> 50  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Mus sp.

<400> 50

Gly Phe Ser Leu Arg Thr Leu Gly Met Ser Val Ser  
1 5 10

10 <210> 51  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Mus sp.

<400> 51

Gly Phe Ser Leu Arg Thr Leu Gly Ser Ser Val Ser  
1 5 10

20 <210> 52  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Mus sp.

<400> 52

Gly Phe Ser Leu Arg Lys Val Gly Ser Ser Val Ser  
1 5 10

25 <210> 53  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Mus sp.

30 <400> 53

Gly Phe Ser Leu Arg Lys Leu Gly Ser Ser Val Ser  
1 5 10

35 <210> 54  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Mus sp.

<400> 54

Gly Phe Ser Leu Arg Lys Ser Gly Ser Ser Val Ser  
1 5 10

40

<210> 55  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Mus sp.  
 5  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5)..(5)  
 <223> X is Arg, Lys, Thr or Ser  
 10  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (6)..(6)  
 <223> X is Thr or Lys  
 15  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (7)..(7)  
 <223> X is ser, Val or Leu  
 20  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (9)..(9) or Ser  
 <223> X is Met or ser  
 25  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (10)..(10)  
 <223> X is ser, Thr, Ile, Leu or Val

Gly Phe Ser Leu Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Val Ser  
 1 5 10  
 30 <400> 55

<210> 56  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Mus sp.  
 35  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> X is Tyr, ser, Asn or Thr  
 40  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5)..(5)  
 <223> X is Arg, Lys, Tyr, ser or Thr  
 45  
 <400> 56

Gln Gln Trp Xaa Xaa Asn Pro Leu Thr  
 1 5  
 50

## REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal anti-miostatina o un fragmento funcional del mismo que se une específicamente a un polipéptido que consiste en aminoácidos 40-64 de una forma madura de miostatina humana como se muestra en la SEC ID NO: 46:

Ala Asn Tyr Cys Ser Gly Glu Cys Glu Phe Val Phe Leu Gln Lys Tyr

Pro His Thr His Leu Val His Gln Ala

5

2. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1, o un fragmento funcional del mismo, que es inhibido competitivamente de unirse a la miostatina humana madura por un anticuerpo monoclonal que comprende dos polipéptidos con secuencias seleccionadas de:

(i) SEC ID NOs: 3 y 2,

10 (ii) SEC ID NOs: 4 y 13,

(iii) SEC ID NOs: 3 y 14,

(iv) SEC ID NOs: 5 y 12,

(v) SEC ID NOs: 6 y 15,

(vi) SEC NOs: 7 y 17,

15 (vii) SECs ID NOs: 8 y 12,

(viii) SECs ID NOs: 9 y 16,

(ix) SECs ID NOs: 10 y 12, y

(x) SEC ID NOs: 11 y 12.

3. El anticuerpo monoclonal, o un fragmento funcional del mismo, de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 que se une a la miostatina con al menos 20 veces más de afinidad que con la que se une al GDF-11.

4. El anticuerpo monoclonal, o un fragmento funcional del mismo, de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que comprende un péptido en la CDR1 de la LCVR con la secuencia como se muestra en la SEC ID NO: 18, un péptido en la CDR2 de la LCVR, con la secuencia como se muestra en la SEC ID NO: 23, un péptido en la CDR3 de la LCVR, con la secuencia como se muestra en la SEC ID NO: 24, un péptido en la CDR1 de la HCVR, con la secuencia como se muestra en la SEC ID NO: 29, un péptido en la CDR2 de la HCVR, con la secuencia como se muestra en la SEC ID NO: 32, y un péptido en la CDR3 de la HCVR, con la secuencia como se muestra en la SEC ID NO: 36.

5. El anticuerpo monoclonal, o un fragmento funcional del mismo, de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que comprende un péptido en la CDR1 de la LCVR con la secuencia como se muestra en la SEC ID NO: 19, un péptido en la CDR2 de la LCVR, con la secuencia como se muestra en la SEC ID NO: 23, un péptido en la CDR3 de la LCVR, con la secuencia como se muestra en la SEC ID NO: 25, un péptido en la CDR1 de la HCVR, con la secuencia como se muestra en la SEC ID NO: 30, un péptido en la CDR2 de la HCVR, con la secuencia como se muestra en la SEC ID NO: 33, y un péptido en la CDR3 de la HCVR, con la secuencia como se muestra en la SEC ID NO: 37.

