

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 404 941**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/22** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.08.2007 E 07841245 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2013 EP 2066695**

54 Título: **Anticuerpos anti-miostatina**

30 Prioridad:

**05.09.2006 US 824498 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**29.05.2013**

73 Titular/es:

**ELI LILLY AND COMPANY (100.0%)  
LILLY CORPORATE CENTER  
INDIANAPOLIS, IN 46285, US**

72 Inventor/es:

**HUANG, LIHUA y  
SAYERS, ROBERT, OWEN**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 404 941 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**

5 La presente invención pertenece al campo de la medicina, particularmente al campo de anticuerpos monoclonales contra miostatina. Más específicamente, la presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales anti-miostatina que se unen preferentemente a miostatina sobre GDF-11 y son resistentes a la escisión proteica, y al uso de los anticuerpos para el tratamiento, profilaxis o diagnóstico de diversos trastornos o afecciones en mamíferos y especies aviares.

**Antecedentes de la invención**

10 La miostatina, también mencionada como factor 8 de diferenciación del crecimiento (GDF-8), es un miembro de la superfamilia de proteínas TGF- $\beta$ , que comparte similitudes estructurales con otros miembros de la familia TGF- $\beta$ . La miostatina se expresa en gran medida en el músculo esquelético en desarrollo y adulto y funciona como regulador negativo del músculo esquelético. La miostatina también puede estar implicada en otros procesos fisiológicos incluyendo la diferenciación de preadipocitos en adipocitos y, indirectamente, con la homeostasis de la glucosa y la inhibición de la formación de huesos.

15 El factor 11 de diferenciación del crecimiento, también conocido como GDF-11 o BMP-11, es el miembro de la superfamilia de proteínas TGF- $\beta$  que es el más homólogo a miostatina. La secuencia de aminoácidos de las formas maduras de miostatina humana y GDF-11 son aproximadamente un 90% idénticas; sin embargo, GDF-11 se expresa en una gama más amplia de tejidos que la miostatina, incluyendo la pulpa dental, cerebro, corazón, riñón y pulmón así como tejido muscular y adiposo. Recientemente se ha descubierto que GDF-11 humano gobierna las ventanas temporales durante las cuales los progenitores multipotentes retienen la competencia para producir distinta descendencia neural.

20 Existe la necesidad terapéutica de inhibir específicamente una actividad miostatina inhibiendo mínimamente al mismo tiempo una actividad de otras proteínas de la superfamilia TGF- $\beta$ , particularmente GDF-11. Además, existe la necesidad de diagnóstico de un anticuerpo anti-miostatina que reaccione de forma cruzada mínimamente con otra proteína de la superfamilia TGF- $\beta$ , particularmente GDF-11, para controlar de forma más precisa o determinar los niveles de miostatina en una muestra. Los anticuerpos anti-miostatina que se unen preferentemente a miostatina sobre GDF-11 se desvelan en la publicación internacional número WO 2005/094446. Los anticuerpos monoclonales humanizados que se unen preferentemente a miostatina sobre GDF-11 se desvelan en la publicación internacional número WO 2007/044411.

25 Los anticuerpos terapéuticos pueden someterse a una diversidad de reacciones de degradación, por ejemplo, desamidación o escisión, que pueden suceder in vivo o durante la fabricación, formulación, almacenamiento y uso terapéutico. Por ejemplo, los restos de asparagina (Asn) en anticuerpos u otros polipéptidos son particularmente susceptibles a escisión en solución acuosa. Por tanto, existe la necesidad de un anticuerpo anti-miostatina que se una preferentemente a miostatina sobre GDF-11, tenga una fuerte afinidad de unión por miostatina (es decir, no mayor de aproximadamente  $3 \times 10^{-8}$  M) y sea resistente a degradación química.

**Sumario de la invención**

30 Los anticuerpos de la invención se unen preferentemente a miostatina sobre GDF-11, es decir, son significativamente menos reactivos con GDF-11 que con miostatina. Un anticuerpo de la invención se une a miostatina al menos aproximadamente 2, 3, 5, 10, 20, 22, ó 25 veces más de lo que se une a GDF-11 medido por una técnica en la materia, por ejemplo, por ELISA de competición, o por ensayo BIACORE o KINEXA para demostrar la mayor afinidad (es decir, inferior  $K_D$ ) del anticuerpo por GDF-8 que GDF-11. Más preferentemente, los anticuerpos de la invención no se unen a GDF-11 por encima de los niveles umbral en el ensayo de unión usado.

35 La presente invención abarca un anticuerpo monoclonal anti-miostatina que se une preferentemente a miostatina sobre el factor 11 de diferenciación del crecimiento (GDF-11), en el que dicho anticuerpo se une a miostatina con una afinidad no superior a aproximadamente  $3 \times 10^{-8}$  M y en el que al menos el 98% del anticuerpo monoclonal no se escinde cuando está presente durante un año a 4°C, seis meses a 25°C, dos meses a 37°C o cuatro semanas a 40°C en una solución de anticuerpo. Una solución ejemplar de anticuerpo comprende 1 mg/ml de un anticuerpo de la invención, fosfato 10 mM, pH 7,4, y NaCl 150 mM. Preferentemente, los anticuerpos de la invención se caracterizan adicionalmente porque tienen una  $Cl_{50}$  de menos de 25 nM, en el ensayo in vitro de miostatina/indicador SBE descrito en el Ejemplo 4 en el presente documento.

40 En una realización, un anticuerpo de la invención es resistente a degradación química, es decir, el 100%, 99%, 98%, 97%, 96%, ó 95% de los anticuerpos no se escinden, cuando están presentes en una solución de anticuerpo durante un tiempo y temperatura seleccionados entre el grupo que consiste en: un año a 4°C, seis meses a 25°C, dos meses a 37°C o cuatro semanas a 40°C en una solución de anticuerpo. Un tiempo y temperatura preferidos es cuatro semanas a 40°C.

En una realización, los anticuerpos de la invención se caracterizan adicionalmente porque se unen a miostatina dentro del dominio que abarca los aminoácidos 40-64 [ANYCSGECFVFLQKYPHTHLVHQA (SEC ID N° 29) para seres humanos], 43-57 [CSGECFVFLQKYPH (SEC ID N° 30) para seres humanos] o 45-59 [GECFVFLQKYPHTH (SEC ID N° 31) para seres humanos] de miostatina madura. En otra realización, los anticuerpos de la invención se caracterizan adicionalmente porque se unen a un polipéptido que consta de los aminoácidos 40-64, 43-57 ó 45-59 de miostatina madura.

De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un anticuerpo de la invención que comprende una HCVR y un LCVR, en el que dicha HCVR comprende un péptido en CDRH1 con una secuencia mostrada en la SEC ID N° 24, un péptido en CDRH2 con la secuencia mostrada en la SEC ID N° 26, y un péptido en CDRH3 con la secuencia mostrada en la SEC ID N° 28, y en el que dicha LCVR comprende un péptido en CDRL1 con la secuencia mostrada en la SEC ID N° 13, un péptido en CDRL2 con la secuencia mostrada en la SEC ID N° 14, y un péptido en CDRL3 con la secuencia seleccionada entre las SEC ID N° 21, y 22.

En una realización, un anticuerpo de la invención comprende adicionalmente una región constante, en el que dicha región constante se origina a partir del genoma humano o el genoma de un animal seleccionado entre animales domésticos, animales para deportes y animales como fuente de alimento.

En otra realización, un anticuerpo monoclonal de la invención comprende una HCVR con una secuencia mostrada en la SEC ID N° 12 y una LCVR con una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en las SEC ID N° 9 y 10.

En una realización más preferida, un anticuerpo de la invención comprende una cadena ligera con una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 32 y una cadena pesada con una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 33.

De acuerdo con un aspecto adicional, la invención proporciona una composición (por ejemplo, una composición farmacéutica) que comprende un anticuerpo de la invención. La composición de la invención puede comprender adicionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable. En dicha composición, el anticuerpo de la invención es el principio activo. Preferentemente, la composición comprende una población homogénea o sustancialmente homogénea de un anticuerpo anti-miostatina de la invención. La composición para uso terapéutico o profiláctico es estéril, puede liofilizarse, y se suministra preferentemente con un diluyente apropiado.

La invención proporciona un procedimiento para inhibir al menos una actividad biológica de miostatina en un animal, preferente un mamífero o especie aviar, preferentemente un ser humano, que lo necesite, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz o una cantidad profilácticamente eficaz de un anticuerpo monoclonal anti-miostatina de la invención a dicho mamífero o especie aviar. La invención proporciona adicionalmente un procedimiento para potenciar la masa muscular o tratar o prevenir una enfermedad o trastorno o afección mejorada por la neutralización o antagonismo de una bioactividad de miostatina que comprende administrar a un paciente (por ejemplo, un ser humano) que necesite dicho tratamiento o prevención una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un anticuerpo de la invención.

La invención abarca un anticuerpo de la invención para su uso en terapia.

Adicionalmente se proporciona un anticuerpo de la presente invención para su uso en el tratamiento o prevención de pérdida muscular, debilidad, sarcopenia relacionada con la edad, atrofia por desuso o caquexia.

La invención abarca el uso de un anticuerpo de la invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento de pérdida muscular, debilidad, sarcopenia relacionada con la edad, atrofia por desuso y caquexia.

La invención abarca el uso de un anticuerpo de la invención para la preparación de un medicamento para la prevención de pérdida muscular, debilidad, sarcopenia relacionada con la edad, atrofia por desuso y caquexia.

La invención abarca el procedimiento para tratar la pérdida muscular, debilidad, sarcopenia relacionada con la edad, atrofia por desuso y caquexia en un mamífero, preferentemente un ser humano, en necesidad del mismo administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de la invención.

De acuerdo con la presente invención, también se proporciona un anticuerpo para su uso en el aumento de la masa muscular en un sujeto que lo necesite.

La invención abarca el procedimiento de prevenir la pérdida muscular, debilidad, sarcopenia relacionada con la edad, atrofia por desuso y caquexia en un mamífero, preferentemente un ser humano, que lo necesite administrando una cantidad profilácticamente eficaz de un anticuerpo de la invención.

### **Breve descripción de los dibujos**

La Fig. 1A muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de la forma madura de miostatina humana y GDF-11 humano con el epítipo antigénico de Mab 510C2 y C12 y sus variantes subrayadas y los restos dentro del epítipo antigénico que difieren entre miostatina y GDF-11 en letra negra.

La Fig. 1B enumera los epítomos antigénicos a los que se unen los Mab 510C2 y C12 y sus variantes.

Las Fig. 2A y B muestran las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de los Mab precursores 510C2 y C12 respectivamente, así como varias variantes, incluyendo dominios CDR y regiones flanqueantes. Los dominios CDR están en letra negrita y las variaciones en los dominios CDR están subrayadas.

La Fig. 3 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de los dominios CDR de los Mab precursores 510C2 y C12 y anticuerpos desvelados. Las variaciones están en letra negrita y subrayadas.

La Fig. 4 enumera las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera y cadena pesada de un anticuerpo monoclonal de la invención, es decir, N93H-C12.

Las Fig. 5A y B comparan la afinidad de unión de ciertos anticuerpos monoclonales con la de su anticuerpo precursor determinada por ELISA.

## **Descripción detallada de la invención**

### Definiciones

Cuando se usa en el presente documento, la expresión "miostatina madura" (véase la SEC ID N° 1 para especies humana, murina, de rata, pollo, pavo, canina, equina y porcina) se refiere a la forma monomérica u homodimérica de la proteína resultante después de escisión proteolítica, es decir, para seres humanos en Arg 266 de la forma proproteica de 375 aminoácidos de miostatina. Cuando se usa en el presente documento, el término "miostatina", se refiere a miostatina madura salvo que se indique de otro modo en el presente documento.

