

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 514 518**

51 Int. Cl.:

C07K 16/22 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.10.2008 E 08843606 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.08.2014 EP 2215118**

54 Título: **Anticuerpos contra GDF8 y usos de los mismos**

30 Prioridad:

01.11.2007 US 1783 P

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

28.10.2014

73 Titular/es:

**WYETH LLC (100.0%)
235 East 42nd Street
New York, NY 10017-5755, US**

72 Inventor/es:

**LAVALLIE, EDWARD ROLAND;
COLLINS-RACIE, LISA ANNE;
CORCORAN, CHRISTOPHER JOHN;
TCHISTIAKOVA, LIUDMILA GENNADIEVNA;
NOWAK, JOHN ADAM;
KARIM, RIYEZ;
TAN, XIANG-YANG;
MARQUETTE, KIMBERLY ANN y
VELDMAN, GEERTRUIDA MACHTELD**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 514 518 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 contra GDF8 y usos de los mismos

Campo de la invención

5 El campo técnico de la invención se refiere al epítipo, o a epítipos, específicos contra el factor 8 de crecimiento y diferenciación (GDF8) y a antagonistas del mismo (por ejemplo, peptidomiméticos, anticuerpos anti-GDF8 (por ejemplo, anticuerpos de ratón, humanos y humanizados, fragmentos de los mismos, etc.), polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos inhibidores, etc.) que pueden usarse para inhibir la actividad de GDF8 *in vitro* y/o *in vivo*. Adicionalmente, el campo se refiere a procedimientos de inmunoensayo para la detección de GDF8 en
10 muestras biológicas, así como a procedimientos de tratamiento, mejora, prevención, diagnóstico, pronóstico y/o monitorización de trastornos asociados con GDF8 (por ejemplo, trastornos musculares, trastornos neuromusculares, trastornos óseos degenerativos, trastornos óseos inducidos o metabólicos, trastornos del tejido adiposo, trastornos del metabolismo de la glucosa o trastornos relacionados con la insulina), particularmente en mujeres potencialmente fértiles.

Antecedentes de la invención

15 El factor 8 de crecimiento y diferenciación (GDF8) conocido también como miostatina, es una proteína segregada y un miembro de la superfamilia de factores de crecimiento estructuralmente relacionados del factor beta de crecimiento transformante (TGF- β). Los miembros de esta superfamilia poseen propiedades reguladoras del crecimiento y morfogenéticas (Kingsley y col. (1994) *Genes Dev.* 8: 133-46; Hoodless y col. (1998) *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* 228: 235-72). El GDF8 humano se sintetiza como una proteína precursora de 375 aminoácidos
20 que forma un complejo homodimérico. Durante el procesamiento, el propéptido amino-terminal, conocido como "péptico asociado con latencia" (PAL), se escinde y puede permanecer unido al homodímero de manera no covalente, formando un complejo inactivo denominado "complejo latente pequeño" (Miyazono y col. (1988) *J. Biol. Chem.* 263: 6407-15; Wakefield y col. (1988) *J. Biol. Chem.* 263: 7646-54; Brown y col. (1999) *Growth Factors* 3: 35-43; Thies y col. (2001) *Growth Factors* 18: 251-59; Gentry y col. (1990) *Biochemistry* 29: 6851-57; Derynck y col. (1995) *Nature* 316: 701-05; Massague (1990) *Ann. Rev. Cell Biol.* 12: 597-641). Proteínas, tales como folistatina y proteínas relacionadas con folistatina, incluyen GASP-1 (Gamer y col. (1999) *Dev Biol.* 208: 222-232, publicación de
25 patente en Estados Unidos nº 2003-0180306-A1; publicación de patente en Estados Unidos Nº 2003-0162714-A1) y se unen a homodímeros de GDF8 maduros e inhiben la actividad biológica de GDF8.

30 Un alineamiento de la secuencia de aminoácidos deducida de GDF8 de diversas especies demuestra que GDF8 está muy conservado (McPherron y col. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94: 12457-61). Las secuencias de GDF8 de ser humano, ratón, rata, cerdo y pollo son 100 % idénticas en la región C-terminal, mientras que el GDF8 de babuino, de ganado bovino y ovino difiere en un oligómero de 3 aminoácidos en el extremo C. El alto grado de conservación de GDF8 entre especies sugiere que GDF8 tiene una función fisiológica esencial.

35 GDF8 ha mostrado que desempeña una función principal en la regulación del desarrollo y homeostasis muscular inhibiendo tanto la proliferación como la diferenciación de mioblastos y células satélite (Lee y McPherron (1999) *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9: 604-7; McCroskery y col. (2003) *J. Cell. Biol.* 162: 1135-47). Se expresa precozmente en músculo esquelético en desarrollo y continúa expresándose en músculo esquelético en adultos, preferentemente en tipos de contracción rápida. GDF8 también se ha implicado en la producción de enzimas específicas de músculo (por ejemplo, creatina quinasa) y en la proliferación de mioblastos (documento WO 00/43781).

40 La sobreexpresión de GDF8 en ratones adultos produce una pérdida muscular significativa (Zimmers y col. (2002) *Science* 296: 1486-88). De manera similar, diversos estudios realizados indican que la expresión aumentada de GDF8 está asociada con desgaste muscular inducido por el VIH (Gonzalez-Cadavid y col. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 14938-43). En cambio, ratones transgénicos GDF8 genosuprimidos (*knockout*) se caracterizan por una notable hipertrofia e hiperplasia del músculo esquelético y por una estructura ósea cortical alterada (McPherron y col. (1997) *Nature* 387: 83-90; Hamrick y col. (2000) *Bone* 27: 343-49). Además, las mutaciones naturales han
45 mostrado que inactivan el gen de GDF8 producen hipertrofia e hiperplasia tanto en animales como en seres humanos (Lee y McPherron (1997), citado anteriormente). Por ejemplo, en ganado, aumentos en la masa del músculo esquelético son obvios en mutaciones de GDF8 naturales (Ashmore y col. (1974) *Growth* 38: 501-07; Swatland y col. (1994) *J. Anim. Sci.* 38: 752-57; McPherron y col., citado anteriormente; Kambadur y col. (1997) *Genome Res.* 7: 910-15).

50 Diversos trastornos musculares y óseos en seres humanos y animales están asociados con tejido muscular funcionalmente deteriorado, y por tanto, también pueden asociarse con GDF8. Por ejemplo, GDF8 puede estar implicado en la patogénesis de esclerosis lateral amiotrófica ("ELA"), distrofia muscular ("DM"; incluyendo distrofia muscular de Duchenne, distrofia muscular facioescapular y distrofia muscular facioescapulohumeral), atrofia muscular, síndrome del túnel carpiano, atrofia orgánica, fragilidad, enfermedad pulmonar obstructiva congestiva (EPOC), sarcopenia, caquexia, y síndromes de desgaste muscular producidos por otras enfermedades y afecciones.
55

También se cree que GDF8 participa en otros numerosos procesos fisiológicos y trastornos relacionados, incluyendo homeostasis de la glucosa durante el desarrollo de la diabetes de tipo 2, tolerancia alterada a glucosa, síndromes metabólicos (es decir, síndromes (por ejemplo, síndrome X) que implican la aparición simultánea de un grupo de afecciones de la salud (que pueden incluir insulinoresistencia, obesidad abdominal, dislipidemia, hipertensión, inflamación crónica, y estado protrombótico, etc.) que pone a una persona en alto riesgo para la diabetes de tipo 2 y/o enfermedad cardíaca), insulinoresistencia (por ejemplo, resistencia inducida por traumatismos, tales como quemaduras o desequilibrio de nitrógeno), y trastornos del tejido adiposo (por ejemplo, obesidad, dislipidemia, enfermedad hepática grasa no alcohólica, etc.) (Kim y col. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 281: 902-06). Actualmente, para tratar estos trastornos existen terapias poco fiables o eficaces. La patología de estos procesos apunta al GDF8 como una posible diana en el tratamiento de estos trastornos relacionados.

Además de trastornos neuromusculares en seres humanos, también hay afecciones relacionadas con el factor de crecimiento asociadas con una pérdida de hueso, tales como osteoporosis y artrosis, que afectan predominantemente a mujeres mayores y/o postmenopáusicas. Dichas enfermedades y trastornos óseos metabólicos incluyen reducción de masa ósea debido a terapia crónica con glucocorticoides, disfunción gonadal prematura, supresión de andrógenos, déficit de vitamina D, hiperparatiroidismo secundario, deficiencias nutricionales y anorexia nerviosa. Aunque muchas terapias actuales para estas afecciones actúan inhibiendo la reabsorción ósea, un tratamiento alternativo útil sería una terapia que promoviese la formación de hueso. Dado que GDF8 desarrolla una función en el desarrollo óseo, así como en el desarrollo muscular, GDF8 es también una excelente diana farmacológica para el tratamiento de trastornos óseo degenerativos.

Al igual que otros miembros de la familia del factor- β de crecimiento transformante (TGF- β), GDF8 se sintetiza como una proteína precursora de 376 aminoácidos que contiene una secuencia señal, un dominio propeptídico N-terminal y un dominio C-terminal considerado como la molécula activa. GDF8 se segrega en una forma latente uniéndose a su propéptido (péptido asociado con latencia, PAL); el procesamiento proteolítico entre el dominio propeptídico y el dominio C-terminal produce un propéptido N-terminal y la forma madura de GDF8. La forma tanto no procesada como madura de GDF8 forma dímeros unidos por enlaces disulfuro, y el dímero de GDF8 procesado representa la única forma activa de la proteína. En suero, así como en músculo esquelético, GDF8 puede encontrarse unido a diversas proteínas que pueden modular su activación, secreción o unión a receptores.

GDF8 ejerce sus efectos a través de una familia de receptores heterotetrámicos de serina/treonina quinasa transmembrana, cuya activación potencia la transfosforilación de los receptores, lo que conduce a la estimulación de la actividad de la serina/treonina quinasa. Se ha observado que la ruta de GDF8 implica una unión activa del dímero de GDF8 con el receptor de alta afinidad, ActRIIB, que después recluta y activa la transfosforilación del receptor de baja afinidad, ALK4/ALK5. También se ha observado que las proteínas Smad 2 y Smad 3 se activan posteriormente y forman complejos con Smad 4 y después se traslocan al núcleo, que después activa la transcripción de genes diana. Lee y McPherron (*Proc Natl Acad Sci USA* 2001, 98: 9306-9311) han demostrado que el receptor ActRIIB fue capaz de mediar la influencia de GDF8 *in vivo*, como expresión de una forma negativa dominante de ActRIIB en ratones que imita la genesupresión de GDF8.

Se ha observado que bajo la influencia de GDF8, mioblastos C2C12 se acumulan en las fases G0/G1 y G2 del ciclo celular, disminuyendo consecuentemente la cantidad de células en fase S. Además, GDF8 induce la disfunción de diferenciación de mioblastos, asociada con una fuerte disminución en la expresión de marcadores de diferenciación. La expresión de GDF8 también disminuye la tasa apoptótica de células en condiciones tanto de proliferación como de diferenciación (Thomas y col., *J. Biol Chem* 2000; 275: 40235-40243).

La inhibición de la expresión de miostatina (GDF8) conduce tanto a hipertrofia como a hiperplasia muscular (Lee y McPherron, citado anteriormente; McPherron y col., *citado anteriormente*). La miostatina regula negativamente la degeneración muscular tras lesión, y la ausencia de miostatina en ratones sin GDF8 produce regeneración muscular acelerada (McCroskery y col., (2005) *J. Cell. Sci.* 118: 3531-41). Se ha observado que los anticuerpos anti-GDF8 humanos (Solicitud publicada de Estados Unidos N° 2004/0142382) se unen a GDF8 e inhiben la actividad de GDF8 *in vitro* e *in vivo*, incluyendo la actividad de GDF8 asociada con regulación negativa de masa músculo esquelética y densidad ósea. Por ejemplo, anticuerpos neutralizantes de miostatina aumentan el peso corporal la masa músculo esquelética y el tamaño y la fuerza muscular en el músculo esquelético de ratones de tipo silvestre (Whittemore y col. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 300: 965-71) y del ratón *mdx*, un modelo de distrofia muscular (Bogdanovich y col. (2002) *Nature* 420: 418-21; Wagner y col. (2002) *Ann. Neurol.* 52: 832-36). Adicionalmente, los anticuerpos contra miostatina en estos ratones disminuyen el daño al diafragma, un músculo que también se dirige durante la patogénesis de la ELA. Se ha creado la hipótesis de que la acción de factores de crecimiento, tales como HGF, sobre el músculo, puede deberse a la inhibición de la expresión de miostatina (McCroskery y col. (2005), *citado anteriormente*), ayudando de este modo a cambiar el equilibrio entre regeneración y degeneración en una dirección positiva. Sin embargo, estos anticuerpos de la técnica anterior no eran específicos para GDF8, es decir, estos anticuerpos tienen alta afinidad por otros miembros de la superfamilia de TGF- β , tales como BMP11.

Los documentos WO2007/024535, WO2006/116269, WO2008/030706, WO2007/047112, WO2005/094446, WO2003/027248 y WO2007/044411 desvelan anticuerpos contra GDF8 o miostatina y uso en terapia.

Hasta la fecha, todos los inhibidores de actividad GDF8 conocidos (por ejemplo, péptido, receptor ActRIIB soluble; anticuerpos anti-GDF8, etc.) también neutralizan las actividades biológicas de otros factores (por ejemplo, BMP11, activina, etc.) que tienen funciones biológicas importantes. Por ejemplo, activina y BMP11 desempeñan funciones importantes durante la embriogénesis. La activina βA se identifica como un factor de crecimiento gonadal crítico, y BMP11 es responsable de la transformación homeótica del esqueleto axial. Ratones *knockout* (con supresión génica) de BMP11 homocigotos son letales perinatales; ratones con un copia de tipo silvestre del gen de BMP11 son viables pero tienen defectos esqueléticos. Dado que activina y BMP11 desempeñan funciones importantes durante la embriogénesis, un antagonista que inhiba a GDF8 y otros factores, por ejemplo, BMP11 plantean riesgos teóricos de seguridad que podrían presentarse bien como toxicidad en pacientes tratados o como toxicidad reproductora, por ejemplo, en mujeres de edad fértil. Por tanto, hay una necesidad de compuestos y procedimientos de tratamiento que contribuyan a un aumento global en la masa y/o fuerza muscular y/o densidad ósea, particularmente en seres humanos, pero que no interfieran, por ejemplo, con BMP11. En otras palabras, hay una necesidad de inhibición específica de la actividad de GDF8 en los tratamientos de trastornos asociados con GDF8 para los cuales es deseable aumentar la masa, el tamaño, la fuerza muscular etc., particularmente en mujeres en edad fértil.

A medida que se están desarrollando procedimientos de uso de agentes moduladores de GDF-8, existe la necesidad de desarrollar procedimientos para monitorizar y optimizar la administración de dichos agentes a un individuo. En particular, la posibilidad de medir los niveles de proteína GDF-8 en fluidos biológicos tiene implicaciones importantes para los estudios clínicos en curso. Por ejemplo, los niveles circulantes de GDF-8 serían de diagnóstico para afecciones patológicas que podrían beneficiarse de una terapia anti-GDF-8, o podrían predecir qué individuos son más posiblemente respondedores a terapia anti-GDF-8. Además, los cambios en los niveles de GDF-8 en sangre periférica durante el tratamiento con anti-GDF-8 pueden ser un indicador precoz de respuestas medibles posteriores en la masa y/o función muscular.

Para lograr dichos objetivos de optimización, se necesitan procedimientos para detectar o monitorizar niveles de la proteína GDF-8 en fluidos biológicos, tales como suero y plasma. Es deseable monitorizar niveles de GDF-8 antes, durante y después del tratamiento con un agente modulador de GDF-8 para identificar individuos apropiados para dicho tratamiento, monitorizar respuestas contra el tratamiento y seguir el progreso después del tratamiento, por ejemplo. En particular, se necesitan procedimientos que permitan la detección y/o cuantificación de niveles de GDF-8 endógeno en respuesta a la administración de agentes moduladores de GDF-8, incluyendo inhibidores de GDF-8 y anticuerpos anti-GDF-8.

Por consiguiente, un objeto primario de la presente invención es proporcionar compuestos y procedimientos que inhiban específicamente la actividad de GDF8, así como ensayos inmunológicos, para detectar y cuantificar niveles de GDF-8 en muestras biológicas, tales como, por ejemplo, en suero y plasma.