6. El anticuerpo monoclonal, o un fragmento funcional del mismo, de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que comprende un péptido en la CDR1 de la LCVR con la secuencia como se muestra en la SEC ID NO: 18, un péptido en la CDR2 de la LCVR, con la secuencia como se muestra en la SEC ID NO: 23, un péptido en la CDR3 de la LCVR, con la secuencia como se muestra en la SEC ID NO: 24, un péptido en la CDR1 de la HCVR, con la secuencia como se muestra en la SEC ID NO: 31, un péptido en la CDR2 de la HCVR, con la secuencia como se muestra en la SEC ID NO: 32, y un péptido en la CDR3 de la HCVR, con la secuencia como se muestra en la SEC ID NO: 36.

7. El anticuerpo monoclonal, o un fragmento funcional del mismo, de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que comprende un péptido en la CDR1 de la LCVR con la secuencia como se muestra en la SEC ID NO: 20, un péptido en la CDR2 de la LCVR, con la secuencia como se muestra en la SEC ID NO: 23, un péptido en la CDR3 de la LCVR, con la secuencia como se muestra en la SEC ID NO: 25, un péptido en la CDR1 de la HCVR, con la secuencia como se muestra en la SEC ID NO: 29, un péptido en la CDR2 de la HCVR, con la secuencia como se muestra en la SEC ID NO: 32, y un péptido en la CDR3 de la HCVR, con la secuencia como se muestra en la SEC ID NO: 36.

45

- 5 **8.** El anticuerpo monoclonal, o un fragmento funcional del mismo, de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que comprende un péptido en la CDR1 de la LCVR con la secuencia como se muestra en la SEC ID NO: 20, un péptido en la CDR2 de la LCVR, con la secuencia como se muestra en la SEC ID NO: 23, un péptido en la CDR3 de la LCVR, con la secuencia como se muestra en la SEC ID NO: 26, un péptido en la CDR1 de la HCVR, con la secuencia como se muestra en la SEC ID NO: 30, un péptido en la CDR2 de la HCVR, con la secuencia como se muestra en la SEC ID NO: 34, y un péptido en la CDR3 de la HCVR, con la secuencia como se muestra en la SEC ID NO: 36.
- 10 **9.** El anticuerpo monoclonal, o un fragmento funcional del mismo, de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que comprende un péptido en la CDR1 de la LCVR con la secuencia como se muestra en la SEC ID NO: 18, un péptido en la CDR2 de la LCVR, con la secuencia como se muestra en la SEC ID NO: 23, un péptido en la CDR3 de la LCVR, con la secuencia como se muestra en la SEC ID NO: 24, un péptido en la CDR1 de la HCVR, con la secuencia como se muestra en la SEC ID NO: 29, un péptido en la CDR2 de la HCVR, con la secuencia como se muestra en la SEC ID NO: 35, y un péptido en la CDR3 de la HCVR, con la secuencia como se muestra en la SEC ID NO: 36.
- 15 **10.** El anticuerpo monoclonal, o un fragmento funcional del mismo, de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que comprende un péptido en la CDR1 de la LCVR con la secuencia como se muestra en la SEC ID NO: 18, un péptido en la CDR2 de la LCVR, con la secuencia como se muestra en la SEC ID NO: 23, un péptido en la CDR3 de la LCVR, con la secuencia como se muestra en la SEC ID NO: 27, un péptido en la CDR1 de la HCVR, con la secuencia como se muestra en la SEC ID NO: 29, un péptido en la CDR2 de la HCVR, con la secuencia como se muestra en la SEC ID NO: 32, y un péptido en la CDR3 de la HCVR, con la secuencia como se muestra en la SEC ID NO: 36.
- 20 **11.** El anticuerpo monoclonal, o un fragmento funcional del mismo, de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que comprende un péptido en la CDR1 de la LCVR con la secuencia como se muestra en la SEC ID NO: 21, un péptido en la CDR2 de la LCVR, con la secuencia como se muestra en la SEC ID NO: 23, un péptido en la CDR3 de la LCVR, con la secuencia como se muestra en la SEC ID NO: 28, un péptido en la CDR1 de la HCVR, con la secuencia como se muestra en la SEC ID NO: 29, un péptido en la CDR2 de la HCVR, con la secuencia como se muestra en la SEC ID NO: 32, y un péptido en la CDR3 de la HCVR, con la secuencia como se muestra en la SEC ID NO: 36.
- 25 **12.** El anticuerpo monoclonal, o un fragmento funcional del mismo, de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que comprende un péptido en la CDR1 de la LCVR con la secuencia como se muestra en la SEC ID NO: 20, un péptido en la CDR2 de la LCVR, con la secuencia como se muestra en la SEC ID NO: 23, un péptido en la CDR3 de la LCVR, con la secuencia como se muestra en la SEC ID NO: 24, un péptido en la CDR1 de la HCVR, con la secuencia como se muestra en la SEC ID NO: 29, un péptido en la CDR2 de la HCVR, con la secuencia como se muestra en la SEC ID NO: 32, y un péptido en la CDR3 de la HCVR, con la secuencia como se muestra en la SEC ID NO: 36.
- 30 **13.** El anticuerpo monoclonal, o un fragmento funcional del mismo, de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que comprende un péptido en la CDR1 de la LCVR con la secuencia como se muestra en la SEC ID NO: 22, un péptido en la CDR2 de la LCVR, con la secuencia como se muestra en la SEC ID NO: 23, un péptido en la CDR3 de la LCVR, con la secuencia como se muestra en la SEC ID NO: 27, un péptido en la CDR1 de la HCVR, con la secuencia como se muestra en la SEC ID NO: 29, un péptido en la CDR2 de la HCVR, con la secuencia como se muestra en la SEC ID NO: 32, y un péptido en la CDR3 de la HCVR, con la secuencia como se muestra en la SEC ID NO: 36.
- 35 **14.** El anticuerpo monoclonal de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 en el que el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo de longitud total, un anticuerpo sustancialmente intacto, un fragmento Fab, un fragmento F(ab')<sub>2</sub> o un fragmento Fv de cadena simple.
- 40 **15.** El anticuerpo monoclonal o un fragmento funcional del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 en el que el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo quimérico.
- 45 **16.** El anticuerpo monoclonal o un fragmento funcional del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 en el que el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo humanizado.
- 50 **17.** El anticuerpo monoclonal o un fragmento funcional del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 en el que la región constante presente en el anticuerpo se origina a partir del genoma de un animal que se selecciona de animales domésticos, animales para el deporte y animales fuente de alimentación.
- 18.** Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o un fragmento funcional del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 y un portador aceptable para uso farmacéutico.
- 55 **19.** El anticuerpo monoclonal o un fragmento funcional del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 para uso como medicamento.