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

Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda y se caracterizan por una región constante particular conocida en la técnica. Cada tipo de cadena pesada está caracterizada por una región constante particular conocida en la técnica. IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>4</sub> son isotipos preferidos para anticuerpos de la invención. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de cadena pesada N-terminal (en el presente documento "HCVR") y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada está compuesta por 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 ligera está compuesta por una región variable de cadena ligera (en el presente documento "LCVR") y una región constante de cadena ligera, CL. Las regiones HCVR y LCVR pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, llamadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, llamadas regiones flanqueantes (FR). Cada HCVR y LCVR está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas de amino-terminal a carboxi-terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, y FR4. En el presente documento, las 3 CDR de la cadena pesada se mencionan como "CDRH1, CDRH2, y CDRH3" y las 3 CDR de la cadena ligera se mencionan como "CDRL1, CDRL2, y CDRL3". Las CDR contienen la mayoría de los restos que forman interacciones específicas con el antígeno. La asignación de aminoácidos a cada dominio es de acuerdo a convenciones bien conocidas [Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)]. La capacidad funcional de un anticuerpo de unirse a un antígeno particular está en gran medida influenciada por las seis CDR.

El término "anticuerpo", en referencia a un anticuerpo monoclonal anti-miostatina de la invención (o simplemente, "anticuerpo monoclonal de la invención" o "anticuerpo de la invención"), como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo monoclonal. Un "anticuerpo monoclonal" o "Mab" como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo completamente humano, salvo que se indique otra cosa en el presente documento. Preferentemente, un anticuerpo monoclonal de la invención existe en una población homogénea o sustancialmente homogénea. Los anticuerpos monoclonales de la invención pueden producirse usando técnicas de hibridoma bien conocidas en la técnica, así como tecnologías recombinantes, tecnologías de presentación en fagos, tecnologías sintéticas o combinaciones de dichas tecnologías u otras tecnologías fácilmente conocidas en la técnica. "Anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que se obtiene de una única copia o clon, incluyendo, por ejemplo, cualquier clon eucariota, procariota o fágico, y no al procedimiento por el cual se produce. Un "anticuerpo monoclonal" puede ser un anticuerpo intacto (que comprende una región Fc completa o de longitud completa), un anticuerpo sustancialmente intacto, o una parte o fragmento de un anticuerpo que comprende una parte de unión a antígeno, por ejemplo, un fragmento Fab, fragmento Fab' o fragmento F(ab')<sub>2</sub> de un anticuerpo quimérico, humanizado o humano.

Las regiones variables de cada par de cadenas ligera/pesada forman los sitios de unión a antígeno del anticuerpo. Por tanto, un anticuerpo IgG intacto tiene dos sitios de unión. Excepto en anticuerpos bifuncionales y biespecíficos, los dos sitios de unión son iguales. Como se usa en el presente documento, la "parte de unión a antígeno" o "región de unión a antígeno" o "fragmento de unión a antígeno" se refiere de forma intercambiable a esa parte de una molécula de anticuerpo, dentro de la región variable, que contiene los restos de aminoácidos que interaccionan con un antígeno y confieren al anticuerpo su especificidad y afinidad por el antígeno. La parte de unión a antígeno del

anticuerpo incluye restos de aminoácidos flanqueantes necesarios para mantener la conformación apropiada de los restos de unión a antígeno. Preferentemente, las regiones flanqueantes de los anticuerpos de la invención son de origen humano o sustancialmente de origen humano (al menos un 85%, 90%, 95%, 97% o 99% de origen humano).

5 Además, un "anticuerpo monoclonal" como se usa en el presente documento puede ser un fragmento Fv monocatenario que puede producirse uniendo el ADN que codifica la LCVR y HCVR con una secuencia enlazadora. (Véase, Pluckthun, *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, pág. 269-315, 1994). Se entiende que independientemente de si los fragmentos o partes se especifican, el término "anticuerpo" como se usa en el presente documento incluye dichos fragmentos o partes así como formas monocatenarias. Siempre que la proteína retenga la capacidad de unirse específica o preferentemente a su diana pretendida (es decir, epítipo o antígeno), se incluye dentro del término "anticuerpo".

Un anticuerpo "precursor", como se usa en el presente documento, es uno que está codificado por una secuencia de aminoácidos usada para la preparación de un anticuerpo modificado o variante. El anticuerpo precursor puede tener una región flanqueante murina, pero preferentemente tiene una región flanqueante humana. El anticuerpo precursor puede ser un anticuerpo murino, quimérico, humanizado o humano.

15 Un anticuerpo anti-miostatina "modificado" o "variante" se refiere en el presente documento a una molécula que difiere en la secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos de anticuerpo anti-miostatina "precursor" en virtud de la adición, delección y/o sustitución de uno o más restos de aminoácidos en la secuencia de anticuerpo precursor. En una realización preferida, el anticuerpo variante comprende una o más sustituciones de aminoácido en la región variable en comparación con el anticuerpo precursor. Un anticuerpo de la invención (un anticuerpo variante) retiene la capacidad de su anticuerpo precursor de unirse preferentemente a miostatina sobre GDF-11, tiene afinidad de unión a miostatina similar a o mejor que la de su anticuerpo precursor y tiene propiedades de estabilidad (es decir, propiedades de estabilidad química) que son superiores a las del anticuerpo precursor.

"Estabilidad química" se refiere a la capacidad de soportar la degradación química, por ejemplo, escisión en un enlace peptídico ("escisión"). Los anticuerpos de la invención que son "resistentes a degradación química" como se usa en el presente documento son resistentes a escisión espontánea en un enlace peptídico y tienen estabilidad química aumentada en comparación con el anticuerpo precursor. Preferentemente, el 100%, 99%, 98%, 97%, 96%, o el 95% de un anticuerpo de la invención es resistente a degradación química, es decir, no se escinde cuando está presente durante un año a 4°C, seis meses a 25°C, dos meses a 37°C o cuatro semanas a 40°C en una solución de anticuerpo. Una solución de anticuerpo es una solución usada en una composición farmacéutica de anticuerpo. Una solución de anticuerpo preferida comprende 1 mg/ml del anticuerpo, fosfato 10 mM, pH 7,4 y NaCl 150 mM.

Un anticuerpo anti-miostatina modificado de particular interés en el presente documento es un anticuerpo monoclonal anti-miostatina con estabilidad química aumentada sobre la del anticuerpo precursor, en que un resto Asn lábil de un dipéptido Asn-Pro dentro del anticuerpo precursor está eliminado, preferentemente por sustitución con un resto de aminoácido natural, incluso más preferentemente por sustitución con un resto de histidina (H), serina (S), treonina (T), alanina (A), o arginina (R). Además, dicho anticuerpo modificado se caracteriza porque se une preferentemente a miostatina sobre GDF-11 y porque tiene una  $K_D$  para miostatina de menos de aproximadamente  $3 \times 10^{-8}$  M, preferentemente caracterizado adicionalmente porque tiene una  $CI_{50}$  de menos de 25 nM en un ensayo in vitro de miostatina/indicador SBE como se expone en el Ejemplo 4 en el presente documento.

La expresión "resto Asn lábil", como se usa en el presente documento, se refiere a un resto de asparagina en un anticuerpo, proteína, o polipéptido, en el que puede suceder desamidación espontánea o escisión del enlace peptídico in vitro o in vivo.

El término "escindido o escisión", como se usa en el presente documento, se refiere a escisión de un enlace peptídico en un anticuerpo. Un sitio de escisión de particular interés es un resto Asn en un anticuerpo, en el extremo amino o carboxi del resto Asn. La escisión de un anticuerpo puede conducir a una reducción de la estabilidad y/o la reducción o pérdida de la actividad de una proteína, o pérdida de la afinidad de unión de un anticuerpo. La modificación espontánea que conduce a escisión puede suceder ex vivo durante la preparación del agente terapéutico formulado, impactando de forma negativa sobre la fabricación y almacenamiento del agente farmacéutico. La escisión también puede suceder ex vivo durante la fabricación o almacenamiento del anticuerpo. Además, la modificación espontánea puede suceder in vivo afectando a la eficacia de la proteína o anticuerpo y la duración de acción. Sin embargo, sustituir simplemente un aminoácido en un sitio de escisión por cualquier otro aminoácido puede impactar negativamente sobre una bioactividad deseada de un anticuerpo, por ejemplo, la afinidad de unión o neutralización.

El término "epítipo" se refiere a esa parte de una molécula capaz de reconocerse y unirse por un anticuerpo en una o más regiones de unión a antígeno del anticuerpo. Los epítipos a menudo constan de una agrupación superficial químicamente activa de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y tienen características estructurales tridimensionales específicas así como características de carga específicas.

El término "epítipo", como se usa en el presente documento, se refiere adicionalmente a una parte de un polipéptido que tiene actividad antigénica y/o inmunogénica en un animal, preferentemente un mamífero, por ejemplo, un ratón o

un ser humano. La expresión "epítipo antigénico", como se usa en el presente documento, se define como una parte de un polipéptido al cual puede unirse específicamente un anticuerpo como se determina por cualquier procedimiento bien conocido en la técnica, por ejemplo, por inmunoensayos convencionales. Los epítopos antigénicos no tienen que ser necesariamente inmunogénicos, pero pueden ser inmunogénicos. Un "epítipo inmunogénico", como se usa en el presente documento, se define como una parte de un polipéptido que provoca una respuesta de anticuerpo en un animal, determinada por cualquier procedimiento conocido en la técnica. (Véase, por ejemplo, Geysen y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3998-4002 (1983)).

Las expresiones "propiedad biológica" o "bioactividad", "actividad" o "actividad biológica", en referencia a un anticuerpo de la presente invención, se usan de forma intercambiable en el presente documento e incluyen, aunque sin limitación, afinidad y especificidad de epítipo/antígeno, capacidad de neutralizar o antagonizar una actividad de miostatina *in vivo* o *in vitro*,  $CI_{50}$  en un ensayo de miostatina/indicador SBE como se muestra en el Ejemplo 4 en el presente documento, u otro ensayo de actividad *in vitro*, la estabilidad *in vitro* o *in vivo* del anticuerpo. Otras propiedades biológicas identificables de un anticuerpo incluyen, por ejemplo, reactividad cruzada (es decir, con homólogos no humanos del péptido diana, o con otras proteínas o tejidos, generalmente y capacidad de conservar niveles de expresión elevados de proteína en células de mamífero). Las propiedades o características mencionadas anteriormente pueden observarse o medirse o evaluarse usando técnicas reconocidas en la técnica incluyendo, aunque sin limitación, ELISA, ELISA competitivo, análisis de resonancia de plasma superficial, ensayos de neutralización *in vitro* e *in vivo* sin límite, unión a receptor, ensayos BIACORE o KINEXA, producción y/o secreción de citoquinas o factores de crecimiento, desarrollo de hemisferio animal de *Xenopus*, transducción de señales e inmunohistoquímica con secciones tisulares de diferentes fuentes incluyendo ser humano, primate, o cualquier otra fuente según pueda ser la necesidad.

La expresión "actividad miostatina" como se usa en el presente documento se refiere a una o más de las actividades reguladoras del crecimiento fisiológico o morfogenéticas asociadas con la proteína miostatina activa. Por ejemplo, la miostatina activa es un regulador negativo de la masa de músculo esquelético. La miostatina activa también puede modular la producción de enzimas específicas musculares (por ejemplo, creatina quinasa), estimular la proliferación de mioblastos, y modular la diferenciación de preadipocitos en adipocitos.