Sumario de la invención

La invención se basa en el descubrimiento de anticuerpos o proteínas de unión a antígeno que se unen específicamente al Factor 8 de Crecimiento y Diferenciación (GDF8) que antagonizan específicamente al menos una actividad de GDF8 (por ejemplo, la unión de GDF8 con su receptor u otros sucesos de señalización mediados por GDF8). La presente invención también se basa en la identificación de los epítomos en GDF8 reconocidos por estos anticuerpos específicos contra GDF8 o proteínas de unión a antígeno, dado que los anticuerpos de la invención son específicos contra GDF8 y no se unen específicamente, por ejemplo, a BMP11.

Además de proporcionar un epítomo, o epítomos, específicos contra GDF8, la invención también proporciona antagonistas específicos para GDF8 (también denominados en este documento "antagonistas específicos de GDF8", "antagonistas de GDF8"), por ejemplo, antagonistas que antagonizan específicamente (por ejemplo, inhiben, reducen, y/o neutralizan) al menos una actividad de GDF8 (por ejemplo, sucesos de señalización mediados por GDF8 (por ejemplo, la unión de GDF8 con su receptor (por ejemplo, con su receptor ALK4/ALK5)), y no antagonizan significativamente la actividad de BMP11. La presente invención también proporciona procedimientos para detectar y cuantificar GDF-8 en muestras biológicas. En determinadas realizaciones, los procedimientos comprenden inmunoensayos, y la muestra es suero y/o plasma. La invención también proporciona kits para su uso en los procedimientos de la invención. La invención también proporciona procedimientos de uso de los antagonistas específicos de GDF8 desvelados en los procedimientos de tratamiento (que incluyen mejora, prevención, diagnóstico, pronóstico) o monitorización de trastornos asociados con GDF8, por ejemplo, trastornos musculares, trastornos neuromusculares, trastornos óseo degenerativos, trastornos óseos metabólicos o inducidos, trastornos del tejido adiposo, trastornos de metabolismo de la glucosa, trastornos relacionados con la insulina, etc.

Por tanto, en un aspecto, la invención proporciona antagonistas contra GDF8 en el que el antagonista comprende un anticuerpo anti-GDF8 o una proteína de unión a antígeno que se une específicamente a GDF8 y no se une específicamente a BMP11.

En otra realización la invención proporciona un antagonista descrito en este documento en el que el antagonista es un anticuerpo anti-GDF8, una proteína de unión a antígeno o un fragmento de la misma que se une específicamente a GDF8 pero que no se une específicamente a BMP11, en el que el anticuerpo o la proteína de unión a antígeno se

5 selecciona del grupo que consiste en: un anticuerpo policlonal; un anticuerpo monoclonal; un anticuerpo mono-específico; un anticuerpo poliespecífico; un anticuerpo humanizado; un anticuerpo tetramérico; un anticuerpo tetravalente; un anticuerpo multiespecífico; un anticuerpo monocatenario; un anticuerpo específico de dominio; un anticuerpo de un solo dominio; un anticuerpo con dominio delecionado; una proteína de fusión; una proteína de fusión ScFc; un anticuerpo quimérico; un anticuerpo sintético; un anticuerpo recombinante; un anticuerpo híbrido; un anticuerpo mutado; anticuerpos con CDR injertadas; un fragmento de anticuerpo que puede incluir un fragmento Fab; F(ab')₂; y Fab'; un fragmento Fv; un fragmento Fv monocatenario (ScFv); un fragmento Fd; un fragmento dAb; una proteína de unión a que puede incluir diacuerpos; un péptido CDR3; un péptido de restricción FR3-CDR3-FR4; un nanocuerpo; un nanocuerpo bivalente; productos inmunofarmacéuticos modulares pequeños (SMIP); un dominio IgNAR variable de tiburón; y un minicuerpo. En algunas realizaciones el antagonista de la invención es un anticuerpo monoclonal. En algunas realizaciones el antagonista de la invención es un anticuerpo humanizado

10 En algunas realizaciones, el anticuerpo o proteína de unión a antígeno de la invención comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 14 y la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 17.

15 En algunas realizaciones, el antagonista de la invención es un anticuerpo anti-GDF8, una proteína de unión a antígeno o un fragmento de los mismos que comprende una cadena pesada que comprende una primera, segunda y tercera CDR, en el que la primera CDR comprende un aminoácido seleccionado de la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 19; y la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 25, la segunda CDR comprende un aminoácido seleccionado de la secuencia de SEC ID N°: 20; y la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 26 y la tercera CDR
20 comprende un aminoácido seleccionado de la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 21; y la secuencia de aminoácidos SEC ID N°: 27 y que comprende una cadena ligera que comprende una primera, segunda y tercera CDR, en el que la primera CDR comprende un aminoácido seleccionado de la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 22; y la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 28, la segunda CDR comprende un aminoácido seleccionado de la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 23; y la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 29, la tercera CDR
25 comprende un aminoácido seleccionado de la secuencia de aminoácidos SEC ID N°: 24; y la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 30. En algunas realizaciones el antagonista de la invención es un anticuerpo anti-GDF8 o una proteína de unión antígeno que comprende una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 16; y la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 18.

30 En algunas realizaciones el antagonista de la invención es un anticuerpo anti-GDF8 o una proteína de unión a antígeno que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 16, y adicionalmente comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 14. En algunas realizaciones el antagonista de la invención es un anticuerpo anti-GDF8 o proteína de unión a antígeno que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 18, y adicionalmente
35 comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 17. En algunas realizaciones, la invención proporciona un polinucleótido que codifica uno cualquiera o más de los aminoácidos que comprenden los antagonistas de GDF8 de la invención, como se describe en el presente documento.

40 En algunas realizaciones, la invención proporciona una célula hospedadora que comprende uno cualquiera o más polinucleótidos de la invención, en la que el polinucleótido está unido operativamente a una secuencia reguladora. En otra realización, la invención proporciona un vector que comprende cualquiera de los polinucleótidos de la invención. En otra realización, la invención proporciona una célula hospedadora que comprende un vector que comprende uno cualquiera o más de los polinucleótidos de la invención.

45 En algunas realizaciones para producir un antagonista de GDF8 a partir de un cultivo de una célula hospedadora como se desvela en este documento, la invención proporciona un procedimiento que comprende uno cualquiera o más de los polinucleótidos de la invención y aislar el antagonista de GDF8 expresado por la célula hospedadora. En otra realización más la invención proporciona un antagonista de GDF8 aislado producido por el procedimiento para la producción de un antagonista de GDF8 como se describe en el presente documento.

50 La divulgación proporciona un ensayo para detectar la presencia de GDF8 en una muestra de un sujeto que comprende las siguientes etapas: combinar (i) la muestra con (ii) un reactivo de captura que se une específicamente a GDF8 y (iii) un reactivo de detección que se une específicamente a GDF8 y detecta si se produce o no la unión específica entre el reactivo de captura y GDF8 en el que la detección de la unión específica indica la presencia de GDF8 en la muestra.

55 En una realización de la divulgación el GDF8 en la muestra está dissociado de las proteínas de unión a GDF8 y del anti-GDF8 presente en la muestra. En una realización, el ensayo de la invención comprende adicionalmente combinar la muestra con un tampón ácido antes de la combinación de la muestra con el reactivo de captura, como se describe en este documento. En otra realización el tampón ácido del ensayo de la invención tiene un pH entre aproximadamente 1,0 y 6,0. En otra realización el pH del tampón ácido es de aproximadamente 2,5.

En una realización, la divulgación proporciona uno cualquiera o más de los ensayos descritos en este documento en los que la muestra se selecciona de un grupo que consiste en suero, sangre entera, plasma, muestras de biopsia,

muestras de tejido, suspensión celular, saliva, líquido oral, líquido cefalorraquídeo, líquido amniótico, leche, calostro, secreción de glándula mamaria, linfa, orina, sudor, líquido lagrimal, líquido gástrico, líquido sinovial y mucosidad. En otra realización, la invención estipula que la muestra se seleccione de sangre entera, suero o plasma.

5 En una realización, la divulgación proporciona uno cualquiera o más de los ensayos descritos en este documento en los que la etapa de detección comprende al menos uno de un ensayo de tipo sándwich y un ensayo de unión competitiva. En algunas realizaciones la etapa de detección comprende un ensayo de tipo sándwich. En algunas realizaciones, la etapa de detección comprende al menos uno de: detectar un cambio en el índice refractario en una superficie óptica sólida en contacto con la muestra; detectar un cambio de luminiscencia; medir un cambio de color; 10 detectar un cambio de radioactividad; medir usando interferometría de biocapa; medir usando detección cantiléver; medir usando formación de imágenes intrínsecas sin etiqueta; y medir usando detección acústica. En algunas realizaciones, la etapa de detección de la invención mide un cambio de color. En algunas realizaciones, la etapa de detección comprende un ensayo seleccionado del grupo que consiste en: un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA); un ensayo electroquimioluminiscente (ECL); radioinmunoensayo (RIA); radioinmunoensayo en fase sólida (SPRIA); inmunotransferencia; inmunoprecipitación; Clasificación de Células Activadas por Fluorescencia (FACS). En otra realización, la etapa de detección comprende un ELISA.

15 En una realización la presencia de GDF8 se detecta por la unión específica de un compuesto con el reactivo de detección que se une específicamente a GDF8 en el que el compuesto comprende adicionalmente un marcador detectable. En otra realización el marcador detectable comprende al menos un marcador seleccionado del grupo que consiste en un marcador enzimático; un marcador luminiscente; un marcador proteico; un marcador de vitaminas; un 20 marcador cromofórico; un marcador radioisotópico y un marcador molecular de densidad electrónica. En otra realización el marcador detectable es un marcador proteico y comprende adicionalmente biotina.

25 En una realización, el ensayo proporciona un reactivo de captura que se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo anti-GDF8, una proteína de unión a antígeno o fragmentos de los mismos; una proteína de unión a GDF8; y un dominio de unión a GDF8. En otra realización, el ensayo estipula que el reactivo de captura es un anticuerpo anti-GDF8, una proteína de unión a antígeno o fragmentos de los mismos y selecciona del grupo que consiste en RK35, RK22, MYO-028, MYO-029 y JA16. En algunas realizaciones el reactivo de captura es RK35. En algunas realizaciones el reactivo de captura es RK22.

30 En una realización del ensayo la divulgación estipula que el reactivo de detección se seleccione del grupo que consiste en: un anticuerpo anti-GDF8; una proteína de unión a antígeno o fragmentos de los mismos; una proteína de unión a GDF8 y un dominio de unión a GDF8. En una realización, el reactivo de detección es un anticuerpo anti-GDF8, una proteína de unión a antígeno o fragmentos de los mismos y se selecciona del grupo que consiste en: RK22 y RK35. En otra realización, el ensayo estipula que el reactivo de detección es RK35. En otra realización, el ensayo estipula que el reactivo de detección es RK22.

35 En una realización la divulgación proporciona un ensayo en el que el reactivo de captura proporcionado es RK22 y el reactivo de detección es RK35. En otra realización, la divulgación proporciona un ensayo en el que el reactivo de captura es RK35 y el reactivo de detección es RK22.

40 La divulgación proporciona un ensayo para cuantificar la presencia de GDF8 en una muestra de un sujeto que comprende las siguientes etapas: combinar (i) la muestra con (ii) un reactivo de captura que se une específicamente a GDF8 y (iii) un reactivo de detección que se une específicamente a GDF8, detectando se produce o no la unión específica entre el reactivo de captura y GDF8 y cuantificar el nivel de GDF8 en la muestra, en el que la detección de la unión específica indica la presencia de GDF8 en la muestra y puede cuantificarse. La divulgación proporciona el GDF8 en la muestra disociado de las proteínas de unión a GDF8 y del anti-GDF8 presente en la muestra. En una realización, el ensayo comprende adicionalmente combinar la muestra con un tampón ácido antes de la combinación de la muestra con el reactivo de captura, como se describe en este documento. En otra realización el tampón de 45 ensayo ácido tiene un pH entre aproximadamente 1,0 y 6,0. En otra realización el pH del tampón ácido es de aproximadamente 2,5.

50 En otro aspecto, la divulgación proporciona una composición farmacéutica para el tratamiento (que incluye mejora y/o prevención) de un trastorno asociado con GDF8 en un sujeto que comprende un transportador farmacéuticamente aceptable y al menos un antagonista de GDF8 se selecciona del grupo que consiste en un péptidomimético de un dominio de unión a GDF8; un ácido nucleico aislado que codifica un aminoácido para un péptidomimético de un dominio de unión a GDF8; un polinucleótido inhibidor específico contra GDF8 y un anticuerpo anti-GDF8, proteína de unión a antígeno o fragmentos de los mismos que se une específicamente a GDF8 y que no se une específicamente a BMP11.

55 En una realización la composición farmacéutica de la divulgación comprende un péptidomimético de un dominio de unión específico para GDF8 que consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 4; la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 6; la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 8; la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 10; y la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 12.

En una realización, la composición farmacéutica de la invención comprende un ácido nucleico aislado que codifica un aminoácido específico contra GDF8 que consiste esencialmente en una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en la secuencia de ácido nucleico de SEC ID N°: 3; la secuencia de ácido nucleico de SEC ID N°: 5; la secuencia de ácido nucleico de SEC ID N°: 7; la secuencia de ácido nucleico de SEC ID N°: 9; la secuencia de ácido nucleico de SEC ID N°: 11 y las secuencias de ácido nucleico de fragmentos de las mismas.

En una realización, la composición farmacéutica de la invención comprende un anticuerpo anti-GDF8, proteína de unión antígeno o fragmentos de los mismos que se une específicamente a GDF8 y que no se une específicamente a BMP11 que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 16, y en el que el anticuerpo comprende adicionalmente una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 14. En otra realización, la composición farmacéutica de la invención proporciona un anticuerpo anti-GDF8, proteína de unión antígeno o fragmentos de los mismos, que se une específicamente a GDF8 y que no se une específicamente a BMP11 que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 18, y en el que el anticuerpo, proteína de unión a antígeno o fragmentos de los mismos comprende adicionalmente una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 17.

En una realización, la composición farmacéutica de la invención se usa para tratar un trastorno asociado con GDF8 seleccionado del grupo que consiste en un trastorno muscular, un trastorno neuromuscular, un trastorno óseo degenerativo, un trastorno óseo metabólico o inducido, un trastorno del tejido adiposo, un trastorno del metabolismo de la glucosa, y un trastorno relacionado con la insulina en un paciente mamífero. En otra realización, la composición farmacéutica de la invención en la que el trastorno se asocia con GDF8 se selecciona del grupo que consiste en distrofia muscular, ELA, atrofia muscular, atrofia orgánica, síndrome del túnel carpiano, fragilidad, enfermedad pulmonar obstructiva congestiva, sarcopenia, caquexia, síndromes de desgaste muscular, obesidad, diabetes de tipo 2, tolerancia a glucosa alterada, síndromes metabólicos, insulinoresistencia, trastornos nutricionales, disfunción gonadal prematura, supresión de andrógenos, hiperparatiroidismo secundario, osteoporosis, osteopenia, artrosis, reducción de masa ósea, déficit de vitamina D y anorexia nerviosa.

Otro aspecto de la invención proporciona un procedimiento de tratamiento (que incluye mejora y/o prevención) de un trastorno asociado con GDF8 en un paciente mamífero que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista específico de GDF8 que tiene de poca a ninguna toxicidad. En otra realización el procedimiento de la invención estipula que el antagonista de la invención se seleccione del grupo que consiste en un anticuerpo anti-GDF8, proteína de unión a antígeno o fragmentos de los mismos que se une específicamente a GDF8 y que no se une específicamente a BMP11.

En una realización de la invención se proporciona un procedimiento de tratamiento en el que el antagonista de la invención es un anticuerpo anti-GDF8, proteína de unión antígeno o fragmentos de los mismos, que se une específicamente a GDF8 y que no se une específicamente a BMP11 y comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 16, y adicionalmente comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 14. En algunas realizaciones el procedimiento de tratamiento de la invención estipula que el antagonista de la invención es un anticuerpo anti-GDF8, proteína de unión antígeno o fragmentos de los mismos, que se une específicamente a GDF8 y no se une específicamente a BMP11 que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 18 y en el que el anticuerpo, proteína de unión a antígeno o fragmentos de los mismos, comprende adicionalmente una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 17.