- 5
- 20.** El anticuerpo monoclonal, o un fragmento funcional del mismo, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 para su uso en la prevención o el tratamiento de pérdida de masa muscular, miopatía, distrofia muscular, debilidad muscular, fragilidad, caquexia, insuficiencia o enfermedad renal, insuficiencia o enfermedad hepática, insuficiencia o enfermedad cardíaca, diabetes tipo II, síndrome metabólico osteoporosis, obesidad, o TPOC en un humano.
- 21.** Un anticuerpo monoclonal, o un fragmento funcional del mismo, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 para su uso para incrementar la masa muscular en un mamífero.

Figura 1 – Promiostatina

```

1   MQKLQLCVYI YLFMLIVAGP VDLNENSEQK ENVEKEGLCN 40
41  ACTWRQNTKS SRIEAIKIQI LSKLRLETAP NISKDVIRQL 80
81  LPKAPPLREL IDQYDVQRDD SSDGSLEDDD YHATTETIIT 120
121 MPTESDFLMQ VDGKPKCCFF KFSSKIQYNK VVKAQLWIYL 160
161 RPVETPTTVF VQILRLIKPM KDGTRYTGIR SLKLDMNPQT 200
201 GIWQSIDVKT VLQNWLKQPE SNLGIEIKAL DENGHD LAVT 240
241 FPGPGEDGLN PFLEVKVTDT PKRSRRDFGL DCDEHSTESR 280
281 CCRYPLTVDF EAFGWDWIIA PKRYKANYCS GECEFVFLQK 320
321 YPHTHLVHQA NPRGSAGPCC TPTKMSPINM LYFNGKEQII 360
361 YGKIPAMVVD RCGCS 376 (SEQ ID NO:1)

```

Figura 2 – Miostatina madura (humana, murina, rata, pollo)

```

1   DFGLDCDEHS TESRCCRYPL TVDFEAFGWD WIIAPKRYKA 40
41  NYCSGECEFV FLQKYPHTHL VHQANPRGSA GPCCTPTKMS 80
81  PINMLYFNGK EQIIYGKIPA MVVDRCGCS 109 (SEC ID NO:2)