El término "inhibir" o "neutralizar" como se usan en el presente documento, respecto a una actividad de un anticuerpo de la invención significa la capacidad de antagonizar, prohibir, evitar, restringir, ralentizar, alterar, eliminar, detener, reducir o invertir sustancialmente, por ejemplo, el progreso o la gravedad de aquello que se está inhibiendo incluyendo, aunque sin limitación, una actividad biológica. La inhibición o neutralización es preferentemente de al menos aproximadamente el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o superior de la actividad en ausencia del anticuerpo.

Los términos "individuo", "sujeto", y "paciente", usados de forma intercambiable en el presente documento, se refieren a un animal, preferentemente un mamífero (incluyendo un no primate y un primate) o especies aviares, incluyendo, aunque sin limitación, animales murinos, simios, seres humanos, animales mamíferos de granja (por ejemplo, bovinos, porcinos, ovinos), animales mamíferos para deportes (por ejemplo, equinos), y mascotas mamíferas (por ejemplo, caninas y felinas); preferentemente el término se refiere a seres humanos. El término también se refiere a especies aviares incluyendo, aunque sin limitación, pollos y pavos. En una cierta realización, el sujeto, preferentemente un mamífero, más preferentemente un ser humano, está adicionalmente caracterizado con una enfermedad o trastorno o afección que se beneficiaría de un nivel disminuido o bioactividad disminuida de miostatina. En otra realización el sujeto, preferentemente un mamífero, preferentemente un ser humano, está caracterizado adicionalmente como en riesgo de desarrollar un trastorno, enfermedad o afección que se beneficiaría de un nivel disminuido de miostatina o una bioactividad disminuida de miostatina.

#### Caracterización de anticuerpo

La invención presenta un anticuerpo que se une preferentemente a miostatina sobre GDF-11 y es más estable que el anticuerpo precursor (es decir, más resistente a degradación química que el anticuerpo precursor) manteniendo al mismo tiempo, o mejorando, la afinidad de unión por miostatina mostrada por el anticuerpo precursor. En una realización, un resto Asn lábil en CDRL3 del anticuerpo precursor, Mab C12 como se muestra en la Figura 2, está sustituido por un aminoácido diferente.

Las sustituciones preferidas de aminoácidos en un anticuerpo de la invención son aquellas que: (1) reducen la susceptibilidad a degradación química espontánea, es decir, escisión o desamidación, y (2) mantienen la afinidad de unión al antígeno del anticuerpo mostrada por el anticuerpo precursor. En una realización preferida, el resto Asn en la CDRL3 de Mab C12 está reemplazado por H o R.

En una realización, un anticuerpo de la invención es resistente a degradación química espontánea, es decir, el 100%, 99%, 98%, 97%, 96%, o 95% de los anticuerpos no se escinden cuando están presentes en una solución de anticuerpo durante un tiempo y temperaturas seleccionadas entre el grupo que consiste en un año a 4°C, seis meses a 25°C, dos meses a 37°C, y cuatro semanas a 40°C en una solución de anticuerpo. Una solución de anticuerpo es cualquier solución adecuada para una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo. Una solución de anticuerpo ejemplar comprende 1 mg/ml del anticuerpo, fosfato 10 mM, pH 7,4 y NaCl 150 mM.

En una realización, los anticuerpos de la invención se caracterizan adicionalmente porque tienen una fuerte afinidad de unión ( $K_D$ ) por miostatina, es decir, menos de aproximadamente  $3 \times 10^{-8}$  M,  $1 \times 10^{-8}$  M o  $1 \times 10^{-9}$  M, preferentemente menos de aproximadamente  $9 \times 10^{-10}$  M,  $8,7 \times 10^{-10}$  M o más preferentemente, menos de aproximadamente  $8 \times 10^{-11}$  M. Como alternativa, los anticuerpos de la invención se caracterizan por una  $K_D$  por miostatina de no más de aproximadamente  $3 \times 10^{-8}$  M,  $1 \times 10^{-8}$  M,  $1 \times 10^{-9}$  M o  $9 \times 10^{-10}$  M, más preferentemente no más de aproximadamente  $8,7 \times 10^{-10}$  M y más preferentemente no más de aproximadamente  $8 \times 10^{-11}$  M. La afinidad de unión de un anticuerpo de la invención es similar a o mejor que la de su anticuerpo precursor.

Preferentemente, los anticuerpos de la invención caracterizados por una fuerte afinidad de unión como se ha descrito anteriormente también tienen una  $CI_{50}$  de menos de 25 nM, 20 nM, 16 nM, 14 nM, 10 nM, 9 nM, 6 nM, o 5,2 nM en el ensayo in vitro de miostatina/indicador SBE expuesto en el Ejemplo 4 en el presente documento. Preferentemente, la  $CI_{50}$  de un anticuerpo de la invención es similar a o mejor que la de su anticuerpo precursor. Todos los anticuerpos de la invención son significativamente menos reactivos con GDF-11 que con miostatina, es decir, se unen preferentemente a miostatina sobre GDF-11.

Los anticuerpos de la invención son preferentemente anticuerpos quiméricos, humanizados o humanos o partes de unión a antígeno de los mismos y preferentemente se unen a miostatina dentro de la región de la forma madura de miostatina que abarca los aminoácidos 40-64 o más preferentemente dentro de la región de la forma madura de miostatina que abarca los aminoácidos 43-57 y/o 45/59. Además, los anticuerpos de la invención neutralizan una actividad biológica de miostatina in vivo o in vitro. La unión específica de anticuerpos monoclonales anti-miostatina de la invención permite a los anticuerpos de la invención usarse como agentes terapéuticos o agentes profilácticos para afecciones, enfermedades o trastornos asociados con miostatina, es decir, afecciones, enfermedades o trastornos que se benefician de la disminución de los niveles de miostatina o del antagonismo o inhibición de una actividad biológica de miostatina. Además, los anticuerpos de la invención pueden usarse para diagnosticar o controlar afecciones, enfermedades o trastornos que se benefician de un nivel o bioactividad alterada de miostatina o para determinar el nivel de miostatina en una muestra.

Los anticuerpos monoclonales anti-miostatina de la invención se unen a un epítipo antigénico que se ha descubierto que está localizado dentro de los aminoácidos 40-64 (SEC ID N° 1 para seres humanos) de miostatina madura preferentemente dentro de los aminoácidos 43-57 y/o 45-59 de miostatina madura. Además, un epítipo inmunogénico de miostatina de la invención está localizado dentro de los aminoácidos 40-64 de miostatina madura (SEC ID N° 1 para seres humanos), preferentemente dentro de los aminoácidos 43-57 y/o 45-59 de miostatina madura de cualquier mamífero o especie aviar. También se contempla que un epítipo inmunogénico de la invención es un epítipo antigénico. Adicionalmente, restos de miostatina fuera de los aminoácidos 40-64 pueden afectar a la estructura conformacional del dominio antigénico y de este modo alterar la unión de un anticuerpo de la invención al epítipo antigénico.

Los anticuerpos monocatenarios, y los anticuerpos quiméricos, humanizados, así como anticuerpos monocatenarios quiméricos o con CDR injertada, y similares, que comprenden partes obtenidas de diferentes especies, también se abarcan por la presente invención y el término "anticuerpo" o "anticuerpo modificado". Las diversas partes de estos anticuerpos pueden unirse juntas químicamente por técnicas convencionales, sintéticamente, o pueden prepararse como una proteína contigua usando técnicas de ingeniería genética. Por ejemplo, pueden expresarse los ácidos nucleicos que codifican una cadena quimérica o humanizada para producir una proteína contigua.

Además, también pueden producirse partes funcionales de anticuerpos, incluyendo partes de unión a antígeno de anticuerpos quiméricos, humanizados, humanos o monocatenarios. Las partes funcionales de los anticuerpos anteriores retienen al menos una función de unión a antígeno y/o función biológica o bioactividad del anticuerpo de longitud completa del cual se obtienen. Las partes funcionales preferidas retienen una función de unión a antígeno de un anticuerpo de longitud completa correspondiente (por ejemplo, la capacidad de unirse a una forma de miostatina madura de mamífero). Partes funcionales particularmente preferidas o fragmentos retienen la capacidad de inhibir una o más funciones o bioactividades características de una miostatina madura de mamífero, tal como una actividad de unión, una actividad de señalización, y/o estimulación de una respuesta celular. Por ejemplo, en una realización, una parte funcional o fragmento puede inhibir la interacción de miostatina madura con uno o más de sus ligandos y/o puede inhibir una o más funciones mediadas por receptor.

Las partes de anticuerpo o fragmentos capaces de unirse a miostatina madura o una parte de la misma (preferentemente dentro de los aminoácidos 40-64, 43-57 y/o 45-59 de miostatina madura), incluyen, aunque sin limitación, fragmentos Fv, Fab, Fab' y  $F(ab')_2$  y están incluidos por la invención. Dichos fragmentos pueden producirse por escisión enzimática o por técnicas recombinantes. Por ejemplo, la escisión con papaína o pepsina puede generar fragmentos Fab o  $F(ab')_2$ , respectivamente. El fragmento de unión a antígeno más pequeño es el Fv, que consta de los dominios HCVR y LCVR. El fragmento Fab consta de los dominios HCVR-CH1 y LCVR-CL covalentemente ligados por un enlace disulfuro entre las regiones constantes. Para superar la tendencia de los dominios HCVR y LCVR no unidos covalentemente en el Fv de disociarse cuando se co-expresan en una célula huésped, puede construirse un llamado fragmento Fv monocatenario (scFv), en el cual un polipéptido flexible y adecuadamente largo une el extremo C-terminal del HCVR al extremo N-terminal del LCVR o el extremo C-terminal del LCVR al extremo N-terminal del HCVR. Un enlazador habitualmente usado es un péptido de 15 restos  $(Gli_4Ser)_3$ , pero también se conocen otros enlazadores en la técnica. Los anticuerpos también pueden producirse en una

diversidad de formas truncadas usando genes de anticuerpo en los cuales se han introducido uno o más codones de parada cadena arriba del sitio de parada natural. Por ejemplo, puede diseñarse un gen quimérico que codifique una parte de cadena pesada  $F(ab')_2$  para incluir secuencias de ADN que codifiquen el dominio  $CH_1$  y la región bisagra de la cadena pesada.

#### 5 Identificación de resto o restos Asn lábiles

Están disponibles muchos procedimientos para detectar y cuantificar las modificaciones espontáneas de restos Asn lábiles en una proteína, por ejemplo, un anticuerpo. La desamidación, una modificación que provoca la conversión de un resto de asparagina en una mezcla de isoaspartato y aspartato que puede proporcionar una señal para la degradación proteica, introduce carga negativa y cambios en la masa proteica ( $NH_2$  frente  $OH$ ,  $\Delta = 1$  Da) e hidrofobicidad. Pueden usarse técnicas de separación incluyendo procedimientos electrónicos y cromatográficos, tales como, IEF, cIEF, electroforesis en gel de urea, HPLC de fase inversa, HPLC de intercambio iónico, e interacción hidrófila, para separar y/o aislar formas desamidadas o escindidas de un anticuerpo, o una proteína o un polipéptido. La cromatografía de intercambio iónico se usa ampliamente para aislar proteína desamidadas. La localización y grado de las modificaciones espontáneas de un anticuerpo, o una proteína, o un polipéptido pueden caracterizarse adicionalmente por cromatografía líquida/espectrometría de masas (CL/EM) y secuenciación N-terminal.