En una realización de la invención, el procedimiento del tratamiento de la invención estipula que el trastorno asociado con GDF8 se selecciona del grupo que consiste en un trastorno muscular, un trastorno neuromuscular, un trastorno óseo degenerativo, un trastorno óseo metabólico o inducido, un trastorno del tejido adiposo, un trastorno del metabolismo de la glucosa, y un trastorno relacionado con la insulina en un sujeto. En algunas realizaciones de la invención el procedimiento del tratamiento de la invención estipula que el trastorno que se asocia con GDF8 se selecciona del grupo que consiste en distrofia muscular, ELA, atrofia muscular, atrofia orgánica, síndrome del túnel carpiano, fragilidad, enfermedad pulmonar obstructiva congestiva, sarcopenia, caquexia, síndromes de desgaste muscular, obesidad, diabetes de tipo 2, tolerancia a glucosa alterada, síndromes metabólicos, insulinoresistencia, trastornos nutricionales, disfunción gonadal prematura, supresión de andrógenos, hiperparatiroidismo secundario, osteoporosis, osteopenia, artrosis, reducción de masa ósea, déficit de vitamina D y anorexia nerviosa.

Otro aspecto de la divulgación proporciona un procedimiento de diagnóstico, pronóstico o detección de si un sujeto padece un trastorno asociado con GDF8 que comprende las etapas de: obtener una primera muestra del sujeto; combinar una primera muestra con el antagonista de la invención; detectar la presencia de GDF8 en la primera muestra; cuantificar el nivel de GDF8 en la primera muestra; obtener una segunda muestra de un sujeto que no padece trastorno asociado con GDF8, combinar la segunda muestra con el antagonista; detectar el nivel de GDF8 en la segunda muestra; cuantificar el nivel de GDF8 en la segunda muestra y comparar los niveles de GDF8 en la primera y segunda muestra, en el que un aumento, disminución o similitud en el nivel de GDF8 en la segunda muestra en comparación con la primera muestra indica si ha cambiado la gravedad del trastorno asociado con GDF8.

- 5 Otro aspecto de la divulgación proporciona un procedimiento para controlar la gravedad de un trastorno asociado con GDF8 que comprende las etapas de: (i) obtener una primera muestra del sujeto; (ii) combinar una primera muestra con el antagonista como en una cualquiera de las reivindicaciones 1-18; (iii) detectar la presencia de GDF8 en la primera muestra; (iv) cuantificar el nivel de GDF8 en la primera muestra; (v) obtener una segunda muestra de un sujeto que no padezca el trastorno asociado con GDF8; (vi) combinar la segunda muestra con el antagonista; (vii) detectar el nivel de GDF8 en la segunda muestra; (viii) cuantificar el nivel de GDF9 en la segunda muestra y (ix) comparar los niveles de GDF8 en la primera y segunda muestra, en el que un aumento, disminución o similitud en el nivel de GDF8 en la primera muestra en comparación con la segunda muestra indica si ha cambiado la gravedad del trastorno asociado con GDF8.
- 10 Otro aspecto de la divulgación proporciona un procedimiento para pronosticar la probabilidad de que un sujeto desarrolle un trastorno asociado con GDF8 que comprende las etapas de: (i) obtener una primera muestra del sujeto; (ii) combinar una primera muestra con el antagonista como en una cualquiera de las reivindicaciones 1-16; (iii) detectar la presencia de GDF8 en la primera muestra; (iv) cuantificar el nivel de GDF8 en la primera muestra; (v) obtener una segunda muestra de un sujeto que no padezca el trastorno asociado con GDF8; (vi) combinar la segunda muestra con el antagonista; (vii) detectar el nivel de GDF8 en la segunda muestra; (viii) cuantificar el nivel de GDF9 en la segunda muestra y (ix) comparar los niveles de GDF8 en la primera y segunda muestra, en el que un aumento, disminución o similitud en el nivel de GDF8 en la segunda muestra en comparación con la primera muestra indica la probabilidad de que el sujeto desarrolle un trastorno asociado con GDF8.
- 15 Otro aspecto de la divulgación proporciona un procedimiento para pronosticar la probabilidad de que un sujeto desarrolle un trastorno asociado con GDF8 que comprende las etapas de: (i) obtener una primera muestra del sujeto; (ii) combinar una primera muestra con el antagonista como en una cualquiera de las reivindicaciones 1-16; (iii) detectar la presencia de GDF8 en la primera muestra; (iv) cuantificar el nivel de GDF8 en la primera muestra; (v) obtener una segunda muestra de un sujeto que no padezca el trastorno asociado con GDF8; (vi) combinar la segunda muestra con el antagonista; (vii) detectar el nivel de GDF8 en la segunda muestra; (viii) cuantificar el nivel de GDF9 en la segunda muestra y (ix) comparar los niveles de GDF8 en la primera y segunda muestra, en el que un aumento, disminución o similitud en el nivel de GDF8 en la primera muestra en comparación con la segunda muestra indica la probabilidad de que el sujeto desarrolle un trastorno asociado con GDF8.
- 20 Otro aspecto de la divulgación proporciona el uso de una composición farmacéutica en la preparación de un medicamento para el tratamiento (que incluye mejora y/o prevención) de un trastorno asociado con GDF8 en un paciente mamífero en el que la composición farmacéutica comprende un transportador farmacéuticamente detectable y al menos un antagonista de GDF8 seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo anti-GDF8, una proteína de unión a antígeno o fragmento de los mismos, que se une específicamente a GDF8 y que no se une específicamente a BMP11.
- 25 Otro aspecto de la divulgación proporciona un kit para detectar la presencia de GDF8 en una muestra de un sujeto, comprendiendo el kit un reactivo de captura que se une específicamente a GDF8 y un reactivo de detección que se une específicamente a GDF8 en el que la detección de la unión específica de GDF8 con los reactivos de captura y de detección indican la presencia de GDF8 en la muestra. En algunas realizaciones, el kit comprende adicionalmente un tampón ácido.
- 30 Otro aspecto de la divulgación proporciona un kit para la cuantificación de GDF8 en una muestra de un sujeto, comprendiendo el kit un reactivo de captura que se une específicamente a GDF8 y un reactivo de detección que se une específicamente a GDF8 en el que la detección de la unión específica de GDF8 con los reactivos de captura y de detección permite la cuantificación de GDF8 en la muestra. En algunas realizaciones, el kit comprende adicionalmente un tampón ácido.
- 35 En otro aspecto la invención proporciona un anticuerpo como se describe en este documento en el que el anticuerpo es un anticuerpo anti-GDF8, proteína de unión a antígeno o fragmento de los mismos, que se une específicamente a GDF8 pero que no se une específicamente a BMP11, en el que el anticuerpo o proteína de unión a antígeno se selecciona del grupo que consiste en: un anticuerpo policlonal; un anticuerpo monoclonal; un anticuerpo monoespecífico; un anticuerpo poliespecífico; un anticuerpo humanizado; un anticuerpo tetramérico; un anticuerpo tetravalente, un anticuerpo multiespecífico; un anticuerpo monocatenario; un anticuerpo específico de dominio; un anticuerpo de un solo dominio; un anticuerpo con dominio delecionado; una proteína de fusión; una proteína de fusión ScFc; un anticuerpo quimérico; un anticuerpo sintético; un anticuerpo recombinante; un anticuerpo híbrido; un anticuerpo mutado; anticuerpos con CDR injertadas; un fragmento de anticuerpo que puede incluir un fragmento Fab; un fragmento F(ab')₂; un fragmento Fab'; un fragmento Fv; un fragmento FV monocatenario (ScFv); un fragmento Fd; un fragmento dAb; una proteína de unión a antígeno que puede incluir diacuerpos; un péptido CDR3; un péptido FR3-CDR3-FR4 restringido; un nanocuerpo; un nanocuerpo bivalente; productos inmunofarmacéuticos modulares pequeños (SMIP); un dominio IgNAR variable de tiburón; y un minicuerpo. En algunas realizaciones el antagonista de la invención es un anticuerpo monoclonal. En algunas realizaciones el antagonista de la invención es un anticuerpo humanizado. En algunas realizaciones el anticuerpo es un anticuerpo anti-GDF8. En algunas realizaciones el anticuerpo de la invención es un anticuerpo anti-GDF8 o proteína de unión antígeno que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID: N^o: 16, y adicionalmente comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N^o: 14. En algunas realizaciones el
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60

ES 2 514 518 T3

anticuerpo de la invención es un anticuerpo anti-GDF8 o proteína de unión antígeno que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 18 y adicionalmente comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 17.

Breve descripción de las secuencias

- 5 Las secuencias de ADN y de aminoácidos se exponen en el listado de secuencias y se enumeran en la Tabla 1.

TABLA 1

SEC ID N°	DESCRIPCIÓN
1	sec. de A.A. de GDF8 humano maduro
2	sec. de A.A. del precursor de GDF8 humano
3	sec. de ADN peptidomimética (GE1)
4	sec. de A.A. peptidomimética (GE1)
5	sec. de ADN peptidomimética (GE2)
6	sec. de A.A. peptidomimética (GE2)
7	sec. de ADN peptidomimética (GE3)
8	sec. de A.A. peptidomimética (GE3)
9	sec. de ADN peptidomimética (GE4)
10	sec. de A.A. peptidomimética (GE4)
11	sec. de ADN peptidomimética (GE5)
12	sec. de A.A. peptidomimética (GE5)
13	sec. de ADN de RK22 VH de ratón
14	sec. de A.A. de RK22 VH de ratón
15	sec. de ADN de RK22 VL de ratón
16	sec. de A.A. de RK22 VL de ratón
18	sec. de A.A. de RK22 VL humanizada
17	sec. de A.A. de RK22 VH humanizada
19	sec. de A.A. de CDR H1 (Kabat)
20	sec. de A.A. de CDR H2 (Kabat)
21	sec. de A.A. de CDR H3 (Kabat)
22	sec. de A.A. de CDR L1 (Kabat)
23	sec. de A.A. de CDR L2 (Kabat)
24	sec. de A.A. de CDR L3 (Kabat)
25	sec. de A.A. de CDR H1 (AcM)
26	sec. de A.A. de CDR H2 (AcM)
27	sec. de A.A. de CDR H3 (AcM)
28	sec. de A.A. de CDR L1 (AcM)
29	sec. de A.A. de CDR L2 (AcM)

(continuación)

SEC ID Nº	DESCRIPCIÓN
30	sec. de A.A. de CDR L3 (AcM)
31	sec. de ADN de RK35 VH
32	sec. de ADN de RK35 VL
33	sec. de ADN de MYO-029 VH
34	sec. de ADN de MYO-029 VL
35	sec. de ADN de ActRIIB
36	sec. de A.A. de ActRIIB

Breve descripción de los dibujos

5 Las Figuras 1A y 1B demuestran la unión (O.D. 450 nm; eje y) de diversas concentraciones (ng/ml; eje x) de sobrenadante de RK22 y RK35 (un anticuerpo de control que se une tanto a GDF8 como a BMP11) que expresa hibridomas contra GDF8 o BMP11.

La Figura 2 muestra las constantes de velocidad cinética de la interacción entre el anticuerpo RK22 y GDF8 determinada por la microplaca detectora SA del sistema BIAcore 2000.

10 La Figura 3 muestra la inducción de la actividad del gen indicador del promotor de TGF- β , pGL3 (CAGA)¹², medida por actividad luciferasa (LCFS; eje y) en células de rabdosarcoma A204 tratadas con 10 ng/ml de GDF8 en ausencia (10 mg/ml) o en presencia de diversas concentraciones (lg M; eje x) de los anticuerpos RK22 y RK35 y otros anticuerpos RK (A a E) que se unen a GDF8 y/o a BMP11.

La Figura 4 muestra el peso (g; eje y) del músculo gastrocnemio (Gastroc), cuádriceps (Cuad), y tibial anterior (Tibialis anterior) diseccionado de ratones SCID después de cuatro semanas de tratamiento con vehículo en ausencia (vehículo), o presencia de 1, 10 o 40 mg/kg/semana de RK22 o Myo-29.

15 La Figura 5 muestra la unión a ActRIIB (OD450; eje y) sólo por GDF8 o GDF8 preincubado con diversas concentraciones ([M]; eje x) de RK22, anticuerpo no específico, otros anticuerpos RK (D y E), un anticuerpo de control que bloquea la unión de GDF8 con ActRIIB (RK35), anticuerpo IgG de control o ActRIIB soluble.

La Figura 6 muestra las transferencias puntuales resultantes del mapeo epitópico de 20 ng/ml de un anticuerpo de control, anticuerpo RK22, incubado con 48 péptidos de 13 restos individuales y solapantes que representan todo el péptido GDF8 maduro. Debajo de cada transferencia puntual se encuentra la secuencia de GDF8 con los epitopos de GDF8 para los anticuerpos subrayados (como se indica en las transferencias puntuales respectivas).

20 La Figura 7 muestra el alineamiento del dominio de cadena pesada variable de RK22 (RK22_VH) con las secuencias marco conservadas (FW) de la línea germinal humana de DP-7 (DP-7_lgerm_VH) y DP-5 (DP-5_lgerm_VH); los amino ácidos del dominio de cadena pesada variable de RK22 murino que están cambiados en el dominio de cadena pesada variable de RK22 humanizado se indican con un asterisco y las CDR de RK22 se indican en recuadro y subrayadas.

La Figura 8 muestra el alineamiento del dominio de cadena ligera variable de RK22 con la secuencia marco conservada de la línea germinal humana de VL de DPK 24; los aminoácidos del dominio de cadena ligera variable de RK22 murino que están cambiados en el dominio de cadena ligera variable de RK22 humanizado se indican con un asterisco y las CDR de RK22 se indican en recuadro y subrayadas.

30 La Figura 9A muestra una comparación de formatos de inmunoensayo: RK35, como reactivo de captura y RK22 biotinilado como reactivo de detección. La Figura 9B muestra a RK22 como anticuerpo de captura con RK35 biotinilado como anticuerpo de detección.

35 La Figura 10 demuestra que el ensayo ELISA previamente descrito muestra un fondo, y que este fondo es probablemente un efecto del anticuerpo anti-ratón humano (HAMA). El fondo del ensayo se debió a la reactividad cruzada con suero con el anticuerpo monoclonal RK22 que se usó como anticuerpo de captura en el ELISA. Cuando se usa RK35 como anticuerpo de captura (datos no mostrados), se observa el mismo efecto.

La Figura 11 muestra los resultados de un ELISA GDF-8 en el que la placa se revistió con el anticuerpo RK35 y el fondo del ELISA se redujo usando el reactivo RII (Reactivo de Inhibición de Inmunoglobulina-Bioreclamation, NY) disponible en el comercio. Los resultados usando RII se comparan favorablemente con el fondo solo con tampón.

40 La Figura 12 muestra que el anticuerpo RK35 no se une a GDF-8 en presencia de MYO-029. Las placas de ensayo HBX se revistieron con el anticuerpo MYO-029 y se añadió GDF-8 a 1200 pg/ml con concentraciones crecientes de anticuerpos de detección biotinilados (RK22 o RK35). Con el anticuerpo RK35 biotinilado no se produjo señal. Los resultados indican reactividad cruzada entre RK35 y MYO-029 para la unión con GDF-8.

45 Las Figuras 13A y 13B muestran que MYO-029 pueden usarse como un inhibidor de GDF-8 en un ensayo ELISA. Se ensayaron concentraciones crecientes de MYO-029 con una concentración constante de GDF-8 (250 pg/ml) añadida en el tampón de ensayo o en el suero humano al 10 % para GDF-8 mediante ELISA. La Figura

13A muestra que hay una inhibición de señal de aproximadamente del 30 % cuando se usa RK22 como anticuerpo de captura. La Figura 13B muestra que la inhibición es casi del 100 % (de 5 a 20 mg/ml de MYO-029) cuando se utilizó RK35 como anticuerpo de captura. También se muestra la reducción en la señal de fondo (suero) mediante el uso de 2IR (conocido también como "RII"). La señal total se muestra en ambas gráficas y no se ha convertido a porcentaje de inhibición.

Las Figuras 14A y 14B muestran el resultado de un "experimento de recuperación de adición", en el que se añadió GDF-8 a suero al 100 % en tres muestras de suero distintas (Suero n1, n2, y n3). Cada muestra se analizó con MYO-029 +/- 20 µg/ml. La adición de MYO-029 20 µg/ml bloquea la señal del ensayo en todas las concentraciones de GDF-8 ensayadas (Figura 13A). La Figura 13B muestra los resultados de un ensayo de recuperación de adición en el que se añadió suero pero no MYO-029. Los resultados muestran un aumento lineal en la señal con la adición de GDF-8.

La Figura 15 muestra una comparación de curvas patrón generadas en suero de ratón normal, ratón *knockout* (KO) y de ser humano. La pendiente de la curva sólo con tampón THST es mucho más pronunciada que las generadas en suero y no pueden utilizarse para cuantificar valores en suero.

La Figura 16 demuestra valores observados frente a esperados de GDF8 generados en tampón THST.