```

5 Figura 3 - Homología de miostatina con GDF-11

```

Myostatin DFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYK
Consensus -+GLDCDEHS+ESRCCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYK
GDF-11     NLGLDCDEHSSESRCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYK

```

```

Myostatin ANYCSGECEFVFLQKYPHTHLVHQANPRGSAGPCCTPTK
Consensus ANYCSG+CE++F+QKYPHTHLV-QANPRGSAGPCCTPTK
GDF-11    ANYCSGQCEYMFMQKYPHTHLVQQANPRGSAGPCCTPTK

```

```

Myostatin MSPINMLYFNGKEQIIYGKIPAMVVDRCGCS 109 (SEC ID NO: 2)
Consensus MSPINMLYFN-K+QIIYGKIP+MVVDRCGCS (SEC ID NO: 39)
GDF-11    MSPINMLYFNDKQQIIYGKIPGMVVDRCGCS 108 (SEC ID NO: 40)

```

Figura 4 – Alineamiento de región variable de cadena liviana de Fab

<u>FAb</u>	1		<u>CDR1</u>	40
3	QIVLTQSPAI	MSASPGEKVT	MTCSASSSIS	YMHWYQQKPG
5	QVVLTLQSPAI	MSASLGEKVT	MTCSASSSVH	YMHWYQQKSG
7	QIVLTQSPAI	MSASPGEKVT	MTCSASSSIS	YMHWYQQKPG
8	QIVLTQSPAI	MSASPGEKVT	MTCSASSSVS	YMHWYQQKSG
9	QIVLTQSPAI	MSASPGEKVT	MTCSASSSVS	YMHWYQQKSG
10	QVVLTLQSPAI	MSASPGEKVT	MTCSASSSIS	YMHWYQQKPG
11	QIVLTQSPAI	MSASPGEKVT	MTCSASSSIS	YMHWYQQKPG
12	QVVLTLQSPAI	MSASPGEKVT	MTCSASSSVY	YMHWYQQRSG
14	QIVLTQSPAI	MSASPGEKVT	MTCSASSSVS	YMHWYQQKPG
15	QIVLTQSPAI	MSASPGEKVT	MTCSASSSIN	YMHWYQQKSG
	*	* *	**	**
<u>FAb</u>	41	<u>CDR2</u>		80
3	TSPKRWIYDT	SKLASGVPAR	FSGSGSGTSY	SLTISSMEAE
5	TSPKRWIYDT	SKLASGVPAR	FSGSGSGTSY	SLTISSMEAE
7	TSPKRWIYDT	SKLASGVPAR	FSGSGSGTSY	SLTISSMEAE
8	TSPKRWIYDT	SKLASGVPAR	FSGSGSGTSY	SLTISSMEAE
9	TSPKRWIYDT	SKLASGVVPR	FSGSGSGTSY	SLTISSMEAE
10	TSPKRWIYDT	SKLASGVPAR	FSGSGSGTSY	SLTISSMEAE
11	TSPKRWIYDT	SKLASGVPAR	FSGSGSGTSY	SLTISSMEAE
12	ASPKRWIYDT	SKLASGVPAR	FSGSGSGTSY	SLTISSMEAE
14	TSPKRWIYDT	SKLASGVPAR	FSGSGSGTSY	SLTISSMEAE
15	TSPKRWIYDT	SKLASGVPAR	FSGSGSGTSY	SLTISSMEAE
	*			
<u>FAb</u>	81	<u>CDR3</u>	108	
3	DAATYYCQQW	YSNPLTFGAG	TKLELKRAD	(SEC ID NO: 3)
5	DAATYYCQQW	SSNPLTFGAG	TKLELKRAD	(SEC ID NO: 4)
7	DAATYYCQQW	YSNPLTFGAG	TKLELKRAD	(SEC ID NO: 3)
8	DAATYYCQQW	SSNPLTFGAG	TKLELKRAD	(SEC ID NO: 5)
9	DAATYYCQQW	SRNPLTFGAG	TKLELKRAD	(SEC ID NO: 6)
10	DAATYYCQQW	YSNPLTFGAG	TKLELKRAD	(SEC ID NO: 7)
11	DAATYYCQQW	NSNPLTFGAG	TKLELKRAD	(SEC ID NO: 8)
12	DAATYYCQQW	TYNPLTFGAG	TKLELKRAD	(SEC ID NO: 9)
14	DAATYYCQQW	YSNPLTFGAG	TKLELKRAD	(SEC ID NO: 10)
15	DAATYYCQQW	NSNPLTFGGG	TKLELKRAD	(SEC ID NO: 11)
		**	*	