#### Sustitución de resto o restos Asn lábiles u otra modificación de anticuerpos

Para eliminar, por ejemplo, por sustitución de aminoácidos, un resto Asn lábil en un anticuerpo, u otra proteína, el resto Asn lábil puede sustituirse con un único aminoácido. Es deseable que la sustitución de aminoácido no altere (es decir, negativamente), o altere mínimamente (por ejemplo, el 10%, 5%, 4%, 3%, 2% o menos) la afinidad de unión anticuerpo:antígeno. Es adicionalmente deseable que la sustitución de aminoácido no altere (es decir, negativamente), o altere mínimamente la neutralización del anticuerpo, la especificidad de epítipo y la capacidad del anticuerpo de unirse preferentemente a miostatina sobre GDF-11. Puede usarse un ELISA para determinar los efectos de la sustituciones de aminoácidos individuales sobre la afinidad de unión del anticuerpo de la invención a miostatina o un epítipo antigénico del mismo y el valor ELISA puede compararse con el de su anticuerpo precursor (por ejemplo, anticuerpo C12 ó 510C2) de unión al mismo antígeno. Como alternativa, puede usarse un ensayo BIACORE® o KINEXA® para medir la afinidad de unión de un anticuerpo.

Los anticuerpos de la invención pueden adicionalmente mutagenizarse (o mutagenizarse antes de la eliminación del resto Asn cuya presencia contribuye a la inestabilidad del anticuerpo precursor), por ejemplo, dentro del dominio o dominios CDR para crear un anticuerpo variante con una propiedad de interés optimizada, por ejemplo, afinidad de unión,  $CI_{50}$ , especificidad, etc. Se prefiere un anticuerpo de la invención generado por sustitución de aminoácidos y tiene al menos un resto de aminoácido de la molécula de anticuerpo precursor eliminada y un resto diferente insertado en su lugar. Los sitios de mayor interés para dicha mutagénesis de sustitución incluyen las regiones CDR, pero también se contemplan alteraciones en FR.

Un modo conveniente para generar variantes de sustitución es maduración de afinidad usando presentación en fagos. En resumen, se mutan varios sitios de la región CDR para generar todas las posibles sustituciones de aminoácidos en cada sitio. Las variantes de anticuerpo generadas de este modo se presentan de un modo monovalente a partir de partículas fágicas filamentosas en forma de fusiones al producto del gen III de M13 empaquetado dentro de cada partícula. Las variantes presentadas en fagos después se exploran para su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión, especificidad,  $CI_{50}$ ) como se desvela en el presente documento. Para identificar los sitios de la región CDR candidatos para modificación, puede realizarse mutagénesis por barrido de alanina para identificar los restos de la región CDR que contribuyen significativamente a la unión de antígeno. Como alternativa, o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar los puntos de contacto entre el anticuerpo y la miostatina. Dichos restos de contacto y los restos adyacentes son candidatos para sustitución de acuerdo con las técnicas elaboradas en el presente documento o conocidas en la técnica. Como alternativa, o adicionalmente, puede realizarse mutagénesis aleatoria sobre una o más secuencias CDR en una o más posiciones de los restos, mientras la CDR está unida de forma funcional a la región variable o mientras la CDR es independiente de otra secuencia de la región variable y después la CDR alterada se devuelve a una región variable usando tecnología de ADN recombinante. Una vez se han generado y expresado dichos anticuerpos variantes, el panel de variantes se somete a exploración como se describe en el presente documento y pueden seleccionarse los anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes para desarrollo adicional.

#### Expresión de anticuerpos

La presente invención también se refiere a líneas celulares que expresan un anticuerpo monoclonal anti-miostatina de la invención o parte del mismo. La creación y aislamiento de líneas celulares que producen un anticuerpo monoclonal de la invención puede conseguirse usando técnicas convencionales conocidas en la técnica. Las líneas celulares preferidas incluyen COS, CHO, SP2/0, NS0 y levaduras (disponibles en bancos públicos tales como la ATCC, American Type Culture Collection, Manassas, VA).

Puede usarse una amplia diversidad de sistemas de expresión huésped para expresar un anticuerpo de la presente invención incluyendo sistemas de expresión procariotas (bacterianos) y eucariotas (tales como levaduras, baculovirus, plantas, mamíferos y otras células animales, animales transgénicos, y células de hibridoma), así como sistemas de expresión de presentación en fagos. Un ejemplo de un vector de expresión bacteriano adecuado es pUC119 y un vector de expresión eucariota adecuado es un vector pcDNA3.1 modificado con un sistema de selección DHFR debilitado. También se conocen otros sistemas de expresión de anticuerpos en la técnica y se contemplan en el presente documento.

Un anticuerpo de la invención puede prepararse por expresión recombinante de los genes de cadena ligera y pesada de inmunoglobulina en una célula huésped. Para expresar un anticuerpo de forma recombinante, se transforma una célula huésped, se transduce, se infecta o similares con uno o más vectores de expresión recombinante que portan fragmentos de ADN que codifican las cadenas ligeras y/o pesadas de inmunoglobulina del anticuerpo de modo que las cadenas ligera y/o pesada se expresen en la célula huésped. La cadena pesada y la cadena ligera pueden expresarse independientemente a partir de diferentes promotores a los cuales están unidas de forma funcional en un vector o, como alternativa, la cadena pesada y la cadena ligera pueden expresarse independientemente a partir de diferentes promotores a los que están unidas de forma funcional en dos vectores - uno que expresa la cadena pesada y uno que expresa la cadena ligera. Opcionalmente, la cadena pesada y la cadena ligera pueden expresarse en diferentes células huésped. Preferentemente, los anticuerpos recombinantes se secretan al medio en el cual se cultivan las células huésped, a partir del cual pueden recuperarse o purificarse los anticuerpos. Se usan metodologías de ADN recombinante convencionales para obtener genes de cadena pesada y ligera de anticuerpo, incorporar estos genes en vectores de expresión recombinante, e introducir los vectores en células huésped.

Un ADN aislado que codifica una región HCVR puede convertirse en un gen de cadena pesada de longitud completa uniendo de forma funcional el ADN que codifica HCVR a otra molécula de ADN que codifica las regiones constantes de cadena pesada (CH1, CH2, y CH3). Las secuencias de genes de región constante de cadena pesada humana son conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Kabat, y col., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, Publicación NIH N° 91-3242 (1991). Los fragmentos de ADN que abarcan estas regiones pueden obtenerse, por ejemplo, por amplificación por PCR convencional. La región constante de cadena pesada puede ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgA, IgE, IgM o IgD), clase (por ejemplo, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, e IgG<sub>4</sub>) o subclase de región constante y cualquier variante alotípica de las mismas como se describe en Kabat (*supra*). Como alternativa, la parte de unión a antígeno puede ser un fragmento Fab, fragmento Fab', fragmento F(ab')<sub>2</sub>, Fd, o un fragmento Fv monocatenario (scFv). Para un gen de cadena pesada de fragmento Fab, el ADN que codifica HCVR puede unirse de forma funcional a otra molécula de ADN que codifica solamente una región constante CH1 de cadena pesada.

Un ADN aislado que codifica una región LCVR puede convertirse en un gen de cadena ligera de longitud completa (así como en un gen de cadena ligera Fab) uniendo de forma funcional el ADN que codifica LCVR a otra molécula de ADN que codifica una región constante de cadena ligera, CL. Las secuencias de genes de región constante de cadena ligera humana son conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Kabat, *supra*. Los fragmentos de ADN que abarcan estas regiones pueden obtenerse por amplificación por PCR convencional. La región constante de cadena ligera puede ser una región constante kappa o lambda.

Para crear un gen scFv, los fragmentos de ADN que codifican HCVR y LCVR se unen de forma funcional a otro fragmento que codifica un enlazador flexible, por ejemplo, que codifica la secuencia de aminoácidos (Gli<sub>4</sub>-Ser)<sub>3</sub>, de modo que las secuencias HCVR y LCVR puedan expresarse como una proteína de cadena única contigua, con las regiones LCVR y HCVR unidas por el enlazador flexible.

Para expresar un anticuerpo de la invención, se inserta un ADN que codifica una cadena ligera y/o pesada parcial o de longitud completa obtenida como se ha descrito anteriormente, en un vector de expresión de modo que el gen esté unido de forma funcional a secuencias de control de la transcripción y la traducción. El vector de expresión y las secuencias de control de la expresión se eligen para que sean compatibles con la célula huésped usada. El gen de cadena ligera de anticuerpo y el gen de cadena pesada de anticuerpo pueden insertarse en vectores diferentes o, más típicamente, ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión. Los genes de anticuerpo se insertan en el vector de expresión por procedimientos convencionales. Adicionalmente, el vector de expresión recombinante puede codificar un único péptido que facilita la secreción de la cadena ligera y/o pesada del anticuerpo monoclonal anti-miostatina a partir de una célula huésped. El gen de cadena ligera y/o pesada del anticuerpo monoclonal anti-miostatina puede clonarse en el vector de modo que el péptido señal esté unido de forma funcional en fase con el extremo amino-terminal del gen de la cadena de anticuerpo. El péptido señal puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido señal heterólogo.

Además del gen o genes de cadena pesada y/o ligera de anticuerpo, un vector de expresión recombinante de la invención porta secuencias reguladoras que controlan la expresión del gen o genes de cadena de anticuerpo en una célula huésped. La expresión "secuencia reguladora" pretende incluir promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación), según sea necesario, que controlan la transcripción o traducción del gen o genes de cadena de anticuerpo. El diseño del vector de expresión, incluyendo la selección de secuencias reguladoras, puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped a

transformar, el nivel de expresión de proteína deseado. Las secuencias reguladoras preferidas para la expresión en células huésped de mamífero incluyen elementos víricos que dirigen elevados niveles de expresión proteica en células de mamífero, tales como promotores y/o potenciadores derivados de citomegalovirus (CMV), el virus 40 del simio (SV40), adenovirus (por ejemplo, el promotor tardío principal de adenovirus (AdMLP)) y poliomavirus.

5 Además de los genes de cadena pesada y/o ligera de anticuerpo y las secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinante de la invención pueden portar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en células huésped (por ejemplo, orígenes de replicación) y uno o más genes marcadores de selección. El gen marcador de selección facilita la selección de células huésped en las cuales se ha introducido el vector. Por ejemplo, típicamente el gen marcador de selección confiere resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina, o metotrexato, en una célula huésped en la cual se ha introducido el vector. Los genes marcadores de selección preferidos incluyen el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) (para su uso en células huésped DHFR-negativa con selección/amplificación con metotrexato), el gen *neo* (para selección con G418), y la glutamina sintetasa (GS) en una línea celular GS-negativa (tal como NS0) para selección/amplificación.

15 Para la expresión de las cadenas ligera y/o pesada, el vector o vectores de expresión que codifican las cadenas pesada y/o ligera se introducen en una célula huésped por técnicas convencionales, por ejemplo, electroporación, precipitación con fosfato cálcico, transfección con DEAE-dextrano, transducción, infección y similares. Aunque es teóricamente posible expresar los anticuerpos de la invención en células huésped procariotas o eucariotas, se prefieren las células eucariotas, y más preferentemente células huésped de mamífero, porque dichas células tienen mayor probabilidad de ensamblar y secretar un anticuerpo apropiadamente plegado e inmunológicamente activo. Las células huésped de mamífero preferidas para expresar los anticuerpos recombinantes de la invención incluyen células de ovario de hámster chino (células CHO), células de mieloma NS0, células COS, y células SP2/0. Cuando se introducen vectores de expresión recombinante que codifican genes de anticuerpo en células huésped de mamífero, los anticuerpos se producen cultivando las células huésped durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células huésped o, más preferentemente, la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el cual se cultivan las células huésped. Los anticuerpos pueden recuperarse de la célula huésped y/o el medio de cultivo usando procedimientos convencionales de purificación.