La Figura 17 presenta los resultados de un experimento en el que éste muestra que el MYO-029 puede inactivarse/disociarse de GDF-8 cuando se calienta a aproximadamente 80 °C. Se añadieron a las muestras de suero GDF-8 o GDF-8 latente +/- 5 µg/ml de MYO-029 y se calentaron a 80 °C. Los resultados muestran que el calentamiento de las muestras de MYO-029 restablece la capacidad de detectar GDF-8, lo que indica que MYO-029 se disocia de GDF-8 y se activa después de un calentamiento a 80 °C. Los resultados también muestran que cuando MYO-029 se añade de nuevo a la muestra calentada, la señal de GDF-8 se reduce de nuevo una vez más. También muestra un aumento de la señal de GDF-8 endógeno después del calentamiento que es incluso más pronunciado en muestras a las que se añade GDF-8 latente en comparación con muestras con GDF-8 maduro.

La Figura 18 muestra los resultados de un ensayo ELISA de GDF-8 antes y después del empobrecimiento de GDF-8 del suero humano. Se analizó suero humano normal +/- 20 µg/ml de MYO-029 para GDF-8 a temperatura ambiente ("TA"), y después de calentar a 80 °C. Estos valores se compararon con las mismas muestras que se empobrecieron primero de GDF-8 por precalentamiento a 65 °C durante 10 minutos, y se hicieron pasar tres veces sobre una columna de afinidad MYO-029 de 1 mg. Los resultados indican que el empobrecimiento de GDF-8 del suero humano es eficaz para reducir el nivel de fondo de GDF-8 en este ELISA. Los resultados también muestran que el calentamiento del suero empobrecido no muestra el aumento original de señal que se observa con el suero normal después del calentamiento. Este suero calentado/empobrecido (C/E) en GDF-8 puede usarse para la generación de curvas patrón GDF-8.

La Figura 19 muestra una gráfica de curvas patrón que se generaron en suero calentado, empobrecido en GDF-8, y al que después se le añadieron concentraciones crecientes de GDF-8 maduro o GDF-8 latente. Las curvas patrón se ensayaron a temperatura ambiente (TA) o con calentamiento a 80 °C. Las muestras de suero a las cuales se añadió GDF-8 latente muestran un gran aumento de señal después del calentamiento que no se observó en muestras a las que se había añadido GDF-8 maduro.

La Figura 20 muestra el análisis del recorrido de dos curvas patrón en diferentes placas durante dos días sucesivos. Se utilizó suero calentado/empobrecido en GDF-8 con concentraciones conocidas de GDF-8 para generar las curvas patrón. Los valores de DO de cada curva se representan frente a la concentración de GDF-8 maduro. El ajuste de la curva por regresión no lineal es una correlación más precisa para los valores de GDF-8 generados en suero calentado/empobrecido en GDF-8. El ajuste de la curva tuvo un coeficiente de correlación mejor y tuvo un mayor intervalo de precisión que las curvas de regresión lineal. Se utilizó el programa informático de Prism Graph para calcular la concentración de GDF-8 a partir de los valores de DO generados en el ensayo ELISA GDF-8.

La Figura 21 muestra los resultados de un ensayo para medir el GDF-8 libre y total en nueve muestras de suero normal. Los resultados se representan como MYO-029 +/- . Los valores se dan en pg/ml de GDF-8 y corresponden al nivel endógeno de GDF-8 en suero al 100 %.

La Figura 22 muestra los resultados de un ensayo para medir el GDF-8 libre y total en ocho muestras de suero normal. La gráfica representa dos experimentos distintos realizados en dos días distintos. El segundo día del experimento, el GDF-8 total se analizó calentando las muestras durante diez minutos (en comparación con el calentamiento de cinco minutos realizado el primer día del experimento). Los valores variaron de 227 a 1241 pg/ml para el GDF-8 libre y de 514 a 4329 pg/ml para el GDF-8 total.

La figura 23 muestra los resultados de un ensayo para medir el GDF-8 mediante ELISA después de desnaturalización con calentamiento. Se incubaron alícuotas de suero humano a temperatura ambiente durante una hora +/-10 µg/ml de MYO-029. Después, las muestras se desnaturalizaron con calor en un termociclador de gradiente a diversas temperaturas antes del análisis ELISA. La cuantificación de los niveles de GDF-8 en las muestras de ensayo se realizó por interpolación de los resultados de ensayo de una curva patrón que consiste una serie de diluciones de dímero de GDF-8 recombinante purificado de concentración conocida añadido al suero humano agrupado empobrecido en GDF-8 por cromatografía de afinidad. La detección máxima de GDF-8 en ausencia de MYO-029 se produce a aproximadamente 60 °C. La presencia de MYO-029 oculta la detección de GDF-8 en suero a baja temperatura, pero a temperaturas mayores de 65 °C, la detección de GDF-8 se restablece parcialmente.

Las Figuras 24A y 24B muestran que el GDF-8 puede detectarse en presencia de MYO-029 a pH bajo. En la Figura 24A, el dímero de GDF-8 diluido en tampón THST +/- 10 µg/ml de MYO-029 se diluyó cinco veces en

tampón de ensayo a pH neutro (THST), acetato de sodio 200 mM pH 5,0 (NaOAc), tampón de fosfato-citrato 200 mM pH 3 o 7 (PO4Cit), o glicina-HCl 200mM 2,5 (Gli). Después, las muestras se diluyeron a 1: 1 en pocillos ELISA (revestidos con anticuerpo RK35) que contenían tampón THST o Tris no tamponado. La dilución de GDF-8 con soluciones de diferente pH y capacidades tamponantes y la posterior dilución en THST o Tris no tamponado permitieron medir la eficacia de la etapa de captura del analito a un intervalo de pH de aproximadamente 3 a 8. En las condiciones del ensayo que se aproximan a un pH neutro, MYO-029 redujo la detección de GDF-8 (THST/THST). El GDF-8 acidificado con glicina-HCl y posteriormente diluido en tampón THST se mantuvo a un pH lo suficientemente bajo como para impedir la unión a MYO-029 y permitió la detección completa de GDF-8 en presencia o en ausencia de MYO-029 (Gli / THST). Sin embargo, la dilución de GDF-8 acidificado con glicina en Tris no tamponado dio como resultado condiciones de captura del analito a un pH mayor de 7 y redujo la detección de GDF-8 en presencia de MYO-029 (Gli / Tris no tamponado). La Figura 24B muestra un esquema del ensayo ELISA a pH3 (panel de la izquierda) y a pH7 (panel de la derecha).

La Figura 25 proporciona los resultados de un experimento que muestra que el anticuerpo RK35 murino se une a GDF-8 en condiciones ácidas, mientras que MyO-029 no lo hace. Se preincubó suero humano +/- diversas concentraciones de RK35 o MYO-029, y se diluyó cinco veces con tampón THST (pH neutro) o Glicina-HCl (pH ácido). Después se añadió el suero a pocillos ELISA que contenía RK35 unido a la placa y tampón THST o Glicina-HCl. En ausencia de RK35 o MYO-029, se detectó más GDF-8 endógeno en condiciones ácidas que en condiciones neutras debido al complejo de disociación y a la liberación de proteínas de GDF-8 libre (véanse las dos primeras barras). Las últimas seis barras representan datos obtenidos a pH ácido. Cantidades crecientes de RK35 en solución pudieron unirse y competir por la unión a GDF-8 con RK35 unido a la placa, dando como resultado una detección disminuida de GDF-8 en condiciones ácidas. MYO-029 no pudo unirse a GDF-8 en solución a un pH próximo a 3, dejando el GDF-8 en solución disponible para unirse al anticuerpo RK35 revestido sobre la placa ELISA.

La Figura 26 muestra que el aumento de la concentración de MYO-029 a 10 µg/ml no disminuye la detección de GDF-8 usando el protocolo ELISA de disociación con ácido. Se ensayó suero humano +/- 10, 40, o 100 µg/ml de MYO-029 después de la disociación con calor o con ácido. La concentración de GDF-8 se calculó por interpolación de una curva patrón del dímero maduro GDF-8 recombinante añadido a suero humano agrupado empobrecido en GDF-8. En ausencia de MYO-029, se determinó que la concentración de GDF-8 en suero era de -1 ng/ml cuando la captura del analito se realizó a un pH casi neutro (SH). La detección de GDF-8 después de la liberación de proteínas de unión en suero mediante disociación con calor fue de -3 ng/ml en ausencia de MYO-029 (SH + MYO, 63 °C; sin Ac). En presencia de MYO-029, incluso a la concentración más baja ensayada, la disociación con calor no permitió el mismo nivel de detección como en ausencia de MYO-029 (SH + MYO, 73 °C). El tratamiento con ácido de las muestras de suero detectó cantidades muy similares de GDF-8 independientemente de la cantidad de MYO-029 presente (SH + MYO, Ácido).

La Figura 27 demuestra que las condiciones ácidas durante la captura del analito no reducen la especificidad del ensayo. La acidificación de suero da como resultado una detección de señal más elevada (barras blancas frente a barras negras) en todos los animales de tipo silvestre (TS) ensayados, mono cinomolgo (NHP-31), ratón (Mm TS), y vaca lechera (vaca TS). Suero medido a pH neutro o ácido de un ratón GDF-8 *knockout* (Mm KO) modificado por ingeniería genética o el de la vaca Azul Belga GDF-8 KO de origen natural (vaca KO) no produjo ninguna señal sobre el fondo de la placa.

Las Figuras 28A-C contrastan tres procedimientos diferentes de ajuste de curvas de calibración de cinco placas ELISA GDF-8 en cuanto a sus errores relativos de las concentraciones retrocalculadas para patrones de calibración. Se representan los resultados de cinco placas ELISA GDF-8. El error relativo se define como (B-N)/Nx100, donde B es la concentración retrocalculada para un patrón utilizando la curva de calibración, y N es la concentración nominal del patrón. Los tres procedimientos de ajuste de curva fueron: 1) Figura 36A- modelo logístico de 4 parámetros sobre densidad óptica por mínimos cuadrados (MC); 2) Figura 36B- modelo logístico de 4 parámetros sobre la raíz cuadrada de la densidad óptica por MC; y 3) Figura 36C- modelo logístico de 5 parámetros sobre la raíz cuadrada de la densidad óptica por MC. Las líneas de referencia están entre -20 y 20.

Figura 29A. Niveles de miostatina en suero en animales normales y sin miostatina. El suero de ganado azul belga, ganado normal (vaca TS), ratones sin miostatina (ratones mstn KO) y camadas de tipo silvestre (ratón TS) se midió en condiciones disociativas, ácidas (pH2,5), y los valores se extrapolaron a partir de una curva patrón de miostatina humana recombinante en una matriz de suero deficiente en miostatina. Las barras representan la media en +/- DT de muestras repetidas (n=3). Las concentraciones de miostatina en animales sin miostatina se encontraban por debajo de la concentración de la muestra de calibrador más baja (147 pg/ml).

Figura 29B y 29C. Niveles de miostatina en suero de mono cinomolgo medidos en el ELISA de miostatina en condiciones no disociativas (pH 8,0, panel B) o disociativas (pH 2,5, panel C) después de la adición de concentraciones crecientes de anticuerpo anti-miostatina MYO-029 o receptor de miostatina soluble ActRIIB-Fc. Las barras representan la media +/- DT de muestras repetidas (n=3). La línea discontinua indica el CII (Cuadrante Inferior Izquierdo).

Figura 30A. Gráficas de cajas y bigotes de niveles de miostatina en suero (media, DT, mediana y valores de primer y tercer cuartil) en hombres jóvenes y de edad avanzada. La línea horizontal en la caja representa la media, los límites inferior y superior de la caja representan el primer y tercer cuartil, y las barras verticales representan las DT. *, P=0,03. Figura 30B. Gráfica de regresión que muestra la correlación de niveles de miostatina basales con masa corporal magra en hombres jóvenes. Figura 30C. Gráfica de regresión que muestra la correlación de niveles de miostatina basales con masa corporal magra en hombres de edad avanzada.

Figura 31. Cambios en los niveles de miostatina en hombres jóvenes en respuesta a la administración de dosis

graduadas de testosterona (el diagrama de barras muestra la media +/- DTM de niveles al inicio, y los días 56 y 140. La Figura 31A muestra los niveles de miostatina al inicio, el día de tratamiento 56 y 140 en hombres jóvenes (panel de la izquierda) y de edad avanzada (panel de la derecha). Los datos son la media +/-DTM. *, el valor de P es en comparación a niveles basales. Los niveles de miostatina el día 140 no fueron significativamente diferentes de los niveles iniciales. La Figura 31B muestra el cambio en porcentaje desde el inicio en niveles de miostatina en suero desde el inicio hasta el día 56 en hombres jóvenes y de edad avanzada. *, P =0,03.

Figura 32. Gráficas de regresión que muestran la correlación del cambio en los niveles de miostatina desde el inicio hasta el día 56 y cambios en las concentraciones de testosterona total y libre y de masa corporal magra en hombres jóvenes y de edad avanzada. La Figura 32A muestra la gráfica de regresión lineal del porcentaje de cambio en los niveles de miostatina desde el inicio hasta el día 56 y el porcentaje de cambio en las concentraciones de testosterona total en suero en hombres jóvenes. La Figura 32B muestra la gráfica de regresión lineal del porcentaje de cambio en los niveles de miostatina desde el inicio hasta el día 56 y el porcentaje de cambio en las concentraciones de testosterona total en suero en hombres de edad avanzada. La Figura 32C muestra la regresión lineal del porcentaje de cambio en los niveles de miostatina desde el inicio hasta el día 56 y el porcentaje de cambio de las concentraciones de testosterona libre en suero en hombres jóvenes. La Figura 32D muestra la regresión lineal del porcentaje de cambio en los niveles de miostatina desde el inicio hasta el día 56 y el porcentaje de cambio en las concentraciones de testosterona libre en suero en hombres de edad avanzada. La Figura 32E muestra la regresión lineal del porcentaje de cambio de en los niveles de miostatina desde el inicio hasta el día 56 y el porcentaje de cambio en masa corporal magra desde el inicio hasta el día 140 en hombres jóvenes. La Figura 32F muestra la regresión lineal del porcentaje de cambio en los niveles de miostatina desde el inicio hasta el día 56 y el porcentaje de cambio en la masa corporal magra en suero desde el inicio hasta el día 140 en hombres de avanzada edad

Figura 33. Gráficas de cajas y bigotes de niveles de miostatina (media, DT, mediana y valores del primer y tercer cuartil) en mujeres jóvenes con menstruación, en mujeres con menopausia quirúrgica y en mujeres de edad avanzada. La línea horizontal en la caja representa la media, los límites superior e inferior de la caja representan el primer y tercer cuartil y las barras verticales representan las DT. En los tres grupos los niveles de miostatina no fueron estadísticamente significativos.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

Como se usa en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "uno", "una", "el" y "la" incluyen referencias en plural salvo que el contexto dictamine claramente otra cosa.

El término "anticuerpo", como se usa en este documento, se refiere a una inmunoglobulina o a un fragmento de la misma, e incluye, sin limitación: un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo mono-específico, un anticuerpo poliespecífico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo tetramérico, un anticuerpo tetravalente, un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo monocatenario, un anticuerpo específico de dominio, un anticuerpo de un solo dominio, un anticuerpo con dominio deleciónado, una proteína de fusión, una proteína de fusión ScFv, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo sintético, un anticuerpo recombinante, un anticuerpo híbrido, un anticuerpo mutado, anticuerpos con CDR injertadas, y fragmentos de anticuerpo que incluyen: un fragmento Fab, F(ab')₂, Fab', un fragmento Fv, un fragmento Fv monocatenario (ScFv), un fragmento Fd, y un fragmento dAb o cualquier homólogo química o genéticamente manipulado de los anteriores que conservan la función de unión a antígeno.

La invención también proporciona proteínas de unión a antígeno, que son distintas de los anticuerpos tal y como se describe en este documento, que incluyen diacuerpos, un péptido CDR3, un péptido FR3-CDR3-FR4 restringido, un nanocuerpo (solicitud de patente de Estados Unidos 2008/0107601), un nanocuerpo bivalente, productos inmunofarmacéuticos modulares pequeños (SMIP), un dominio IgNAR variable de tiburón (documento WO 03/014161), un minicuerpo y cualquier fragmento u homólogo química o genéticamente manipulado que conserva la función de unión a antígeno. Típicamente, dichos fragmentos comprenderían un dominio de unión a antígeno. Como reconocerán los expertos en la técnica, cualquiera de dichas moléculas, por ejemplo, un anticuerpo "humanizado" o proteína de unión a antígeno, puede diseñarse genéticamente (por ejemplo, "realizando modificaciones en la línea germinal" (*germlined*)) para disminuir su inmunogenicidad, aumentar su afinidad, alterar su especificidad, o para otras finalidades.