Figura5 – Alineamiento de región variable de cadena pesada de Fab

<u>FAb</u>	1			<u>CDR1</u>	40
3	QVTLKESGPG	ILQSSQTL	SL	TCSLSGFSLR	TSGMSVSWIR
5	QVTLKESGPG	ILQSSQTL	SL	TCSFSGFSL	TSGMSVSWIR
7	QVTLK-SGPG	ILQSSQTL	LTL	TCSLSGFSLT	TSGMIVSWIR
8	QVTLKESGPG	ILQSSQTL	SL	TCSLSGFSLR	TSGMSVSWIR
9	QVTLKESGPG	ILQSSQTL	SL	TCSVSGFSL	TSGMSVSWIR
10	QVTLKESGPG	ILQPSQTL	SL	TCSLSGFSLR	TSGMSVSWIR
11	QVTLKESGPG	ILQSSQTL	SL	TCSLSGFSLR	TSGMSVSWIR
12	QVTLKESGPG	MLQSSQTL	SL	TCSLSGFSLR	TSGMSVSWIR
14	QVTLKESGPG	ILQSSQTL	SL	TCSLSGFSLR	TSGMSVSWIR
15	QVTLKESGPG	ILQSSQTL	SL	TCSLSGFSLR	TSGMSVSWIR
		*	*	*	*

<u>FAb</u>	41		<u>CDR2</u>		80
3	QSSGKGLEWL	AHIYWDDDKR	YNPSLRNRLT	ISKDTLRNQV	
5	QSSGKGLEWL	AHIYWDDDKR	YNPSLRSRLT	ISKDTSRNQV	
7	QSSGRGLEWL	AHIYWDDDKR	YNPSLRNRLT	ISKDTLRNQV	
8	QSSGKGLEWL	AHIYWDDDKR	YNPSLRNRLT	ISKDTLRNQV	
9	QPSGKGLEWL	AHIYWDDDKR	YNPSLKSRLT	ISKDTSRNQV	
10	QSSGKGLEWL	AHIYWDDDER	YNPSLRNRLT	ISKDTLRNQV	
11	QSSGKGLEWL	AHIYWDDDKR	YNPSLRNRLT	ISKDTLRNQV	
12	QSSGKGLEWL	AHIYWDDDKR	YNPSLRNRLT	ISKDTLRNQV	
14	QSSGKGLEWL	AHIYWDDDKR	YNPSLRNRLT	ISKDTLRNQV	
15	QSSGKGLEWL	AHIYWDDDKR	YNPSLRNRLT	ISKDTLRNQV	
		*	*	**	*

<u>FAb</u>	81		<u>CDR3</u>	
3	FLKITSVGTADTATYYCARRA	ITTVIGGGTMDYWGQGTSVTVSS		
5	FLKITSVDTADTATYYCARRG	ITTVLGGGTMDYWGQGTSVTVSS		
7	FLWISSVGTADTATYYCARRA	ITTVIGGGTMDYWGQGTSVTVSS		
8	FLKITSVGTADTATYYCARRA	ITTVIGGGTMDYWGQGTSVTVSS		
9	FLKITSVDTADTATYYCARRA	ITTVLGGGTMDYWGQGTSVTVSS		
10	FLKITSVGTADTATYYCARRA	ITTVIGGGTMDYWGQGTSVTVSS		
11	FLKITSVGTADTATYYCARRA	ITTVIGGGTMDYWGQGTSVTVSS		
12	FLKITSVGTADTATYYCARRA	ITTVIGGGTMDYWGQGTSVTVSS		
14	FLKITSVGTADTATYYCARRA	ITTVIGGGTMDYWGQGTSVTVSS		
15	FLKITSVGTADTATYYCARRA	ITTVIGGGTMDYWGQGTSVTVSS		
		* * *	*	*

- 3 (SEC ID NO: 12)
- 5 (SEC ID NO: 13)
- 5 7 (SEC ID NO: 14)
- 8 (SEC ID NO: 12)
- 9 (SEC ID NO: 15)
- 10 (SEC ID NO: 17)
- 11 (SEC ID NO: 12)
- 10 12 (SEC ID NO: 16)
- 14 (SEC ID NO: 12)
- 15 (SEC ID NO: 12)