25 Las células huésped también pueden usarse para producir partes, o fragmentos, de anticuerpos intactos, por ejemplo, fragmentos Fab o moléculas scFv por técnicas que son convencionales. Un especialista entenderá que variaciones sobre el procedimiento anterior están dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, puede ser deseable transfectar una célula huésped con ADN que codifique la cadena ligera o la cadena pesada de un anticuerpo de la presente invención. También puede usarse tecnología de ADN recombinante para retirar algo o todo el ADN que codifica cualquiera de las cadenas ligera y pesada o ambas que no sea necesario para la unión a miostatina. Las moléculas expresadas a partir de dichas moléculas de ADN truncadas también están abarcadas por los anticuerpos de la invención.

35 En un sistema preferido para expresión recombinante de un anticuerpo de la invención, se introduce un vector de expresión recombinante que codifica tanto la cadena pesada de anticuerpo como la cadena ligera de anticuerpo en células CHO por, por ejemplo, transfección mediada por fosfato cálcico. Dentro del vector de expresión recombinante, los genes de cadena pesada y ligera de anticuerpo están cada uno unido de forma funcional a elementos reguladores potenciadores/promotores para dirigir elevados niveles de transcripción de los genes. El vector de expresión recombinante también porta un gen DHFR, que permite la selección de células CHO que se han transfectado con el vector usando selección/amplificación con metotrexato. Las células huésped transformantes seleccionadas se cultivan para permitir la expresión de las cadenas pesada y ligera de anticuerpo y el anticuerpo intacto se recupera del medio de cultivo. Se usan técnicas de biología molecular convencionales para preparar el vector de expresión recombinante, transfectar las células huésped, seleccionar los transformantes, cultivar las células huésped y recuperar el anticuerpo del medio de cultivo. Los anticuerpos, o partes de unión a antígeno de los mismos, de la invención pueden expresarse en un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico para genes de inmunoglobulina humana (véase, por ejemplo, Taylor, y col., Nucleic Acids Res. 20:6287-95, 1992).

#### Usos

50 Los anticuerpos de la presente invención son útiles en aplicaciones terapéuticas, profilácticas, de diagnóstico e investigación como se describe en el presente documento. Un anticuerpo de la invención puede usarse para diagnosticar un trastorno o enfermedad asociada con la expresión de miostatina humana. De un modo similar, el anticuerpo de la invención puede usarse en un ensayo para controlar los niveles de miostatina en un sujeto que se está tratando para una afección asociada con miostatina.

#### Usos terapéuticos para el anticuerpo

55 La miostatina desempeña una tarea en el desarrollo muscular y varios trastornos o enfermedades relacionadas. En adultos, el ARNm de miostatina se detecta principalmente en músculo esquelético aunque también se hallan concentraciones inferiores en tejido adiposo y tejido cardíaco (Sharma, M., y col, J. Cell Physiol. 180:1, 1999). Ratones knockout para miostatina tienen de dos a tres veces más masa muscular que las crías de la misma camada de tipo silvestre. La masa muscular aumentada es el resultado de la hipertrofia de las fibras e hiperplasia

(McPherron, A., y col. Nature 387:83-90, 1997 y Zhu, X. y col., FEBS Letters 474:71). Además, los ratones knockout para miostatina acumulan menos grasa que las crías de la misma camada de tipo silvestre pero por lo demás parecen normales y sanos. La miostatina también ha demostrado recientemente ser un regulador importante de la adipogénesis (Rebbapragada, A., y col., Mol. and Cell. Bio. 23:7230-7242, 2003). Adicionalmente, la estructura y contenido óseo se ha estudiado recientemente en ratones deficientes en miostatina (Hamrick M.W., y col., J. Orthopaedic Research 21:1025, 2003; Hamrick, M.W., y col., Calcif Tissue Int 71:63, 2002).

Por lo tanto, una composición que comprenda un anticuerpo monoclonal anti-miostatina de la invención puede usarse para aumentar la masa muscular, aumentar la densidad ósea, disminuir la pérdida muscular, o puede ser útil para el tratamiento o prevención de afecciones en las que la presencia de miostatina cause o contribuya a efectos patológicos indeseables o la disminución de los niveles de miostatina tiene un beneficio terapéutico en mamíferos, preferentemente seres humanos. Preferentemente, una composición que comprenda un anticuerpo monoclonal anti-miostatina de la invención puede usarse para aumentar la masa muscular.

Preferentemente, un anticuerpo de la invención puede usarse en el tratamiento o prevención de pérdida muscular, lesión muscular, cirugía, reparación de músculo dañado, debilidad, sarcopenia relacionada con la edad, atrofia por desuso, osteoporosis, osteoartritis, crecimiento y reparación de ligamentos, obesidad, supresión de acumulación de grasa corporal, obesidad, distrofia muscular de cualquier tipo, miopatía por cuidados intensivos, miopatía alcohólica, caquexia (por ejemplo, relacionada con cáncer o inducida por VIH, o resultante de COPD, enfermedad pulmonar crónica, recuperación de sepsis, fallo renal, fallo hepático, fallo o enfermedad cardíaca), síndrome metabólico, pérdida muscular posterior a quemaduras, y diabetes de tipo II. Más preferentemente, un anticuerpo de la invención puede usarse en el tratamiento o prevención de pérdida muscular, debilidad, sarcopenia relacionada con la edad, atrofia por desuso y caquexia. Más preferentemente, un anticuerpo de la invención puede usarse en el tratamiento o prevención de atrofia por desuso o caquexia.

La atrofia por desuso puede ser el resultado de numerosas causas o incidentes incluyendo cualquier trastorno o enfermedad o patología que conduzca a inmovilidad prolongada o desuso o reposo en cama incluyendo, aunque sin limitación, trasplante de un órgano sólido, remplazo de una articulación, apoplejía, lesión de médula espinal, recuperación de una quemadura grave, hemodiálisis crónica sedentaria, recuperación post-sepsis y exposición a microgravedad. Como la miostatina está altamente conservada en su secuencia y función a través de las especies, los anticuerpos de la invención pueden usarse para aumentar la masa muscular, aumentar la densidad ósea o tratar o prevenir afecciones en mamíferos no humanos o especies aviares [por ejemplo, animales domésticos (por ejemplo, caninos y felinos), animales para deportes (por ejemplo, equinos), animales como fuente de alimento (por ejemplo, bovinos, porcinos y ovinos), especies aviares (por ejemplo, pollos, pavos, otros pájaros de caza o aves de corral)] en los que la presencia de miostatina causa o contribuye a efectos patológicos indeseables o la disminución de los niveles de miostatina tiene beneficio terapéutico.

Se contempla en el presente documento el uso de un anticuerpo monoclonal anti-miostatina de la presente invención para tratar o prevenir al menos uno de los trastornos mencionados anteriormente en los que la actividad de la miostatina es nociva o que se benefician de niveles disminuidos de miostatina bioactiva. Adicionalmente, se contempla el uso de un anticuerpo monoclonal anti-miostatina de la presente invención para su uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de al menos uno de los trastornos mencionados anteriormente.

Como se usa en el presente documento, los términos "tratamiento", "tratar", y similares, se refieren a obtener un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser terapéutico en términos de cura parcial o completa para una enfermedad y/o efecto adverso atribuible a la enfermedad. "Tratamiento", como se usa en el presente documento, incluye la administración de un compuesto de la presente invención para el tratamiento de una enfermedad o afección en un mamífero, particularmente en un ser humano, e incluye: (a) inhibir la enfermedad, es decir, detener su desarrollo; y (c) aliviar la enfermedad, es decir, causar la regresión de la enfermedad o trastorno o aliviar los síntomas o complicaciones del mismo. Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar la respuesta deseada óptima.

Como se usa en el presente documento, el término "prevenir" se refiere a prevenir completa o parcialmente una enfermedad o síntoma de la misma. "Prevención" como se usa en el presente documento, incluye la administración de un compuesto de la presente invención para la prevención de la aparición de enfermedades en un sujeto que pueda estar predispuesto a la enfermedad pero que aún no se ha diagnosticado que la tenga.

### Composición

Un anticuerpo de la invención puede incorporarse en composiciones farmacéuticas adecuadas para su administración a un sujeto. Los compuestos de la invención pueden administrarse solos o en combinación con un vehículo, diluyente, y/o excipientes farmacéuticamente aceptables, en dosis individuales o múltiples. Las composiciones para su administración se diseñan para que sean apropiadas para el modo seleccionado de administración, y se usan diluyentes, vehículos, y/o excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes de dispersión, tampones, tensioactivos, conservantes, agentes solubilizantes, agentes de isotonicidad, agentes estabilizantes y similares según sea apropiado. Dichas composiciones se diseñan de acuerdo con técnicas convencionales como en, por ejemplo, Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 19 Edición, Gennaro,

Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA 1995 que proporciona un compendio de técnicas de formulación que son generalmente conocidas para los facultativos.

Una composición de la invención preferentemente es una "cantidad terapéuticamente eficaz" o una "cantidad profilácticamente eficaz" de un anticuerpo de la invención. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo puede variar de acuerdo con factores tales como la patología, edad, sexo y peso del individuo, y la capacidad del anticuerpo o parte de anticuerpo de provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz es también una en la que cualquier efecto tóxico o nocivo del anticuerpo se compensa por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado profiláctico deseado. Típicamente, como se usa una dosis profiláctica en sujetos antes de o en una fase más temprana de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz puede ser menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

Una cantidad terapéuticamente eficaz o profilácticamente eficaz es al menos la dosis mínima, pero menos de una dosis tóxica, de un agente activo que es necesaria para conferir beneficio terapéutico a un sujeto. Indicado de otro modo, una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de la invención es una cantidad que en mamíferos, preferentemente seres humanos, aumenta la masa muscular, aumenta la densidad ósea, o trata afecciones en las que la presencia de miostatina causa o contribuye a efectos patológicos indeseables o una disminución en los niveles de miostatina provoca un efecto terapéutico beneficioso en un mamífero, preferentemente un ser humano e incluyendo, aunque sin limitación, pérdida muscular, lesión muscular, debilidad por cirugía, sarcopenia relacionada con la edad, atrofia por desuso, osteoporosis, osteoartritis, crecimiento y reparación de ligamentos, obesidad, supresión de acumulación de grasa corporal, distrofia muscular de cualquier tipo, miopatía por cuidados intensivos, caquexia (por ejemplo, relacionada con cáncer o inducida por VIH, o resultante de COPD, fallo renal, fallo hepático, fallo o enfermedad cardíaca), síndrome metabólico y diabetes de tipo II. La atrofia por desuso puede ser el resultado de numerosas causas o incidentes incluyendo cualquier trastorno o enfermedad o patología que conduzca a inmovilidad prolongada o desuso o reposo en cama incluyendo, aunque sin limitación, trasplante de un órgano sólido, remplazo de una articulación, apoplejía, lesión de médula espinal, recuperación de una quemadura grave, hemodiálisis crónica sedentaria, recuperación post-sepsis, y exposición a microgravedad.

La vía de administración de un anticuerpo de la presente invención es parenteral. Preferentemente, los anticuerpos de la invención pueden incorporarse en una composición farmacéutica adecuada para administración parenteral. El término parenteral como se usa en el presente documento incluye administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, rectal, vaginal o intraperitoneal. Es preferido el suministro sistémico periférico por inyección intravenosa o intraperitoneal o subcutánea. Los vehículos adecuados para dichas inyecciones son sencillos en la técnica.