Los anticuerpos de la invención pueden crearse, por ejemplo, mediante técnicas tradicionales de hibridoma (Kohler y col., Nature 256: 495-499 (1975)), procedimientos de ADN recombinante (patente de Estados Unidos No. 4.816.567), o técnicas de presentación de fagos utilizando bibliotecas de anticuerpos (Clackson y col., Nature 352: 624-628 (1991); Marks y col., J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1991)). Para diversas otras técnicas de producción de anticuerpos, véase: A Laboratory Manual, eds. Harlow y col., Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. El término "antígeno" se refiere a un compuesto, composición, o sustancia inmunogénica que, en un animal, puede estimular la producción de anticuerpos o una respuesta a linfocitos T, o ambas cosas, incluyendo composiciones que se inyectan al animal o que este las absorbe. La respuesta inmunitaria puede generarse en toda la molécula, o en una parte de la molécula (por ejemplo, un epítipo o hapteno). El término puede usarse para referirse a una macromolécula individual o a una población homogénea o heterogénea de macromoléculas antigénicas. Un antígeno reacciona con los productos de inmunidad humoral y/o celular específica. El término "antígeno" incluye generalmente restos que

incluyen proteínas, polipéptidos, fragmentos de proteínas antigénicas, ácidos nucleicos, oligosacáridos, polisacáridos, composiciones o productos químicos orgánicos o inorgánicos, y similares El término "antígeno" incluye todos los epítomos antigénicos relacionados. Los epítomos de un antígeno determinado pueden identificarse usando cualquier cantidad de técnicas de mapeo epitópico, bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, N. J. Por ejemplo, pueden determinarse epítomos lineales, por ejemplo, sintetizando simultáneamente grandes cantidades de péptidos en soportes sólidos, correspondiendo los péptidos a partes de la molécula de la proteína y haciendo reaccionar los péptidos con anticuerpos al mismo tiempo que los péptidos permanecen aún unidos a los soportes. Dichas técnicas son conocidas en la materia y se describen, por ejemplo en la patente de Estados Unidos No. 4.708.871; Geysen y col. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 3998-4002; Geysen y col. (1986) Molec. Immunol. 23: 709-715. De manera similar, los epítomos conformacionales se identifican fácilmente determinando la conformación espacial de aminoácidos tales como, por ejemplo, mediante cristalografía de rayos x y resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols, citado anteriormente. Adicionalmente, para los fines de la presente invención, un "antígeno" también puede incluir modificaciones, tales como, deleciones, adiciones y sustituciones (generalmente conservativas de naturaleza, pero también pueden ser no conservativas), en la secuencia nativa, siempre que la proteína conserve la capacidad de suscitar una respuesta inmunológica. Estas modificaciones pueden ser intencionadas, como a través de mutagénesis dirigida, o a través de procedimientos sintéticos particulares, o a través de una estrategia de modificación por ingeniería genética, o puede ser accidental, tal como a través de mutaciones de hospedadores, que producen los antígenos. Adicionalmente, el antígeno puede proceder u obtenerse de cualquier virus, bacteria, parásito, protozoo u hongo y puede ser un organismo completo. De manera similar, en la definición también se incluye un oligonucleótido o polinucleótido, que expresa un antígeno, tal como en aplicaciones de inmunización con ácidos nucleicos. También se incluyen antígenos sintéticos, por ejemplo, poliepítomos, epítomos flanqueantes y otros antígenos producidos de manera sintética o recombinante (Bergmann y col. (1993) Eur. J. Immunol. 23: 2777 2781; Bergmann y col. (1996) J. Immunol. 157: 3242 3249; Suhrbier, A. (1997) Immunol. and Cell Biol. 75: 402 408; Gardner y col. (1998) 12^a World AIDS Conference, Ginebra, Suiza, 28 de junio, 3 de julio de 1998).

Las expresiones "dominio de unión a antígeno", "fragmentos activos de un antígeno" o proteína de unión a antígeno, o similares, se refieren a la parte de un anticuerpo o molécula de proteína de unión a antígeno, que comprende el área que se une específicamente a o que es complementaria a una parte o a todo un antígeno. Cuando un antígeno es grande, un anticuerpo puede unirse solamente a una parte particular del antígeno. El "epítomo" "fragmentos activos de un epítomo", o "determinante antigénico" o similar es una parte de una molécula antigénica que se encarga de realizar las interacciones específicas con el dominio de unión a antígeno de un anticuerpo. Puede proporcionarse un dominio de unión a antígeno mediante uno o más dominios variables de anticuerpo (por ejemplo, un fragmento de anticuerpo denominado Fd consta de un dominio VH). Un dominio de unión a antígeno puede comprender un dominio variable de cadena ligera (VL) de un anticuerpo y un dominio variable de cadena pesada (VH) de un anticuerpo (patente de Estados Unidos No. 5.565.332).

Una "muestra" es un material biológico extraído de células, tejidos, órganos, u organismos, por ejemplo, para detectar un analito. Como ejemplos de muestras biológicas se incluyen, suero, sangre, plasma, muestras de biopsia, muestras de tejido, suspensión celular, saliva, líquido oral, líquido cefalorraquídeo, líquido amniótico, leche, calostro, secreción de glándula mamaria, linfa, orina, sudor, líquido lagrimal, líquido gástrico, líquido sinovial y mucosidad, y otras muestras y especímenes clínicos.

La expresión "reactivo de captura" se refiere a un reactivo, por ejemplo, un anticuerpo o proteína de unión a antígeno, que puede unirse a una molécula diana o analito a detectar en una muestra biológica. Típicamente, el reactivo de captura se inmoviliza, por ejemplo, en un ensayo en superficie, por ejemplo, un sustrato sólido o un recipiente de reacción. Un "reactivo de captura de GDF-8" se une específicamente a GDF-8.

Un "reactivo de detección" es un reactivo, por ejemplo, un anticuerpo o proteína de unión a antígeno, que se usa en los inmunoensayos de la presente invención para unir específicamente a una proteína diana, por ejemplo, GDF-8. Un reactivo de detección puede comprender opcionalmente un marcador detectable. Típicamente, un reactivo de detección reconoce y se une a la proteína diana en un sitio de unión o epítomo distinto al del reactivo de captura. El reactivo de detección puede estar acoplado con un marcador detectable. Un "reactivo de detección de GDF-8" se une específicamente a GDF-8.

La expresión "región determinante de la complementariedad" o "CDR" se refiere a las regiones hipervariables de un anticuerpo o molécula de proteína de unión a antígeno, que constan de tres bucles de la cadena pesada y tres de la cadena ligera que entre sí forman el dominio de unión a antígeno.

El término "detectar" se usa en el sentido más amplio para incluir mediciones tanto cualitativas como cuantitativas de un analito diana, en el presente documento mediciones de una molécula diana específica, tal como GDF-8 o BMP-11. Los procedimientos de ensayo descritos en este documento pueden usarse para identificar la presencia de GDF-8 o BMP-11 en una muestra biológica, o pueden usarse para cuantificar una cantidad de GDF-8 o BMP-11 en una muestra.

60

En los procedimientos de la presente invención puede usarse un "agente de detección" o "reactivo de detección" para detectar la señal generada a partir de un anticuerpo de detección o proteína de unión antígeno que comprende un marcador indirecto. Un agente o reactivo de detección es una proteína o una molécula pequeña que permite la detección de un agente modulador de GDF-8 o un complejo. En una realización preferida, el agente de detección se une específicamente a un agente modulador de GDF-8. Un agente de detección puede comprender opcionalmente un marcador detectable. Un agente de detección también puede detectarse por sí mismo por una sustancia que comprenda un marcador detectable. En los procedimientos para detectar otros agentes moduladores de GDF-8, por ejemplo, también pueden usarse agentes moduladores de GDF-8 detectados por los procedimientos proporcionados en el presente documento.

Un "trastorno asociado con la actividad de GDF8", "trastorno asociado con GDF8", o similar se refiere a un trastorno que puede estar producido, en su totalidad o en parte, por una alteración de la regulación de GDFB, (por ejemplo, expresión y/o actividad de GDFB anormalmente aumentada o disminuida) y/o un trastorno que puede tratarse, mejorarse, prevenirse, pronosticarse y/o controlarse, regulando y/o controlando la proteína y/o actividad de GDFB. Los trastornos asociados con GDF8 incluyen trastornos musculares, trastornos neuromusculares, trastornos óseos degenerativos, trastornos óseos metabólicos o inducidos, trastornos del tejido adiposo, trastornos del metabolismo de la glucosa o trastornos relacionados con la insulina.

La expresión "dosis eficaz", "dosis terapéuticamente eficaz" o "cantidad eficaz" se refiere a una dosificación o nivel que es suficiente para mejorar los síntomas clínicos de, o lograr un resultado biológico deseado (por ejemplo, aumento de masa muscular, fuerza muscular y/o densidad ósea) en individuos, incluyendo individuos que tienen un trastorno asociado con GDF-8. Dicha cantidad sería suficiente para reducir la actividad de GDF-8 asociada, por ejemplo, con regulación negativa de la masa musculo esquelética y densidad ósea. Los resultados terapéuticos y síntomas clínicos pueden incluir aumento de masa muscular, indicadores cardiovasculares mejorados o regulación del metabolismo de la glucosa mejorado. Por ejemplo, un inhibidor de GDF-8 puede aumentar la masa muscular, la fuerza muscular, modular los niveles de enzimas específicas de músculo y/o estimular la proliferación de mioblastos. En una realización preferida, un inhibidor de GDF-8 reduce manifestaciones clínicas de un trastorno asociado con GDF-8. Un agente modulador de GDF-8 puede modular la diferenciación de preadipocitos en adipocitos, disminuir la acumulación de grasa, disminuir los niveles de triglicéridos en suero, disminuir los niveles de colesterol en suero, modular el metabolismo de la glucosa, modular la densidad ósea y reducir la hiperglucemia. También puede administrarse un inhibidor de GDF-8 a un individuo para aumentar la masa muscular, para aumentar o acelerar el crecimiento, incluyendo el crecimiento muscular. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de GDF-8 se refiere a una cantidad que es eficaz, después de la administración de una sola dosis o de dosis múltiples a un individuo en el tratamiento, prevención, curación, retraso, reducción de la gravedad de, o mejora de al menos un síntoma de un trastorno o trastorno recurrente, o prolongar la supervivencia del sujeto más allá de lo esperado en ausencia de dicho tratamiento.

Un individuo con un trastorno asociado con GDF-8, un individuo que está en riesgo de desarrollar un trastorno asociado con GDF-8, un individuo que se somete a terapia con un agente modulador de GDF-8 y un individuo que es candidato para la administración de un agente modulador de GDF-8, puede ser un candidato para los procedimientos proporcionados en el presente documento. Los procedimientos de la invención pueden detectar o prevenir una respuesta inmunitaria perjudicial y/o evaluar la eficacia, la estabilidad biológica o la idoneidad de uso de un agente modulador de GDF-8.

Un individuo que tiene, o que está en riesgo de desarrollar, un trastorno asociado con GDF-8, tal como un trastorno relacionado con la musculatura o un trastorno neuromuscular, es un candidato para los procedimientos proporcionados en el presente documento. La inhibición de una actividad de GDF-8 aumenta el tejido muscular en individuos, incluyendo aquéllos que padecen trastornos relacionados con la musculatura. Diversos trastornos están asociados con tejido muscular o nervioso funcionalmente dañado, por ejemplo, pero sin limitación, distrofias musculares, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), sarcopenia, caquexia, desgaste muscular, atrofia muscular o fragilidad. Las distrofias musculares incluyen, por ejemplo, distrofias pseudohipertróficas, facioescapulohumerales y de cintura. Como ejemplos de distrofias musculares se incluyen distrofia muscular de Duchenne (Leyden-Mobius), distrofia muscular de Becker, distrofia muscular de Emery Dreifuss, distrofia muscular de cintura, síndrome de espina rígida, síndrome de Ullrich, distrofia muscular de Fukuyama, síndrome de Walker Warberg, enfermedad músculo-oculo-cerebral, distrofia muscular facioescapulohumeral (Landouzy-Dejerine), distrofia muscular congénita, distrofia miotónica (enfermedad de Steinart) y otras miotonías y enfermedad de Gower.

Un trastorno muscular asociado con GDF-8 también incluye un trastorno seleccionado de degeneración muscular asociada con enfermedad cardiovascular, o secundario a otra enfermedad o afección tal como atrofia orgánica, disfunción orgánica, cáncer, síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), reposo en cama, inmovilización, ausencia prolongada de uso, o en el término también se incluye otra enfermedad o afección.

También puede ser un candidato un individuo que tenga o que esté en riesgo de desarrollar trastornos del tejido adiposo, por ejemplo, obesidad, trastornos cardiovasculares (cuando se asocian con pérdida o desgaste muscular) y trastornos del metabolismo de insulina. De manera similar, individuos que tengan, o que estén en riesgo de desarrollar, un trastorno asociado con una pérdida de hueso, incluyendo osteoporosis, especialmente en mujeres de edad avanzada y/o postmenopáusicas, osteoporosis inducida por glucocorticoides, osteopenia, artrosis, y fracturas

relacionadas con osteoporosis, son candidatos para los procedimientos de tratamiento proporcionados en el presente documento. Otras afecciones asociadas con GDF-8 incluyen enfermedades y trastornos óseos metabólicos caracterizados por disminución de masa ósea, tales como los debidos a terapia crónica con glucocorticoides, disfunción gonadal prematura, supresión de andrógenos, déficit de vitamina D, hiperparatiroidismo secundario, déficits nutricionales y anorexia nerviosa.

Como ejemplos de trastornos cardiovasculares se incluyen enfermedad de arteria coronaria (aterosclerosis), angina de pecho (incluyendo angina de pecho aguda e inestable), infarto, ictus (incluyendo ictus isquémico), hipertensión asociada con enfermedades cardiovasculares, insuficiencia cardiaca, insuficiencia cardiaca congestiva, enfermedad de arteria coronaria, hipertensión, hiperlipidemia, enfermedad arterial periférica y enfermedad vascular periférica.

Como ejemplos de trastornos del metabolismo de la insulina se incluyen afecciones asociadas con homeostasis de glucosa aberrante, diabetes de tipo 2, prediabetes, tolerancia alterada a la glucosa, dislipidemia, síndrome metabólico (por ejemplo síndrome X), e insulinoresistencia inducida por traumatismos tales como quemaduras o desequilibrio de nitrógeno.

El término "GDF-8" se refiere a un factor 8 de crecimiento y diferenciación específico, y también puede denominarse "miostatina". El término se refiere a la forma precursora no procesada de longitud completa de GDF-8 así como a las formas maduras y propéptido resultantes de la escisión post-traducciona. Salvo que se especifique de otra manera como "inactiva", una "proteína de GDF-8" conserva una o más actividades biológicas de GDF-8. El término también se refiere a cualquiera de los fragmentos y variantes de GDF-8 que conservan al menos una actividad biológica asociada con la forma madura de GDF-8, como se analiza en este documento, incluyendo secuencias que se han modificado. La secuencia de aminoácidos de la forma madura del GDF-8 humana se proporciona en la SEC ID N°: 1. La presente invención se refiere al GDF-8 de todas las especies de vertebrados, incluyendo, pero sin limitación, ser humano, ganado bovino, pollo, ratón, rata, ganado porcino, ovino, pavo, babuino y peces (para la información de secuencias, véase, por ejemplo, McPherron y col., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 94: 12457-12461 (1997)).

La expresión "actividad de GDF-8" se refiere a una o más actividades morfogenéticas o fisiológicamente reguladoras del crecimiento asociadas con la proteína activa GDF-8. Por ejemplo, el GDF-8 activo es un regulador negativo de la masa musculo esquelética. El GDF-8 activo también puede modular la producción de enzimas específicas de músculo, (por ejemplo, creatina quinasa), estimular la proliferación de mioblastos y modular la diferenciación de preadipocitos en adipocitos. La "actividad de GDF-8" incluye "actividad de unión a GDF-8". Por ejemplo, el GDF-8 maduro se une específicamente a la región propeptídica de GDF-8, a ActRIIB, a un receptor de GDF-8, a activina, a follistatina, a proteínas que contienen dominios de follistatina, a GASP-1, y a otras proteínas. Un inhibidor de GDF-8, tal como un anticuerpo o proteína de unión a antígeno o parte de los mismos, puede reducir una o más de estas actividades de unión. Las actividades biológicas de GDF-8 son bien conocidas por los expertos en la técnica, véase, por ejemplo, la solicitud de patente de Estados Unidos No. 2004/0223966 en los ejemplos 5-6 y 8-12.