La composición típicamente debe ser estéril y estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento en el recipiente proporcionado incluyendo, por ejemplo, un vial sellado o jeringa. Por lo tanto, las composiciones pueden filtrarse a esterilidad después de preparar la formulación, o hacerse de otro modo microbiológicamente aceptable. Una composición típica para infusión intravenosa podría tener un volumen de 20-1000 ml de fluido, tal como solución de Ringer estéril, solución salina fisiológica, solución de dextrosa y solución de Hank y una dosis terapéuticamente eficaz (por ejemplo, 1 a 1000 mg) de concentración de anticuerpo. La dosis puede variar dependiendo del tipo y gravedad de las enfermedades. Como es bien sabido en las técnicas médicas, las dosificaciones para un sujeto cualquiera dependen de muchos factores, incluyendo el tamaño del paciente, el área superficial del cuerpo, la edad, el compuesto particular a administrar, el sexo, el tiempo y vía de administración, la salud general, y otros fármacos que se administran de forma concurrente. Una dosis típica puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 1 a 1000 mg; sin embargo, están previstas dosis por debajo y por encima de este intervalo ejemplar, especialmente considerando los factores mencionados anteriormente. Un régimen de dosificación típico puede suceder diariamente, semanalmente, bisemanalmente o mensualmente. Un régimen de dosificación parenteral típico puede ser de aproximadamente 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  a aproximadamente 20  $\text{mg}/\text{kg}$  de peso corporal total, preferentemente de aproximadamente 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  a aproximadamente 10  $\text{mg}/\text{kg}$ . El progreso puede controlarse por evaluación periódica. Para administraciones repetidas, dependiendo de la afección, el tratamiento puede repetirse hasta que suceda una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad o hasta que suceda la prevención deseada de los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, pueden ser útiles otros regímenes de dosificación y no se excluyen de los mismos.

Estas cantidades sugeridas de anticuerpo están sujetas en gran parte a discreción terapéutica. El factor clave en la selección de una dosis apropiada y la programación es el resultado obtenido. Los factores para considerar en este contexto incluyen el trastorno particular que se está tratando, el mamífero particular que se está tratando, la afección clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de suministro del anticuerpo, el tipo particular de anticuerpo, el procedimiento de administración, el programa de administración, y otros factores conocidos para los facultativos médicos.

Los agentes terapéuticos de la invención pueden congelarse o liofilizarse para su almacenamiento y reconstituirse en un vehículo estéril adecuado antes de su uso. La liofilización y reconstitución pueden conducir a grados variables de pérdida de actividad del anticuerpo. Las dosificaciones pueden tener que ajustarse para compensarlo. Generalmente, se prefiere un pH entre 6 y 8.

Artículos de fabricación

- En otra realización de la invención, se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento o prevención de los trastornos o afecciones descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta. Los recipientes adecuados incluyen, aunque sin limitación, frascos, viales, jeringas y tubos de ensayo. Los recipientes pueden formarse a partir de una diversidad de materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente alberga una composición de la invención que es eficaz para prevenir o tratar el trastorno o afección y puede tener una entrada de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tenga un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). El agente activo en la composición es un anticuerpo anti-miostatina de la invención. La etiqueta en, o asociada con, el recipiente indica que la composición se usa para tratar la afección de elección. El artículo de fabricación puede comprender adicionalmente un segundo recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir adicionalmente otros materiales deseables desde el punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospectos con instrucciones para su uso.
- Los siguientes ejemplos se ofrecen únicamente para fines ilustrativos, y no pretender limitar el alcance de la presente invención en modo alguno.

**Ejemplos****Ejemplo 1: Identificación de un sitio de escisión en los Mab C12 y 510C2**

- Se incuban soluciones de anticuerpo a 1 mg/ml en diversas condiciones de tampón (citrate 10 mM pH 5, citrate 10 mM pH 7, y citrate 10 mM / NaCl 150 mM pH 7), a múltiples temperaturas (-20°C, 4°C, 25°C, y 40°C) durante 4 semanas. Después de la incubación, las muestras se caracterizan por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico. Para los anticuerpos que contienen el dominio variable de C12 ó 510C2 (en múltiples isotipos Fc), se observan bandas adicionales, más allá de las bandas esperadas para las cadenas pesada y ligera del anticuerpo. Estas bandas se observan solamente para muestras incubadas a pH 7 (con o sin NaCl); en condiciones reductoras de la muestra, se observan dos bandas, con masas aparentes de ~8-10 kDa, y ~12-14 kDa, y en condiciones no reductoras, se observa una única banda con una masa aparente de ~8-10 kDa. El grado de escisión, determinado por las intensidades relativas de estas bandas parece ser dependiente del pH (ya que las bandas son menos intensas en muestras incubadas a pH 6, y no son evidentes para muestras incubadas a pH 5), y dependiente de la temperatura. Para determinar la localización de la escisión, y para cuantificar el grado de escisión, se caracterizan adicionalmente las mismas soluciones de anticuerpo por cromatografía líquida/espectrometría de masas (CL/EM) y secuenciación N-terminal.

- El análisis de las muestras por CL/EM se realiza del siguiente modo. Para la reducción parcial de los anticuerpos, se mezclan 4 µl de cada muestra con 36 µl de agua. Después, se mezclan 15 µl de cada solución con 0,5 µl de tampón Tris-HCl 3 M, pH 8,0 y 0,5 µl de 50 mg/ml de DTT y 45 µl de agua. Ambas soluciones de cada muestra se analizan por CL/EM. Para la desglucosilación del anticuerpo, se mezclan 3 µl de cada muestra con 60 µl de agua, 1,0 µl de tampón Tris-HCl 3 M, pH 8,0 y 1,0 µl de solución PNGasa F (PROZYME®, 1 U/ml). Las soluciones se incuban a 37°C durante 6 horas y después se analizan por CL/EM. Para la digestión completa con tripsina, se liofilizan 20 µl de cada muestra a sequedad en un sistema de vacío por velocidad y después se reconstituyen en 4,5 µl de guanidina-HCl 7 M, tampón Tris-HCl 0,4 M, pH 8,0 y 0,5 µl de 50 mg/ml de solución de DTT. Las soluciones se incuban a 37°C durante 40 minutos y después se diluyen con 95 µl de agua. Cada solución se trata con 2,0 µl de 0,5 mg/ml de tripsina porcina a 37°C durante 3 horas. Las soluciones se acidifican con ácido acético y después se analizan por CL/EM o CL/EM/EM. Las muestras intactas, parcialmente reducidas y desglucosiladas se analizan usando un micro espectrómetro de masas Waters HPCL/LCT premier o Q-TOF. El ajuste de parámetros de HPLC y espectrómetro de masas se ajusta en base a las muestras y los requisitos.

- Los espectros de masas separados para el anticuerpo C12, incubado a pH 7, y 40°C durante 4 semanas, muestra dos picos, con masas en 134894 y 145116 Da. La diferencia de masa es de aproximadamente 10220 Da entre ellos, que coincide con la masa residual esperada del péptido N-terminal 1-93 (esperado: 10221,4 Da) de la cadena ligera. Este resultado se confirma por análisis CL/EM para las muestras de reducción parcial. En esta muestra, se detectan tres masas; 23312,7, 13091,3 y 10239,4 Da, que son coherentes con la cadena ligera intacta 1-219 (esperado 23313,1 Da), el péptido C-terminal 94-219 (esperado: 13091,6 Da) y el péptido N-terminal 1-93 (esperado: 10239,4 Da) de la cadena ligera. Se obtienen resultados esencialmente idénticos también con el anticuerpo 510C2, aunque la cantidad relativa de productos de escisión es inferior para este anticuerpo. La Tabla 1 resume el porcentaje de cadena ligera escindida determinado para el análisis de las muestras parcialmente reducidas.

- También se usa secuenciación N-terminal para caracterizar las muestras incubadas. El análisis de secuencia de aminoácidos por degradación de Edman automatizada se realiza sobre muestras aplicadas a un cartucho de preparación de muestra PROSORB® utilizando el procedimiento en fase gaseosa (GP-PVDF) de Applied Biosystem Inc. (ABI). Cada resto se analiza en una columna ABI BROWNLEE® de sphere-5 PTH de 220 x 2,1 mm a 55°C con un caudal de 325 µl/minuto. Los datos se analizan utilizando el programa de análisis de datos Model 610A de ABI. Para muestras de anticuerpo incubadas a 40°C, se observan dos secuencias; para C12, las dos secuencias

observadas son "DIQMTQ" (SEC ID N° 34) que corresponde con el extremo N-terminal esperado de la cadena ligera de C12, y "PLTFGG" (SEC ID N° 35) que corresponde con los restos 94-99 de la cadena ligera de C12. Se obtienen resultados idénticos para el análisis de soluciones de anticuerpo 510C2 incubadas. Usando las cantidades relativas de cada secuencia, se calcula el grado de productos de escisión, y se resumen en la Tabla 1.

**Tabla 1. Sumario del grado de escisión en el enlace peptídico Asn93-Pro94**

Mab	% Escindido (pH 7, 4 semanas, 40°C)	
	CL/EM	Secuenciación N-terminal
C12-IgG4	22%	15-20%
C12-IgG1	21%	20-22%
C12-IgG2	14%	5-10%
510C2-IgG4	3%	5-8%
510C2-IaG1	5%	5-9%

5

### Ejemplo 2: Eliminación del sitio de escisión química en los anticuerpos C12 y 510C2

Para eliminar el sitio de escisión en C12 y 510C2, se usan sustituciones de un único aminoácido de cada aminoácido individual para reemplazar el resto de asparagina en CDRL3 de ambos anticuerpos monoclonales. Se usa ELISA para determinar los efectos de las sustituciones de los aminoácidos individuales sobre la afinidad por miostatina en comparación con los Fab C12 ó 510C2.

10

Se recubren placas ELISA con miostatina diluida a 4 ug/ml en tampón carbonato (NaHCO<sub>3</sub> 50 mM pH 8,3) y se añaden 50 µl por pocillo. Las placas se cubren con cinta de sellado y se incuban durante una noche a 4°C. Después de ello, las placas (placas con fondo en U Greiner N° Cat 650061) se lavan tres veces con PBS-T (Tween-20 al 0,1%) usando un lavador de placas automático. Se añaden 200 µl de tampón de bloqueo (PBS + BSA al 1% + Tween-20 al 0,1%) a cada pocillo y se incuban a temperatura ambiente durante una hora. Las placas se lavan y se añaden 50 µl de muestra por pocillo. Las muestras están compuestas de Fab miniprep diluidas en PBST/BSA comenzando a una dilución 1:3 y después diluidos en serie en etapas semi-log. Las placas se lavan y se añaden 50 µl de solución de anticuerpo secundario (anticuerpo de cabra anti-kappa humana-AP Southern Biotech N° Cat 2060-04 1:2000 en PBST/BSA) a cada pocillo. Después de una etapa de lavado adicional, se añaden 100 µl de substrato AP por pocillo y se incuban a temperatura ambiente durante aproximadamente 10 minutos. Se lee la absorbancia o la DO a 560 nm. Se incluye C12 ó 510C2 en cada placa ELISA como patrón de referencia de afinidad. La concentración de los Fab se determina por ELISA cuantitativo usando un anticuerpo anti-Fd (de oveja anti-Fd Biondesign) para capturar la proteína y anticuerpo de cabra anti-kappa humana-AP (Southern Biotech) para la detección. Se procesa un patrón Fab purificado en cada placa para generar una curva patrón para las determinaciones de la concentración.

15

20

25

Los Fab modificados derivados de C12 y 510C2, en los que el resto Asn en la CDRL3 está reemplazado por H o R en C12, o H, S, T, o A en 510C2, mantienen la afinidad por miostatina similar a la del Fab precursor, determinada por ELISA. Cada una de estas sustituciones produce curvas de afinidad ELISA similares al control Fab precursor respectivo determinadas por lecturas de absorbancia similares a la misma concentración de Fab (véase la Figura 4). Sin embargo, si el resto de asparagina en la CDRL3 se reemplaza por valina, prolina, glicina, glutamina, triptófano, tirosina, cisteína, leucina, isoleucina, metionina, fenilalanina, treonina, serina, lisina, alaina, ácido aspártico, o ácido glutámico en C12, o arginina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, tirosina, valina, triptófano, o prolina en 510C2, cada una de estas sustituciones reduce la afinidad de unión de los Fab modificados por miostatina en comparación con la del Fab precursor. Además, intentos en la modificación del resto Pro del dipéptido Asn-Pro fallaron porque todas las sustituciones reducen la afinidad de unión de los Fab modificados por miostatina en comparación con la del Fab precursor.

30

35

### Ejemplo 3: Comparación de escisión entre el anticuerpo C12 y la variante LC-N93H

Se incuban soluciones de anticuerpos a 1 mg/ml en fosfato 10 mM, pH 7,4 / NaCl 150 mM, a múltiples temperaturas (4°C, 25°C, y 40°C) durante 4 semanas. Después de la incubación, las muestras se caracterizan por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico y secuenciación N-terminal como se ha descrito anteriormente. En estas condiciones, se observan bandas adicionales por SDS-PAGE para la muestra de anticuerpo C12 incubada a 40°C más allá de las bandas esperadas para las cadenas pesada y ligera del anticuerpo; las bandas observadas migran a ~8 kDa en condiciones no reductoras, y ~8 kDa y ~14 kDa en condiciones reductoras. En contraste, no se observan bandas adicionales para la variante LC-N93H. La secuenciación N-terminal de las muestras incubadas confirma la escisión entre Asn93 y Pro94 en la cadena ligera que sucede en la muestra de anticuerpo C12, con ~10-20% de la secuencia correspondiente al nuevo extremo N-terminal (PLTFGG (SEC ID N° 35)), mientras que no existe secuencia adicional de cadena ligera diferente al extremo N-terminal esperado para la variante LC-N93H.

40

45

**Ejemplo 4: Ensayo de miostatina/indicador SBE**

En este ensayo indicador, un plásmido que codifica un gen de luciferasa cadena debajo de un elemento de unión a SMAD ("SBE-luciferasa"), más específicamente (CAGA)<sub>12</sub>, expresa la proteína luciferasa cuando una molécula tal como miostatina, GDF-11, u otro miembro de la superfamilia TGF- $\beta$  se une a su propio receptor, desencadenando de este modo la señalización SMAD que produce un complejo SMAD fosforilado que es capaz de unirse a SBE. La secuencia CAGA es una secuencia sensible a TGF- $\beta$  dentro del promotor del gen PAI-1 inducido por TGF- $\beta$  (Denner y col., EMBO J. 17:3091-3100, 1998). Para generar el plásmido, la secuencia repetida SBE: `tcgagagccagacaaaaagccagacatttagccagacactcgagagccagacaaaaagccagacatttagccagacactcgagagccagacaaaaagcca`  
`gacatttagccagacactcgagagccagacaaaaagccagacatttagccagacactcgagagccagacaaaaagccagacatttagccagacac` (SEC ID N° 36) se clona en el sitio NheI-HindIII del vector básico pGL-3 (Promega N°: E1751). Este plásmido se usa para transfecciones transitorias en células HEK293 EBNA.

La cantidad de luz medida es proporcional a la cantidad de luciferasa producida, que es proporcional a la cantidad de miostatina a la que están expuestas las células. La presencia de un inhibidor (por ejemplo, un anticuerpo que se une a miostatina) reduce la cantidad de miostatina disponible para activar el SBE que finalmente provoca una producción reducida de luz.

En este ensayo, se siembran células HEK293 EBNA (Edge Biosystems) en medio DMEM/F12 (3:1) (Gibco 93-0152DK), FBS al 10%, Hepes 20 mM, L-glutamina 4 mM ("Medio Completo") a aproximadamente 25000 células por pocillo en pocillos interiores recubiertos con polilisina de una placa de 96 pocillos (BD Biocoat 35-4461) y se incuban durante una noche a 37°C. El siguiente día, las células se lavan en PBS y se añaden 50  $\mu$ l de OptiMEM I (Gibco 31985-070) por pocillo. Las células se transfectan con 50  $\mu$ l de la siguiente mezcla de SBE-ADN de luciferasa: 80  $\mu$ l de Lipofectamina (Gibco 11668-019) combinada con 1,5 ml de OptiMEM y se deja sedimentar durante 5 minutos, después se añade a un tubo en el que se combinan 20  $\mu$ g de SBE-ADN de luciferasa con 1,5 ml de OptiMEM y 200  $\mu$ l de reactivo Plus, (Invitrogen), se mezcla y se deja sedimentar durante 5 minutos. Después de añadir juntas las dos mezclas, la solución se mezcla vigorosamente y se deja reposar durante 30 minutos antes de añadir 50  $\mu$ l de esta solución ("medio de transfección") a cada pocillo. Las células después se incuban durante una noche a 37°C en CO<sub>2</sub> al 5%. Para cada placa de células, se diluye miostatina (R&D Systems 788-G8) a 20 ng/ml en medio completo. Cada anticuerpo de la invención a ensayarse se titula en medio completo, por ejemplo, de aproximadamente 40  $\mu$ g/ml a aproximadamente 50 ng/ml. El medio de transfección se retira de los pocillo y se añade 50  $\mu$ l de una dilución de anticuerpo por pocillo y se añaden 50  $\mu$ l de GDF-8 (miostatina) o GDF-11 (R&D Systems) por pocillo. La placa de células después se incuba durante una noche a 37°C en CO<sub>2</sub> al 5%. El siguiente día, se aspira el medio, se lavan las células en PBS y se añade 75  $\mu$ l de tampón de lisis (Promega E266A). La actividad luciferasa en el lisado celular se mide usando reactivo luciferasa de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Promega E2620). La luminiscencia se representa frente al Log<sub>10</sub> de la concentración de Mab ( $\mu$ g/ml) y se calcula la CI<sub>50</sub> para cada Mab para miostatina y GDF-11.

El Mab C12 y un anticuerpo monoclonal modificado obtenido de C12 (C12-N93H) cuando se ensayan en estas condiciones con miostatina producen valores de CI<sub>50</sub> de aproximadamente 9,59 nM y 7,03 nM respectivamente. Ni C12 ni C12-N93H muestran actividad de neutralización en este ensayo cuando se ensayan con GDF-11 en lugar de miostatina, indicando que el anticuerpo modificado como su anticuerpo precursor se unen preferentemente a miostatina sobre GDF-11.

**LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> Eli Lilly and Company

<120> Anticuerpos anti-miostatina

<130> X17400

<140> PCTUS0776604

<141> 23-08-2007

<150> 60/824498

<151> 05-09-2006

<160> 36

<170> Patent In versión 3.4

<210> 1

<211> 109

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 404 941 T3

<400> 1

```

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
    
```

5 <210> 2  
 <211> 109  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

10 <400> 2

ES 2 404 941 T3

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> 3  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> construcción sintética

10

<400> 3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Ile Ser Tyr Met  
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
 35 40 45

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

ES 2 404 941 T3

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu  
65 70 75 80

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

<210> 4  
<211> 106  
<212> PRT  
<213> Artificial

5

<220>  
<223> construcción sintética

10

<400> 4

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Ile Ser Tyr Met  
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
35 40 45

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

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu  
65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Tyr Arg His Pro Leu Thr  
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

<210> 5  
<211> 106  
<212> PRT  
<213> Artificial

15

<220>  
<223> construcción sintética

20

<400> 5

ES 2 404 941 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Ile Ser Tyr Met  
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
 35 40 45

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

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu  
 65 70 75 80

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 6  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> construcción sintética

10

<400> 6

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Ile Ser Tyr Met  
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
 35 40 45

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

ES 2 404 941 T3

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu  
65 70 75 80

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

<210> 7  
<211> 106  
<212> PRT  
<213> Artificial

5

<220>  
<223> construcción sintética

10

<400> 7

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Ile Ser Tyr Met  
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
35 40 45

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

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu  
65 70 75 80

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

15

<210> 8  
<211> 106  
<212> PRT  
<213> Artificial

20

<220>  
<223> construcción sintética

<400> 8

ES 2 404 941 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Ile Ser Tyr Met  
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
 35 40 45

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

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu  
 65 70 75 80

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 9  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> construcción sintética

10

<400> 9

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Ile Ser Tyr Met  
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
 35 40 45

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

ES 2 404 941 T3

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu  
65 70 75 80

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

5 <210> 10  
<211> 106  
<212> PRT  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> construcción sintética  
  
<400> 10

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Ile Ser Tyr Met  
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
35 40 45

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

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu  
65 70 75 80

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

15 <210> 11  
<211> 124  
<212> PRT  
<213> Artificial

20 <220>  
<223> construcción sintética  
  
<400> 11

ES 2 404 941 T3

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

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

Gly Arg Ser Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala 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 Ser Lys Asn Gln Val  
 65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
 85 90 95

Cys Ala Arg Arg Ala Ile Thr Thr Val Ile Gly Gly Gly Thr Phe Asp  
 100 105 110

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

<210> 12  
 <211> 124  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> construcción sintética

10

<900> 12

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

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

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

ES 2 404 941 T3

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

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

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

Cys Ala Arg Arg Ala Ile Thr Thr Val Ile Gly Gly Gly Thr Phe Asp  
 100 105 110

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

5 <210> 13  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> construcción sintética  
 <400> 13

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

15 <210> 14  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> construcción sintética  
 <400> 14

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Arg  
 1 5

25 <210> 15  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

30 <220>  
 <223> construcción sintética  
 <400> 15

Gln Gln Trp Tyr Arg Asn Pro Leu Thr  
 1 5

5  
 <210> 16  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> construcción sintética

10  
 <400> 16

**Gln Gln Trp Tyr Arg His Pro Leu Thr**  
**1 5**

15  
 <210> 17  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> construcción sintética

20  
 <400> 17

**Gln Gln Trp Tyr Arg Ser Pro Leu Thr**  
**1 5**

25  
 <210> 18  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

30  
 <220>  
 <223> construcción sintética

<400> 18

**Gln Gln Trp Tyr Arg Thr Pro Leu Thr**  
**1 5**

35  
 <210> 19  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> construcción sintética

40  
 <400> 19

**Gln Gln Trp Tyr Arg Ala Pro Leu Thr**  
**1 5**

45  
 <210> 20  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> construcción sintética

50  
 <400> 20

55  
 <210> 20  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> construcción sintética

<400> 20

**Gln Gln Trp Tyr Leu Asn Pro Leu Thr**  
**1 5**

5 <210> 21  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> construcción sintética  
 <400> 21

**Gln Gln Trp Tyr Leu His Pro Leu Thr**  
**1 5**

15 <210> 22  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> construcción sintética  
 <400> 22