Un "trastorno asociado con GDF-8" es un trastorno o afección en el que un sujeto se beneficiaría de la administración de un modulador de GDF-8, tal como un inhibidor de GDF-8. Un trastorno asociado con GDF-8 incluye un trastorno médico tal como un trastorno o afección relacionados con la musculatura o neuromuscular, por ejemplo, distrofia muscular, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), sarcopenia, caquexia, desgaste muscular, atrofia muscular, o degeneración muscular, incluyendo desgaste, atrofia o fragilidad. Las distrofias musculares incluyen, por ejemplo, distrofias pseudohipertróficas, facioescapulohumerales y de cintura. Como ejemplos de distrofias musculares se incluyen distrofia muscular de Duchenne (Leyden-Möbius), distrofia muscular de Becker, distrofia muscular de Emery Dreifuss, distrofia muscular de cintura, síndrome de espina rígida, síndrome de Ullrich, distrofia muscular de Fukuyama, síndrome de Walker Warburg, enfermedad músculo oculocerebral, distrofia muscular facioescapulohumeral (Landouzy-Dejerine), distrofia muscular congénita, distrofia miotónica (enfermedad de Steinert) y otras miotonías, y enfermedad de Gowers.

En el término también se incluye degeneración muscular asociada con enfermedad cardiovascular o secundaria a otra enfermedad o afección tal como atrofia orgánica, disfunción orgánica, cáncer, síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), reposo en cama, inmovilización, ausencia prolongada de uso, u otra enfermedad o afección.

Los trastornos asociados con GDF-8 también incluyen trastornos del tejido adiposo (por ejemplo, obesidad), enfermedades o trastornos cardiovasculares (cuando se asocian con pérdida de músculo o desgaste muscular) y trastornos del metabolismo de la insulina. Los trastornos asociados con GDF-8 también incluyen trastornos asociados con una pérdida de hueso, incluyendo osteoporosis, especialmente en mujeres de edad avanzada y/o postmenopáusicas, osteoporosis inducida por glucocorticoides, osteopenia, artritis, y fracturas relacionadas con osteoporosis. Otras afecciones incluyen enfermedades óseas metabólicas y trastornos caracterizados por una disminución de masa ósea, tales como los debidos a terapia crónica con glucocorticoides, disfunción gonadal prematura, supresión de andrógenos, déficit de vitamina D, hiperparatiroidismo secundario, déficits nutricionales y anorexia nerviosa.

Como ejemplos de enfermedades cardiovasculares se incluyen enfermedad de arteria coronaria (aterosclerosis), angina de pecho (incluyendo angina de pecho aguda e inestable), infarto, ictus (incluyendo ictus isquémico), hipertensión asociada con enfermedades cardiovasculares, insuficiencia cardiaca, insuficiencia cardiaca congestiva,

5 enfermedad de arteria coronaria, hipertensión, hiperlipidemia, enfermedad arterial periférica y enfermedad vascular periférica. Como ejemplos de trastornos del metabolismo de la insulina se incluyen afecciones asociadas con homeostasis de glucosa aberrante, diabetes de tipo 2, prediabetes, tolerancia alterada a la glucosa, dislipidemia, síndrome metabólico (por ejemplo síndrome X) e insulinoresistencia inducida por traumatismos, tales como quemaduras o desequilibrio de nitrógeno.

La expresión "complejo de GDF-8 latente" se refiere al complejo de proteínas formadas entre el homodímero de GDF-8 maduro y el propéptido de GDF-8. Se piensa que los dos propéptidos de GDF-8 se asocian con las dos moléculas del GDF-8 maduro en el homodímero para formar un complejo tetramérico inactivo. El complejo latente puede incluir otros inhibidores de GDF en lugar de o además de uno o más de los propéptidos de GDF-8.

10 La expresión "GDF-8 maduro" se refiere a la proteína que se escinde del dominio carboxilo terminal de la proteína precursora de GDF-8. El GDF-8 maduro puede estar presente como monómero, homodímero, o en un complejo de GDF-8 latente. Dependiendo de las condiciones, el GDF-8 maduro puede establecer equilibrio entre cualquiera o todas de estas formas diferentes. En su forma biológicamente activa, el GDF-8 maduro también se denomina "GDF-8 activo". El GDF-8 biológicamente activo no es un complejo de GDF-8 latente. El término también se refiere a cualquiera de los fragmentos y variantes de GDF-8 que conserven al menos una actividad biológica asociada con el GDF-8 maduro, como se analiza en el presente documento, incluyendo secuencias que se han modificado.

15 La expresión "propéptido de GDF-8" se refiere al polipéptido que se escinde del dominio amino terminal de la proteína precursora de GDF-8. El propéptido de GDF-8 puede unirse al dominio de unión propeptídico en el GDF-8 maduro. El propéptido de GDF-8 forma un complejo con el homodímero de GDF-8 maduro. Se piensa que los dos propéptidos de GDF-8 se asocian con dos moléculas de GDF-8 maduro en el homodímero para formar un complejo tetramérico inactivo, denominado, "complejo latente". El complejo latente puede incluir otros inhibidores de GDF en lugar de o además de uno o más de los propéptidos de GDF-8.

20 La expresión "agente modulador de GDF-8" incluye cualquier agente que pueda modular la actividad, expresión, procesamiento o secreción de GDF-8, o un derivado del mismo farmacéuticamente aceptable. Los agentes moduladores de GDF-8 aumentarán o disminuirán una o más actividades de GDF-8. Un modulador de GDF-8, incluyendo un "inhibidor de GDF-8", puede usarse para tratar, por ejemplo, trastornos del tejido adiposo, trastornos relacionados con el metabolismo de la glucosa, o trastornos óseos. En la expresión se incluyen derivados biológicos de un agente modulador de GDF-8. En determinadas realizaciones, un agente modulador o inhibidor de GDF-8 afectará a la unión de GDF-8 con uno o más de sus compañeros de unión fisiológicos, incluyendo, pero sin limitación, a un receptor (por ejemplo ActRIIB), una proteína que contiene dominios de folistatina (por ejemplo folistatina, FLRG, GASP-1, GASP-2), o una proteína de GDF-8 tal como el propéptido de GDF-8 y mutantes y derivados de los mismos. Los agentes moduladores de GDF-8 incluyen, por ejemplo, anticuerpos que se unen específicamente a GDF-8 (incluyendo MYO-029, MYO-028, MYO-022, JA-16, y fragmentos y derivados de los mismos), anticuerpos que se unen específicamente al receptor de GDF-8 (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos No. 6.656.475, la publicación de patente de Estados Unidos No. 2004/0077053-A1), receptores solubles modificados (incluyendo proteínas de fusión receptoras, tales como la proteína de fusión ActRIIB-Fc), otras proteínas que se unen específicamente a GDF-8 o a BMP-11 (tales como el propéptido de GDF-8 o BMP-11, mutantes y derivados del propéptido de GDF-8, folistatina, proteínas que contienen dominios de folistatina y fusiones Fc de estas proteínas), se incluyen proteínas de unión al receptor de GDF-8 y fusiones Fc de estas proteínas y miméticos. En la expresión inhibidor de GDF-8 también se incluyen inhibidores no proteicos (tales como ácidos nucleicos). Los inhibidores de GDF-8 incluyen proteínas, anticuerpos, péptidos, peptidomiméticos, ribozimas, oligonucleótidos antisentido, ARN bicatenario (incluyendo ARNip o microARN) y otras moléculas pequeñas, que inhiben específicamente al GDF-8.

25 La expresión "individuo" se refiere a cualquier animal vertebrado, incluyendo un mamífero, ave, reptil, anfibio, o pez. La expresión "mamífero" incluye cualquier animal clasificado como tal, del género masculino o femenino, incluyendo seres humanos, primates no humanos, monos, perros, caballos, gatos, ovejas, cerdos, cabras, ganado, etc. Como ejemplos de animales no mamíferos se incluyen, pollo, pavo, pato, ganso, peces (tales como salmón, barbo, perca, pez cebra y trucha) y ranas. Un individuo puede seleccionarse, por ejemplo, de seres humanos o de animales domésticos, productores, ganado, animales de zoo, para su uso en deporte, en carreras o animales de compañía.

30 Los términos "inhibir" e "inhibidor" se refieren a una reducción en una o más actividades de GDF-8 por un inhibidor de GDF-8, con respecto a la actividad de GDF-8 en ausencia del mismo inhibidor. La reducción de la actividad es preferente al menos aproximadamente del 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o mayor. En determinadas realizaciones, cuando la actividad de GDF-8 está afectada por uno o más de los inhibidores desvelados en este documento, se reduce al menos un 50 %, preferentemente al menos aproximadamente un 60 %, 62 %, 64 %, 66 %, 68 %, 70 %, 72 %, 74 %, 76 %, 78 %, 80 %, 82 %, 84 %, 86 %, 88 %, 90 %, 92 %, 94 %, 96 %, 98 % o 99 %, e incluso más preferentemente al menos del 95 % al 100 %. Los términos "neutralizar" y "neutralizante" se refieren a una reducción de al menos 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de una o más actividades de GDF-8. La inhibición de la actividad de GDF-8 puede medirse, por ejemplo, en ensayos con el gen indicador pGL3(CA-GA) como se describe en Thies y col. Growth Factors 18: 251-259 (2001) o en ensayos con el receptor ActRIIB como se ilustra más adelante en la sección de Ejemplos.

El término "aislado" se refiere a una molécula que está sustancialmente separada de su medio natural. Por ejemplo, una proteína aislada es una que está sustancialmente separada de la fuente celular o tisular de la cual procede.

Un marcador también puede ser una enzima, por ejemplo una enzima que convierte un sustrato, tal como una peroxidasa (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante), fosfatasa alcalina, glucosa oxidasa y β -galactosidasa. Cuando la peroxidasa se incuba con sustratos solubles, (por ejemplo, 3,3',5,5' tetrametilbencidina (TMB), o-fenilendiamina (OPD), 2,2'-azino-dil[3-etil-benzitiazolina] sulfonato (ABTS), luminol, polifenoles, ésteres de acridina, y luciferina), produce un cambio cromogénico o luminiscente en el sustrato que puede detectarse con espectroscopía. Típicamente, después de un período de incubación fijo con el sustrato, la reacción se inactiva (por ejemplo, por acidificación), y el resultado se cuantifica midiendo la densidad óptica (absorbancia) o luminiscencia. Los resultados de la absorbancia pueden compararse con los valores de DO en el intervalo lineal para reacciones cromogénicas y los ensayos luminiscentes se miden unidades relativas de luz (URL).

Un marcador también puede ser biotina, un hapteno o una etiqueta epitópica (por ejemplo, histidina, HA (el péptido hemaglutinina), la proteína de unión a maltosa, AviTag®, o la glutatión S-transferasa), que puede detectarse por la adición de un agente de detección marcado que interacciona con el marcador asociado con el agente modulador de GDF 8 o agente de detección. Un agente de detección marcado con biotina ("biotinilado") puede detectarse a través de su interacción con un conjugado de avidina-enzima, por ejemplo, avidina-peroxidasa de rábano picante, después de incubación secuencial con el conjugado de avidina-enzima y un sustrato cromogénico o luminiscente adecuado. El europio es también un marcador.

El término "peptidomimético", como se usa en este documento, se refiere a un péptido que imita biológicamente a determinantes activos en hormonas, citocinas, sustratos enzimáticos, virus u otras biomoléculas y puede antagonizar, estimular o, de otra manera, modular la actividad fisiológica de un ligando natural. Los peptidomiméticos se definen preferentemente como compuestos que tienen una estructura secundaria similar a la de un péptido y opcionalmente características estructurales adicionales; su modo de acción es muy similar o idéntico al modo de acción del péptido nativo, sin embargo, su actividad (por ejemplo, como un antagonista o un inhibidor) puede modificarse en comparación con la del péptido nativo especialmente receptores o enzimas. Además, pueden imitar el efecto del péptido nativo (agonista). A lo largo de esta memoria descriptiva el término "peptidomimético" se refiere a una molécula que, debido a sus propiedades estructurales, puede imitar las funciones biológicas de GDF8 funcional o de GDF8 no funcional. En la presente invención, se propone que un fragmento de GDF8, que comprende un dominio de unión/dimerización de GDF8, funcione como un negativo dominante contra GDF8. Un peptidomimético, por sí mismo, de un dominio de unión/dimerización de GDF8 podría estar presente en exceso multimolar y podría "superar competitivamente" al GDF8 de tipo silvestre y formar heterodímeros con las moléculas de tipo silvestre actuando de este modo como un negativo dominante de la función biológica de GDF8. En este sentido, la función de GDF8 estaría alterada atenuando de esta manera la inhibición de crecimiento muscular. Un ejemplo de un ensayo biológico *in vivo* de dicha actividad mimética del GDF-8 promotor del crecimiento es el incremento de la masa musculo esquelética en ratones normales o en otros animales de ensayo mediante la administración de una cantidad eficaz de al menos un mimético promotor del crecimiento de la presente invención.

El término "purificado" se refiere a una molécula que carece sustancialmente de otro material que se asocia con la molécula en su medio natural. Por ejemplo, una proteína purificada carece sustancialmente de material celular o de otras proteínas de la célula o tejido del que procede. El término se refiere a preparaciones en las que la proteína aislada es suficientemente pura para administrarse como una composición terapéutica, o al menos tiene una pureza del 70 % al 80 % (p/p), más preferentemente una pureza de al menos 80 %-90 % (p/p) incluso más preferentemente una pureza de 90-95 %; y, más preferentemente, una pureza de al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99%, o 100 % (p/p).

El término "ARNip" como se usa en el presente documento, se refiere a moléculas de ARN de interferencia pequeño que pueden usarse para silenciar la expresión de genes diana. El ARNip puede ser ARNbc que tiene 19-25 nucleótidos. Los ARNip pueden producirse endógenamente por degradación de moléculas de ARNbc más largas por una nucleasa relacionada con RNasa III denominada Dicer. Los ARNip también pueden introducirse en una célula exógenamente, o por transcripción de una construcción de expresión. Una vez formados, los ARNip se ensamblan con componentes proteicos en complejos que contienen endorribonucleasa conocidos como complejos silenciadores inducidos por ARN (RISC). Un desenrollamiento del ARNip generado por ATP activa los RICS, que a su vez dirigen el transcrito de ARNm complementario por emparejamiento de bases de Watson y Crick, escindiendo de esta manera y destruyendo el ARNm. La escisión del ARNm se produce cerca de la mitad de la región unida por la cadena de ARNip. Esta degradación del ARNm específica de secuencia produce silenciamiento génico.

Para realizar el silenciamiento génico mediado por ARNip pueden emplearse al menos dos formas. En la primera, los ARNip pueden sintetizarse *in vitro* e introducirse en células para suprimir transitoriamente la expresión génica. Los ARNip son dúplex de oligonucleótidos cortos mezclados que pueden incluir, por ejemplo, 19 nucleótidos de ARN con dinucleótidos 3' simétricos protuberantes. Utilizando dúplex de ARNip de 21 pb sintéticos (por ejemplo, 19 bases de ARN seguidas por una protuberancia en posición 3' UU o dTdT), puede conseguirse el silenciamiento génico específico de secuencia en células de mamífero. Estos ARNip pueden suprimir específicamente la traducción génica diana en células de mamífero sin activación de proteína quinasa (PKR) dependiente de ADN por ARN bicatenarios (ARNbc) más largos, que pueden producir la represión no específica de la traducción de muchas proteínas.

En la segunda, los ARNip pueden expresarse *in vivo* a partir de vectores. Esta estrategia puede usarse para expresar de modo estable los ARNip en células o animales transgénicos. Los vectores de expresión de ARNip se diseñan genéticamente para dirigir la transcripción de ARNip de unidades de transcripción de polimerasa III (pol III). Las unidades de transcripción Pol III son adecuadas para la expresión del ARNip en horquilla dado que despliegan un sitio de terminación de la transcripción corto rico en AT que conduce a la adición de salientes de 2 pb (por ejemplo, UU) a los ARNip en horquilla, una característica que es útil para la función del ARNip. Los vectores de expresión de Pol III también pueden utilizarse para crear ratones transgénicos que expresen ARNip.