**Gln Gln Trp Tyr Leu Arg Pro Leu Thr**  
**1 5**

25 <210> 23  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

30 <220>  
 <223> construcción sintética  
 <400> 23

**Gly Phe Ser Leu Arg Lys Val Gly Arg Ser Val Ser**

**1 5 10**

40 <210> 24  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

45 <220>  
 <223> construcción sintética  
 <400> 24

**Gly Phe Ser Leu Arg Lys Val Gly Ser Ser Val Ser**

**1 5 10**

50 <210> 25  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

55

ES 2 404 941 T3

<220>  
<223> construcción sintética

<900> 25

5

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

<210> 26  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Artificial

10

<220>  
<223> construcción sintética

15

<400> 26

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

20

<210> 27  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Artificial

25

<220>  
<223> construcción sintética

<400> 27

**Arg Ala Ile Thr Thr Val Ile Gly Gly Gly Thr Phe Asp Tyr**  
**1 5 10**

30

<210> 28  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Artificial

35

<220>  
<223> construcción sintética

<400> 28

40

**Arg Ala Ile Thr Thr Val Ile Gly Gly Gly Thr Phe Asp Leu**  
**1 5 10**

45

<210> 29  
<211> 25  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

50

<400> 29

ES 2 404 941 T3

**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**

5  
<210> 30  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 30

**Cys Ser Gly Glu Cys Glu Phe Val Phe Leu Gln Lys Tyr Pro His**  
**1 5 10 15**

10  
  
15  
<210> 31  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 31

**Gly Glu Cys Glu Phe Val Phe Leu Gln Lys Tyr Pro His Thr His**  
**1 5 10 15**

20  
  
25  
<210> 32  
<211> 213  
<212> PRT  
<213> Artificial  
  
<220>  
<223> construcción sintética  
  
30  
<400> 32

ES 2 404 941 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Ile Ser Tyr Met  
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
 35 40 45

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

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu  
 65 70 75 80

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro  
 100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr  
 115 120

**REIVINDICACIONES**

1. Un anticuerpo monoclonal anti-miostatina que comprende una HCVR y una LCVR, en el que dicha HCVR comprende:

- 5
- a) un péptido en CDRH1 con una secuencia mostrada en la SEC ID N° 24,
  - b) un péptido en CDRH2 con una secuencia mostrada en la SEC ID N° 26,
  - c) un péptido en CDRH3 con una secuencia mostrada en la SEC ID N° 28,

y en el que dicha LCVR comprende:

- 10
- a) un péptido en CDRL1 con una secuencia mostrada en la SEC ID N° 13,
  - b) un péptido en CDRL2 con una secuencia mostrada en la SEC ID N° 14, y
  - c) un péptido en CDRL3 con una secuencia seleccionada entre las SEC ID N° 21 y 22.

2. Un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las regiones flanqueantes de la HCVR y LCVR son regiones flanqueantes humanas.

3. Un anticuerpo monoclonal anti-miostatina de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende una HCVR con una secuencia mostrada en la SEC ID N° 12 y una LCVR con una secuencia seleccionada entre las SEC ID N° 9 y 10.

- 15
4. Un anticuerpo monoclonal anti-miostatina de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende una cadena ligera con una secuencia mostrada en la SEC ID N° 32 y una cadena pesada con una secuencia mostrada en la SEC ID N° 33.

5. Una composición que comprende un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 20
6. Un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para su uso en terapia.

7. Un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para su uso en el aumento de la masa muscular en un sujeto que lo necesite.

8. Un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para su uso en el tratamiento o prevención de pérdida muscular, debilidad, sarcopenia relacionada con la edad, atrofia por desuso o caquexia.

25

**FIG. 1**

**A. Homología miostatina: GDF-11**

Miostatina	DFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYK
GDF-11	NLGLDCDEHSSESRCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYK

Miostatina	<u>ANYCSG<b>GECE</b>FVFLQKYPTH<b>L</b>VHQA</u> NPRGSAGPCCTPTK
GDF-11	ANYCSGQCEYMFQKYPTH <b>L</b> VQQA <b>N</b> PRGSAGPCCTPTK

Miostatina	MSPINMLYFNGKEQIIYGKIPAMVVDRCGCS	(SEC ID N°: 1)
GDF-11	MSPINMLYFNDKQQIIYGKIPGMVVDRCGCS	(SEC ID N°:2)

**B. Epítosos antigénicos de miostatina humana**

ANYCSG**GECE**FVFLQKYPTH**L**VHQA (SEC ID N°: 29)  
 CSG**GECE**FVFLQKY**PH** (SEC ID N°: 30)  
**GECE**FVFLQKY**PTH** (SEC ID N°: 31)

**FIG. 2**

Cadena ligera

A.

510C2 (SEC ID Nº: 3)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSISYMHWYQQKPGKAPKLLIYDTSKLARGVPSRFSGSGSGTDFT  
LTISSLQPEDFATYYCQQWYRNPLTFGGGKVEIK

510C2NH (SEC ID Nº: 4)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSISYMHWYQQKPGKAPKLLIYDTSKLARGVPSRFSGSGSGTDFT  
LTISSLQPEDFATYYCQQWYRHPLTFGGGKVEIK

510C2NS (SEC ID Nº: 5)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSISYMHWYQQKPGKAPKLLIYDTSKLARGVPSRFSGSGSGTDFT  
LTISSLQPEDFATYYCQQWYRSPLTFGGGKVEIK

510C2NT (SEC ID Nº: 6)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSISYMHWYQQKPGKAPKLLIYDTSKLARGVPSRFSGSGSGTDFT  
LTISSLQPEDFATYYCQQWYRTPLTFGGGKVEIK

510C2NA (SEC ID Nº: 7)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSISYMHWYQQKPGKAPKLLIYDTSKLARGVPSRFSGSGSGTDFT  
LTISSLQPEDFATYYCQQWYRAPLTFGGGKVEIK

C12 (SEC ID Nº: 8)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSISYMHWYQQKPGKAPKLLIYDTSKLARGVPSRFSGSGSGTDFT  
LTISSLQPEDFATYYCQQWYLNPLTFGGGKVEIK

C12NH (SEC ID Nº: 9)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSISYMHWYQQKPGKAPKLLIYDTSKLARGVPSRFSGSGSGTDFT  
LTISSLQPEDFATYYCQQWYLHPLTFGGGKVEIK

C12NR (SEC ID Nº: 10)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSISYMHWYQQKPGKAPKLLIYDTSKLARGVPSRFSGSGSGTDFT  
LTISSLQPEDFATYYCQQWYLRPLTFGGGKVEIK

Cadena pesada

B.

510C2, 510C2NH, 510C2NS, 510C2NT y 510C2NA (SEC ID Nº: 11)

QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLRKVGRSVSWIRQPPGKALEWLAHIYWDDDKRYNPS  
LRNRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYYCARRAITTVIGGGTFDYWGQGTIVTVSS

C12, C12NH y C12NR (SEC ID Nº: 12)

QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLRKVGSSVSWIRQPPGKLEWIGHIYWDDDKRLNPS  
LRNRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARRAITTVIGGGTFDLWGQGTIVTVSS

**FIG. 3**

**A.**

Nombre	CDRL1	CDRL2	CDRL3
510C2	SASSSISYMH (SEC ID N°: 13)	DTSKLAR (SEC ID N°: 14)	QQWYRNPLT (SEC ID N°: 15)
510C2NH	SASSSISYMH (SEC ID N°: 13)	DTSKLAR (SEC ID N°: 14)	QQWYRHPLT (SEC ID N°: 16)
510C2NS	SASSSISYMH (SEC ID N°: 13)	DTSKLAR (SEC ID N°: 14)	QQWYRSPLT (SEC ID N°: 17)
510C2NT	SASSSISYMH (SEC ID N°: 13)	DTSKLAR (SEC ID N°: 14)	QQWYRTPLT (SEC ID N°: 18)
510C2NA	SASSSISYMH (SEC ID N°: 13)	DTSKLAR (SEC ID N°: 14)	QQWYRAPLT (SEC ID N°: 19)
C12	SASSSISYMH (SEC ID N°: 13)	DTSKLAR (SEC ID N°: 14)	QQWYLNPLT (SEC ID N°: 20)
C12NH	SASSSISYMH (SEC ID N°: 13)	DTSKLAR (SEC ID N°: 14)	QQWYLHPLT (SEC ID N°: 21)
C12NR	SASSSISYMH (SEC ID N°: 13)	DTSKLAR (SEC ID N°: 14)	QQWYLRPLT (SEC ID N°: 22)

**B.**

Nombre	CDRH1	CDRH2	CDRH3
510C2	GFSLRKVG <u>RS</u> SVS (SEC ID N°: 23)	HIYWDDDKRYNPSLRN (SEC ID N°: 25)	RAITTVIGGGTFDY (SEC ID N°: 27)
510C2NH	GFSLRKVG <u>RS</u> SVS (SEC ID N°: 23)	HIYWDDDKRYNPSLRN (SEC ID N°: 25)	RAITTVIGGGTFDY (SEC ID N°: 27)
510C2NS	GFSLRKVG <u>RS</u> SVS (SEC ID N°: 23)	HIYWDDDKRYNPSLRN (SEC ID N°: 25)	RAITTVIGGGTFDY (SEC ID N°: 27)
510C2NT	GFSLRKVG <u>RS</u> SVS (SEC ID N°: 23)	HIYWDDDKRYNPSLRN (SEC ID N°: 25)	RAITTVIGGGTFDY (SEC ID N°: 27)
510C2NA	GFSLRKVG <u>RS</u> SVS (SEC ID N°: 23)	HIYWDDDKRYNPSLRN (SEC ID N°: 25)	RAITTVIGGGTFDY (SEC ID N°: 27)
C12	GFSLRKVGSSVS (SEC ID N°: 24)	HIYWDDDKR <u>LN</u> PSLRN (SEC ID N°: 26)	RAITTVIGGGTF <u>DL</u> (SEC ID N°: 28)
C12NH	GFSLRKVGSSVS (SEC ID N°: 24)	HIYWDDDKR <u>LN</u> PSLRN (SEC ID N°: 26)	RAITTVIGGGTF <u>DL</u> (SEC ID N°: 28)
C12NR	GFSLRKVGSSVS (SEC ID N°: 24)	HIYWDDDKR <u>LN</u> PSLRN (SEC ID N°: 26)	RAITTVIGGGTF <u>DL</u> (SEC ID N°: 28)

**Fig. 4**

Cadena ligera de N93H-C12:

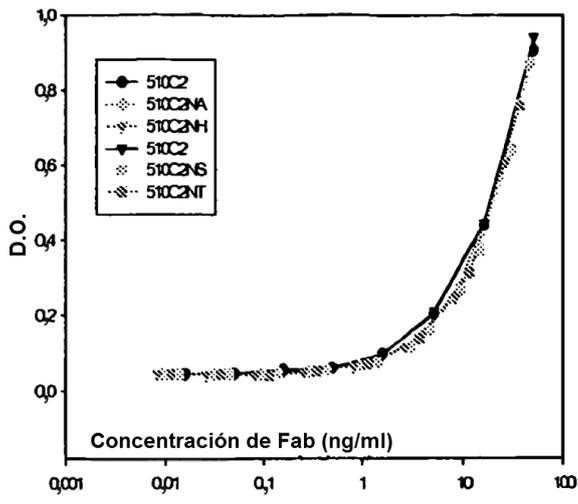
DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCSASSISYMHWYQKPGKAPKLLIYDTSKLARGVPSRFSGSGSGTDFT  
LTISSLQPEDFATYYCOOWYLHPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE  
AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC  
(SEC ID N°: 32)

Cadena pesada de N93H-C12:

QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLRKVGSSVSWIRQPPGKLEWIGHIYWDDDKRLNPSLRNRVTI  
SVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARRAITTVIGGGTDFDLWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRST  
SESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPK  
SNTKVDKRVESKYGPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVD  
GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTL  
PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFFLYSRLTVDKSRWQEGNV  
FSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLG (SEC ID N°: 33)

FIG. 5

A.



B.