Los ARNip también pueden expresarse de una manera específica de tejido. En esta estrategia, los ARNbc largos se expresan primero a partir de un promotor (tal como pol II de CMV) en el núcleo de líneas celulares seleccionadas o ratones transgénicos. Los ARNbc largos se procesan en ARNip en el núcleo (por ejemplo, por Dicer). Los ARNip salen del núcleo y median el silenciamiento específico de genes. Puede utilizarse una estrategia similar junto con promotores específicos de tejido (pol II) para crear ratones knockdown (con disminución de expresión) específicos de tejido.

La expresión "molécula pequeña" se refiere a compuestos que no son macromoléculas. Véase, por ejemplo, Karp, (2000) *Bioinformatics Ontology* 16: 269-85; Verkman, (2004) *AJP-Cell Physiol.* 286: 465-74. Por tanto, a menudo se considera que los compuestos que tienen menos de mil Dalton son moléculas pequeñas (por ejemplo, Voet y Voet, *Biochemistry*, 2ª ed., ed. N. Rose, Wiley and Sons, New York, 14 (1995). Por ejemplo, Davis y col. ((2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 5981-86), usan la frase molécula pequeña para indicar folatos, metotrexato y neuropéptidos, mientras que Halpin y Harbury ((2004) *PLoS Biology* 2: 1022-30), usan la frase para indicar productos génicos de molécula pequeña, es decir, ADN, ARN y péptidos. Como ejemplos de moléculas pequeñas naturales se incluyen colesterol, neurotransmisores, y los ARNip; las moléculas pequeñas sintetizadas incluyen diversos compuestos químicos indicados en numerosas bases de datos de moléculas pequeñas comercialmente disponibles, por ejemplo, FCD (Base de datos de productos químicos puros), SMID (Bases de Datos de Interacción de Molécula Pequeña), ChEBI (Entidades Químicas de Interés Biológico) y CSD (Base de Datos Estructural de Cambridge) (véase, por ejemplo, Alfaro y col. (2005) *Nuc. Acids Res. Database Issue.33: D416-24*).

Las expresiones "unión específica", "se une específicamente", significan que dos o más moléculas forman un complejo que es medible en condiciones fisiológicas o de ensayo y es selectivo. Un anticuerpo o proteína de unión a antígeno u otro inhibidor se dice que "se une específicamente" a una proteína si, en condiciones apropiadamente seleccionadas, dicha unión no está sustancialmente inhibida, mientras que al mismo tiempo se inhibe la unión no específica. La unión específica se caracteriza por una alta afinidad y es selectiva para el compuesto o proteína. La unión no específica normalmente tiene una baja afinidad. La unión en anticuerpos IgG por ejemplo se caracteriza generalmente por una afinidad de al menos aproximadamente 10^{-7} M o mayor, tal como al menos aproximadamente 10^{-7} M o mayor, o al menos aproximadamente 10^{-9} M o mayor, o al menos aproximadamente 10^{-10} o mayor, o al menos aproximadamente 10^{-11} M o mayor, o al menos aproximadamente 10^{-12} M o mayor. El término también puede aplicarse cuando, por ejemplo, un dominio de unión a antígeno es específico para un epítipo particular que no es portado por numerosos antígenos en cuyo caso el anticuerpo o proteína de unión antígeno que lleva el dominio de unión a antígeno generalmente no se unirá a otros antígenos.

Algunos procedimientos requieren alta afinidad para la unión específica, mientras que otros procedimientos, tales como ensayo de resonancia con plasmón superficial, pueden detectar complejos menos estables e interacciones de afinidad más baja. Si es necesario, la unión no específica puede reducirse sin afectar sustancialmente a la unión específica modificando las condiciones de unión. Dichas condiciones se conocen en técnica, y un experto utilizando técnicas habituales puede seleccionar condiciones apropiadas. Las condiciones normalmente se definen en cuanto a concentración de los compañeros de unión, fuerza iónica de la solución, temperatura, tiempo que se deja para la unión, concentración de moléculas no relacionadas (por ejemplo, albúmina de suero, caseína de leche), etc. Las condiciones de unión ejemplares se exponen en los ejemplos dados más adelante.

La expresión "antagonista específico de GDF8" o "inhibidor específico de GDF8" incluye cualquier agente capaz de inhibir, reducir y/o neutralizar la actividad, expresión, procesamiento o secreción de GDF8 pero no inhibe, reduce y/o neutraliza significativamente la actividad, expresión, procesamiento o secreción de otras proteínas, por ejemplo, de la superfamilia de TGF- β , por ejemplo, BMP11. Dichos inhibidores incluyen macromoléculas y moléculas pequeñas, por ejemplo, proteínas, anticuerpos, péptidos, peptidomiméticos, ARNip, ribozimas, oligonucloteótidos antisentido, ARN bicatenario y otras moléculas pequeñas, que inhiben específicamente la actividad de GDF8. Dichos inhibidores se dice que "antagonizan" específicamente (por ejemplo, "inhiben," "disminuyen," "reducen" o "neutralizan") la actividad biológica de GDF8. Un inhibidor de GDF8 inhibirá o neutralizará o reducirá al menos una actividad biológica de GDF8, tal como una actividad reguladora de crecimiento, fisiológica o morfogénica asociada con la proteína GDF8 activa. Por ejemplo, GDF8 es un regulador negativo del crecimiento del músculo esquelético. Un inhibidor de GDF8 puede aumentar la masa muscular, aumentar la fuerza muscular, modular los niveles de enzimas específicas de músculos, estimular la proliferación de mioblastos, modular la diferenciación de preadipocitos en adipocitos, disminuir la acumulación de grasa, disminuir los niveles de triglicéridos en suero, disminuir los niveles de colesterol en suero, modular el metabolismo de la glucosa y/o reducir la hiperglucemia.

El término "tratamiento" se usa indistintamente en el presente documento con el término "procedimiento terapéutico" y se refiere tanto a un tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas/preventivas. El término "tratamiento"

también se define como ser capaz de mejorar, tratar o prevenir un trastorno. Las personas que necesitan tratamiento pueden incluir individuos que ya tienen un trastorno médico concreto así como aquéllos que pueden finalmente adquirir el trastorno (es decir los que necesitan medidas preventivas).

5 La práctica de la presente invención empleará, salvo que se indique otra cosa, técnicas convencionales de biología molecular, microbiología, ADN recombinante e inmunología, que están dentro de la experiencia de la técnica. Dichas técnicas se explican por completo en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Sambrook, y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda edición (1989); *DNA Cloning*, Volúmenes I y II (D. N Glover ed. 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait ed., 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); *Transcription and Translation* (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); *Animal Cell Culture* (R. I. Freshney ed. 1986); *Immobilized Cells and Enzymes* (IRL Press, 1986); B. Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); las series, *Methods In Enzymology* (Academic Press, Inc.); *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells* (J. H. Miller y M. P. Calos eds. 1987, Cold Spring Harbor Laboratory), *Methods in Enzymology* Vol. 154 y Vol. 155 (Wu and Grossman, and Wu, eds., respectivamente), Mayer and Walker, eds. (1987), *Immunochemical Methods In Cell and Molecular Biology* (Academic Press, Londres), Scopes, (1987), *Protein Purification: Principles and Practice*, Segunda edición (Springer-Verlag, N.Y.), y *Handbook Of Experimental Immunology*, Volúmenes I IV (D. M. Weir y C. C. Blackwell eds. (1986)).

Epítotos Específicos contra GDF8 y Antagonistas de los mismos

20 El mapeo epitópico que utiliza anticuerpos específicos de GDF8 y péptidos de 13 aminoácidos solapantes de GDF8 humano reveló candidatos a epítotos específicos para GDF8 que pueden dirigirse para el antagonismo específico de GDF8 (Ejemplo 4.2). Basándose en esta estrategia, se identificaron cinco epítotos independientes específicos para GDF8. La presente divulgación proporciona estos epítotos (incluyendo peptidomiméticos de los mismos), polinucleótidos que codifican los epítotos, polinucleótidos inhibidores de los mismos y anticuerpos relacionados con los mismos como antagonistas específicos contra la actividad de GDF8.

Epítotos específicos contra GDF8 y peptidomiméticos de los mismos

25 La presente divulgación proporciona nuevos polipéptidos aislados y purificados homólogos a epítotos que pueden caracterizarse biológicamente por ser específicos contra GDF8, y por tanto, se denominan en el presente documento como epítotos específicos contra GDF8. Es parte de la divulgación que los peptidomiméticos de estos epítotos específicos de GDF8 pueden usarse como antagonistas de GDF8, es decir, para antagonizar la actividad de GDF8, por ejemplo, unión de GDF8 a su receptor.

30 Por ejemplo, la divulgación proporciona polinucleótidos purificados y aislados que codifican cinco dominios de unión específicos para GDF8 (que pueden incluir sitios de unión al receptor ALK4/ALK4 de GDF8), y que también pueden actuar como antagonistas/peptidomiméticos de receptores de GDF8, denominados en el presente documento "GE1," "GE2," "GE3," "GE4," y "GE5." Los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención pueden comprender ADN o ARN y pueden ser total o parcialmente sintéticos. La referencia a una secuencia de nucleótidos como se expone en el presente documento incluye moléculas de ADN con las secuencias especificadas o equivalentes genómicos (por ejemplo, secuencias complementarias), así como moléculas de ARN con secuencias especificadas en las que T se sustituye con U, salvo que el contexto requiera otra cosa. Como secuencias de ADN preferidas se incluyen secuencias genómicas y de ADNc y secuencias de ADN químicamente sintetizadas.

35 Las secuencias de nucleótidos de ADNc que codifican GE1, GE2, GE3, GE4 y GE5 humana, denominadas ADNc humano, se exponen como SEC ID N°: 3, 5, 7, 9, y 11, respectivamente. Los polinucleótidos de la presente invención también incluyen polinucleótidos que se hibridan en condiciones rigurosas con polinucleótidos que tienen y/o consisten esencialmente en las secuencias de nucleótidos expuestas como SEC ID N°: 3, 5, 7, 9, y 11, o complementos de las mismas y/o codifican polipéptidos que conservan actividad biológica sustancial de GE1, GE2, GE3, GE4, o GE5, respectivamente. Los polinucleótidos de la presente divulgación también incluyen partes continuas de las secuencias de polinucleótidos expuestas como SEC ID N°: 3, 5, 7, 9, y 11 que comprenden al menos 12 nucleótidos consecutivos.

40 Las secuencias de aminoácidos de GE1, GE2, GE3, GE4, GE5 humana, y polipéptidos miméticos de los mismos se exponen como SEC ID N°: 4, 6, 8, 10 y 12, respectivamente. Los polipéptidos de la presente divulgación también incluyen polipéptidos con una secuencia de aminoácidos que tiene y/o consiste esencialmente en partes continuas de cualquiera de las secuencias expuestas como SEC ID N°: 4, 6, 8, 10 y 12, que comprenden al menos 4 aminoácidos consecutivos. Los polipéptidos de la descripción también incluyen cualquiera de las secuencias expuestas como SEC ID N°: 4, 6, 8, 10 y 12, incluyendo partes continuas de las mismas en las que uno o más de los L-aminoácidos se reemplazan con sus D-aminoácidos correspondientes. Los polipéptidos de la presente divulgación también incluyen fragmentos activos de las SEC ID N°: 4, 6, 8, 10 y 12, es decir, cualquier parte continua de cualquiera de las secuencias expuestas como SEC ID N°: 4, 6, 8, 10 y 12 que conserva actividad biológica sustancial de GE1, GE2, GE3, GE4, o GE5 humana de longitud completa, es decir, cualquier fragmento de las SEC ID N°: 4, 6, 8, 10 y 12 que es un dominio de unión específico para GDF8 y/o para el cual un peptidomimético del mismo puede ser un antagonista específico contra la actividad de GDF8. Adicionalmente, un polipéptido de la divulgación puede estar acetilado y/o bloqueado por amida utilizando procedimientos bien conocidos. Los polinucleótidos de la presente divulgación también incluyen, además de los polinucleótidos descritos anteriormente,

polinucleótidos que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácidos expuestas como SEC ID N°: 4, 6, 8, 10 y 12 y partes continuas de las mismas y que difieren de los polinucleótidos de origen humano descritos anteriormente solamente debido a la bien conocida degeneración del código genético.

5 La divulgación también proporciona polinucleótidos purificados y aislados que codifican peptidomiméticos ciclados para los epítomos específicos de GDF8, por ejemplo, GE1, GE2, GE3, GE4 y GE5. Las secuencias de ADN preferentes de la invención incluyen secuencias genómicas y de ADNc y secuencias de ADN químicamente sintetizado. Un experto en la técnica reconocerá que la presente divulgación también incluye otras moléculas cicladas, tales como peptidomiméticos ciclados basándose en otros dominios de unión específicos para GDF8. Adicionalmente, un peptidomimético ciclado de la divulgación puede acetilarse y/o bloquearse con amida usando procedimientos bien conocidos.

Anticuerpos específicos contra GDF8

La presente divulgación proporciona nuevos anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de proteína de unión a antígeno) que interactúan específicamente con GDF8. Realizaciones ilustrativas no limitantes de dichos anticuerpos se denominan RK22. Los anticuerpos de la invención poseen características únicas y beneficiosas. En primer lugar, estos anticuerpos son capaces de unirse a GDF8 maduro con alta afinidad (Ejemplo 2). En segundo lugar, los anticuerpos desvelados interactúan específicamente con GDF8, es decir, los anticuerpos de la invención no se unen con alta afinidad a otros miembros de la subfamilia TGF- β , por ejemplo, BMP11 (Ejemplo 2). En tercer lugar, los anticuerpos de la invención inhiben la actividad de GDF8 *in vitro* e *in vivo* según se demuestra (Ejemplo 3). En cuarto lugar, los anticuerpos desvelados pueden inhibir la actividad de GDF8 asociada con la regulación negativa de masa muscular esquelética y densidad ósea (Ejemplo 3).

En una realización, los anticuerpos desvelados en el presente documento pueden interactuar específicamente con GDF8, es decir, se contempla que los anticuerpos no reaccionen extensamente con otras proteínas, por ejemplo, aquellas que pertenecen a la superfamilia TGF- β tales como BMP11, activina, sustancia inhibidora muleriana, factor neurotrófico derivado de células gliales o factores de crecimiento y diferenciación distintos de GDF8. En una realización no limitante de la invención, un anticuerpo específico de GDF8 o proteína de unión a antígeno de la invención se une a GDF8 con una preferencia mayor de 5-10 veces de con la que se une a BMP11. En una realización no limitante de la invención, un anticuerpo anti-GDF8 específico o proteína de unión a antígeno de la invención se une a GDF8 con una preferencia mayor de 10-100 veces de con la que se une a BMP11. En una realización no limitante de la invención, un anticuerpo anti-GDF8 específico o proteína de unión a antígeno de interés se une a GDF8 con una preferencia 100-1000 veces de con la que se une a BMP11. En otra realización, un anticuerpo anti-GDF8 específico o proteína de unión a antígeno de la invención se une a un epítomo (o epítomos) específico contra GDF8, incluyendo aquellos descritos en el presente documento (por ejemplo, un epítomo (o epítomos) específicos contra GDF8 que tienen y/o consisten esencialmente en una secuencia de aminoácidos expuesta como SEC ID N°: 4, 6, 8, 10 y 12, o fragmentos activos de las mismas). En una realización de la invención, los anticuerpos contemplados interactúan específicamente con el sitio de unión ALK4/ALK5 predicho de GDF8 maduro, por ejemplo, epítomos de GDF8 con una secuencia de aminoácidos expuesta como SEC ID N°: 4, 6 u 8.

Un experto habitual en la técnica reconocerá que los anticuerpos de la invención pueden usarse para detectar, medir, e inhibir proteínas GDF8 derivadas de diversas especies, por ejemplo, aquellas descritas en la presente memoria descriptiva. El porcentaje de identidad se determina mediante algoritmos de alineamiento convencionales tales como, por ejemplo, Basic Local Alignment Tool (BLAST) descrito en Altschul y col. ((1990) J. Mol. Biol. 215: 403-10), el algoritmo de Needleman y col. ((1970) J. Mol. Biol. 48: 444-53), o el algoritmo de Meyers y col. ((1988) Comput. Appl. Biosci. 4: 11-17). En general, los anticuerpos y anticuerpo o fragmentos de proteína de unión a antígeno de la invención pueden usarse con cualquier proteína que conserve actividad biológica sustancial de GDF8 y comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, o más idéntica a cualquier secuencia de al menos 100, 80, 60, 40, 20, o 15 aminoácidos contiguos de la forma madura de GDF8 expuesta como SEC ID N°: 1.

Los anticuerpos intactos, también conocidos como inmunoglobulinas, son típicamente proteínas glicosiladas tetraméricas compuestas de dos cadenas ligeras (L) de aproximadamente 25 kDa cada una, y dos cadenas pesadas (H) de aproximadamente 50 kDa cada una. En los anticuerpos existen dos tipos de cadena ligera denominadas lambda y kappa. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de las cadenas pesadas, las inmunoglobulinas se asignan a cinco clases principales: A, D, E, G, y M, y varias de estas pueden dividirse además en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, e IgA2. Cada cadena ligera está compuesta de un dominio variable (V) N-terminal (VL) y un dominio constante (C) (CL). Cada cadena pesada está compuesta de un dominio V N-terminal (VH), de tres o cuatro dominios C (CH) y una región bisagra. El dominio CH más próximo a VH se denomina CH1. Los dominios VH y VL consisten en cuatro regiones de secuencias relativamente conservadas denominadas regiones marco conservadas (FR1, FR2, FR3, y FR4), que forman un armazón de tres regiones de secuencias hipervariables (regiones determinantes de la complementariedad, CDR). Las CDR contienen la mayoría de los restos responsables de las interacciones específicas del anticuerpo o proteína de unión a antígeno con el antígeno. Las CDR se denominan CDR1, CDR2, y CDR3. Por consiguiente, los constituyentes de la CDR en la cadena pesada se denominan H1, H2, y H3, mientras que los constituyentes de la CDR en la cadena ligera se denominan L1, L2, y L3. CDR3 es la fuente más grande de diversidad molecular dentro sitio de unión del anticuerpo

o de la proteína de unión antígeno. H3, por ejemplo, puede ser tan corta como dos restos de aminoácidos o mayor de 26 aminoácidos. Las estructuras subunitarias y configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas se conocen bien en la técnica. Para una revisión de la estructura de los anticuerpos, véase: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Eds. Harlow y col., 1988. Un experto en la técnica reconocerá que cada estructura subunitaria, por ejemplo, una estructura CH, VH, CL, VL, CDR, y/o FR comprende fragmentos activos. Por ejemplo, los fragmentos activos pueden consistir en la parte de la subunidad VH, VL, o CDR que se une al antígeno, es decir, el fragmento de unión a antígeno o la parte de la subunidad CH que se une a y/o activa un receptor y/o complemento de Fc.

Los ejemplos no limitantes de fragmentos de unión incluidos dentro de la expresión "anticuerpo o fragmento de proteína de unión a antígeno" usada en el presente documento se incluyen: (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo; (v) un fragmento dAb, que consiste en un dominio VH; y (vi) una CDR aislada. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes distintos, pueden juntarse de manera recombinante por un engarce sintético, creando una sola cadena de proteína en la que los dominios VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocido como Fv monocatenario (scFv)). El engarce más comúnmente usado es un péptido de 15 restos (Gli4Ser)₃ pero en la técnica también se conocen otros engarces. También se pretende incluir a los anticuerpos monocatenarios en las expresiones "anticuerpo o proteína de unión a antígeno" o "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo.

Estos anticuerpos se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica y la utilidad de los fragmentos se explora de la misma manera que con los anticuerpos intactos. La diversidad de anticuerpos se crea por múltiples genes de línea germinal que codifican dominios variables y una diversidad de acontecimientos somáticos. Los acontecimientos somáticos incluyen recombinación de segmentos de genes variables con diversidad (D) y segmentos génicos de unión (J) para hacer un dominio VH completo, y la recombinación de los segmentos génicos variables y de unión para constituir un dominio VL completo. El proceso de recombinación es impreciso en sí mismo, dando como resultado la pérdida o adición de aminoácidos en las uniones V(D)J. Estos mecanismos de diversidad se producen en los linfocitos B en desarrollo antes de la exposición a antígenos. Después de la estimulación antigénica, los genes de anticuerpos expresados en linfocitos B se someten a mutación somática. Basándose en el número estimado de segmentos de genes de la línea germinal, la recombinación al azar de estos segmentos, y la formación de pares VH-VL al azar hasta pueden producirse hasta $1,6 \times 10^7$ anticuerpos diferentes (Fundamental Immunology, 3^a ed. (1993), ed. Paul, Raven Press, Nueva York, NY). Cuando otros procesos que contribuyen a la diversidad de anticuerpos (tales como mutación somática) se tienen en cuenta, se piensa que pueden generarse hasta 1×10^{10} anticuerpos diferentes (Immunoglobulin Genes, 2nd ed. (1995), eds. Jonio y col., Academic Press, San Diego, CA). Debido a los muchos procesos implicados en la generación de la diversidad de anticuerpos, es improbable que los anticuerpos monoclonales independientemente derivados con la misma especificidad antigénica tengan idénticas secuencias de aminoácidos.

Por tanto, la presente invención proporciona nuevos anticuerpos que interactúan específicamente con GDF8, es decir anticuerpos específicos de GDF8. El anticuerpo o fragmentos de proteína de unión a antígeno de la invención, por ejemplo, estructuras que contienen una CDR, generalmente serán un anticuerpo o una secuencia de cadena pesada o ligera de proteína de unión a antígeno, o un fragmento activo de la misma, en la que la CDR se coloca en una localización correspondiente a la CDR de VH y VL de origen natural. Las estructuras y localizaciones de dominios variables de inmunoglobulina, por ejemplo, las CDR, pueden definirse utilizando esquemas de numeración bien conocidos como por ejemplo, el esquema de numeración de Kabat, el esquema de numeración de Chothia, una combinación de Kabat y Chothia (AcM), etc. (véase, por ejemplo, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services (1991), eds. Kabat y col.; Al-Lazikani y col. (1997) J. Mol. Bio. 273: 927-948).

Por tanto, la presente invención además proporciona nuevas CDR. La estructura para portar una CDR de la invención generalmente será un polipéptido, por ejemplo, un anticuerpo o una secuencia de cadena pesada o ligera de proteína de unión a antígeno o una parte sustancial de la misma en la que la CDR no se localiza en una posición correspondiente a la CDR de dominios VH y VL de origen natural. Las estructuras y localizaciones de dominios variables de inmunoglobulinas pueden determinarse como se describe, por ejemplo en Kabat y col., citado anteriormente y Al-Lazikani y col., citado anteriormente.

Los anticuerpos o moléculas de proteínas de unión a antígeno capaces de interactuar específicamente con los polipéptidos de la presente divulgación pueden producirse por procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, pueden producirse anticuerpos monoclonales por generación de hibridomas de acuerdo con procedimientos conocidos. Los hibridomas formados de esta manera se exploran después utilizando procedimientos convencionales, tales como ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y análisis Biacore para identificar uno o más hibridomas que producen un anticuerpo que interactúa específicamente con GDF8 (por ejemplo, se une a GDF8) y/o antagoniza (por ejemplo, inhibe, reduce, y/o neutraliza) al menos una actividad de GDF8, (por ejemplo, la unión de GDF8 con su receptor o con otros acontecimientos de señalización de GDF8 corriente abajo)).

GDF8 recombinante, GDF8 de origen natural y fragmentos peptídicos antigénicos de GDF8 pueden usarse como el inmunógeno. Un fragmento peptídico antigénico comprende al menos seis aminoácidos contiguos e incluye un epítipo de tal forma que un anticuerpo suscitado contra el mismo forma un complejo inmunitario específico con GDF8. Preferentemente, el péptido antigénico comprende al menos cuatro restos de aminoácidos. Adicionalmente, se prefiere que el fragmento peptídico antigénico de GDF8 comprenda un epítipo específico contra GDF8 (por ejemplo, un péptido que tenga y/o consista esencialmente en una secuencia de aminoácidos expuesta como SEC ID N°: 4, 6, 8, 10, 12 o transferencia de fragmento activo).

En una realización de la divulgación, puede usarse un péptido de GDF8 de longitud completa como el inmunógeno o como alternativa, pueden usarse los fragmentos peptídicos antigénicos del polipéptido. Por ejemplo, el inmunógeno puede ser un epítipo específico contra GDF8 (por ejemplo, un epítipo específico contra GDF8 y/o un epítipo para el cual los anticuerpos anti-GDF8 específicos y/o péptidos miméticos dirigidos al mismo son antagonistas específicos de la señalización de GDF8 (por ejemplo, una o más de las secuencias de aminoácidos de las SEC ID N°: 4, 6, 8, 10, 12 y fragmentos activos de las mismas)) y/o un péptido relacionado o péptido ciclado. Un péptido antigénico de un polipéptido de la presente divulgación comprende al menos cuatro restos de aminoácidos contiguos e incluye un epítipo tal como un anticuerpo suscitado contra el péptido que forma un complejo inmunoespecífico con el polipéptido. Preferentemente, el péptido antigénico comprende al menos cuatro restos de aminoácidos, más preferentemente al menos seis restos de aminoácidos e incluso más preferentemente al menos nueve restos de aminoácidos.

Como una alternativa para preparar hibridomas de secreción de anticuerpos monoclonales, un anticuerpo monoclonal contra un polipéptido de la presente invención puede identificarse y aislarse explorando una biblioteca de inmunoglobulina combinatoria recombinante (por ejemplo, una biblioteca de presentación de fagos de anticuerpos) con un polipéptido de la presente invención para de esta manera aislar miembros de la biblioteca de inmunoglobulina que se unen al polipéptido. Los expertos en la técnica conocen técnicas y kits disponibles comercialmente para generar y explorar bibliotecas de presentación de fagos. Adicionalmente, pueden encontrarse en la bibliografía ejemplos de procedimientos y reactivos particularmente susceptibles para su uso en la generación y exploración de anticuerpos o bibliotecas de presentación de proteínas de unión a antígeno.

Los sueros y anticuerpos policlonales pueden producirse inmunizando un sujeto adecuado con GDF8, sus variantes y/o partes de los mismos, por ejemplo, con un epítipo específico de GDF8 de la presente invención. El título del anticuerpo en el sujeto inmunizado puede controlarse a lo largo del tiempo por técnicas convencionales tales como con ELISA, o usando GDF8 inmovilizado u otra proteína marcadora, (por ejemplo, FLAG). Si se desea, las moléculas de anticuerpo dirigidas contra un polipéptido de la presente invención pueden aislarse del sujeto o de los medios de cultivo y purificarse adicionalmente por técnicas bien conocidas, tales como cromatografía con proteína A, para obtener una fracción de IgG.

De manera adicional, los anticuerpos quiméricos, humanizados y monocatenarios contra los polipéptidos de la presente invención que comprenden partes tanto humanas como no humanas, pueden producirse usando técnicas de ADN recombinante convencionales: los anticuerpos humanizados también pueden producirse usando ratones transgénicos que no pueden expresar genes de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina endógenos, pero que pueden expresar genes de cadena pesada y ligera humana.

Los anticuerpos o moléculas de proteína de unión a antígeno (que incluyen fragmentos) de la presente invención (por ejemplo, anticuerpos o moléculas de proteínas de unión a antígeno que interactúan específicamente con GDF8) incluyen, pero sin limitación, al anticuerpo monoclonal RK22, sus variantes (por ejemplo, variantes humanizadas) y fragmentos de los mismos. El anticuerpo o moléculas de proteína de unión a antígeno de la invención que interactúan específicamente con GDF8 también pueden ser antagonistas específicos de GDF8, y por tanto, estos anticuerpos o moléculas de proteína de unión a antígeno pueden ser útiles en la prevención o tratamiento de trastornos asociados con GDF8, por ejemplo, patologías óseas, musculares, adiposas y relacionadas con el metabolismo de la glucosa.

Por tanto, la invención también proporciona polinucleótidos purificados y aislados que codifican las regiones de anticuerpos específicos contra GDF8 que pueden antagonizar al menos una actividad de GDF8, por ejemplo RK22 y sus variantes. Las secuencias de ADN preferidas de la invención incluyen secuencias genómicas de ADN, ADNc y sintetizadas químicamente. Como se ha indicado anteriormente, los polinucleótidos que codifican regiones de un anticuerpo o proteína de unión a antígeno de la invención pueden comprender ADN o ARN y pueden ser sintéticas parcial o totalmente. La referencia a la secuencia de nucleótidos expuesta en el presente documento incluye moléculas de ADN con las secuencias específicas o secuencias complementarias, así como moléculas de ARN con la secuencia especificada en la que T se sustituye con U, salvo que el contexto requiera otra cosa.

Las secuencias de nucleótidos de la invención incluyen aquellas que codifican el dominio variable de la cadena ligera de RK22 murino, por ejemplo, la secuencia de nucleótidos expuesta como SEC ID N° 15. Las secuencias de nucleótidos de la invención también incluyen aquellas que codifican el dominio variable de cadena pesada del RK22 murino, por ejemplo, la secuencia de nucleótidos expuesta como SEC ID N°: 13. Los polinucleótidos de la presente invención también incluyen polinucleótidos que se hibridan en condiciones rigurosas con polinucleótidos que tienen y/o consisten esencialmente en la secuencia (o secuencias) de ácido nucleico sustancialmente expuestas como

SEC ID N°: 13 y 15, y sus complementos, y/o que codifican polipéptidos que conservan la actividad biológica sustancial (es decir, fragmentos activos) de los dominios variables de RK22. Los polinucleótidos de la presente invención también incluyen partes continuas de las secuencias expuestas como SEC ID N°: 13 y 15, que comprenden al menos 15 nucleótidos consecutivos.

5 La secuencia de aminoácidos de los dominios variables de cadena ligera de RK22 murino se expone como SEC ID N°: 16. Las secuencias de aminoácidos de los dominios variables de cadena pesada del RK22 murino se expone como SEC ID N°: 14. La secuencia de aminoácidos de los dominios de cadena pesada y ligera variable humanizados se exponen en las SEC ID N°: 17 y 18, respectivamente. La secuencia de aminoácidos de las CDR contenidas dentro de las cadenas pesadas del RK22 murino se exponen como SEC ID N°: 19-21 y 25-27. La
10 secuencia de aminoácidos de las CDR contenidas dentro de las cadenas ligeras del RK22 murino se exponen como SEC ID N°: 22-24 y 28-30. Los polipéptidos de la presente divulgación también incluyen partes continuas de cualquiera de las secuencias sustancialmente indicadas como SEC ID N°: 14, 16, 17, 18 y 19-30 que comprenden al menos 5 aminoácidos consecutivos. Un polipéptido preferido de la presente invención incluye fragmentos activos como SEC ID N°: 14, 16, 17, 18 y 19-30, es decir, cualquier parte continúa de cualquier secuencia expuesta como
15 SEC ID N°: 14, 16, 17, 18 y 19-30 que conservan actividad biológica sustancial de un anticuerpo o proteína de unión a antígeno de la invención. Además de estos polinucleótidos descritos anteriormente, la presente invención también incluye polinucleótidos que codifican una secuencia de aminoácidos sustancialmente expuesta como SEC ID N°: 14, 16, 17, 18 y 19-30, o una parte continua de los mismos y que difieren del anticuerpo o de los polinucleótidos de proteína de unión a antígeno descritos anteriormente solamente debido a la degeneración bien conocida del código
20 genético.

Como se ha descrito anteriormente, las CDR contienen la mayoría de los restos responsables de las interacciones específicas con un antígeno, y están incluidas dentro de los dominios VH y VL, es decir, el dominio variable de cadena pesada y el dominio variable de cadena ligera, respectivamente. Por lo tanto, una realización de la divulgación incluye anticuerpos que contienen una o más CDR que comprenden una secuencia de aminoácidos
25 seleccionada de una secuencia de aminoácidos expuesta como SEC ID N°: 19-30 o una secuencia de aminoácidos de sus fragmentos activos. Por consiguiente, un experto en la técnica reconocerá que los anticuerpos de la divulgación incluyen un anticuerpo o una proteína de unión a antígeno en la que las CDR de la cadena VL son una o más CDR de aquellas expuestas como SEC ID N°: 22-24 y 28-30 y/o las CDR de la cadena VH son una o más de las CDR de aquellas expuestas como SEC ID N°: 19-21 y 25-27.

30 Un fragmento de unión a antígeno puede ser un fragmento Fv, que consiste en dominios VH y VL. Por tanto, un fragmento Fv de RK22 puede constituir un anticuerpo de la invención, siempre que el fragmento interactúe específicamente con GDF8. Un experto en la técnica reconocerá que cualquier anticuerpo o fragmento de proteína de unión a antígeno que contenga el fragmento Fv de RK22 también puede ser un anticuerpo de la invención. Adicionalmente, cualquier fragmento Fv, fragmento scFv, fragmento Fab o fragmento F(ab')₂ que contiene una o
35 más CDR que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos expuestas como SEC ID N°: 19-30, también puede ser un anticuerpo o una proteína de unión a antígeno de la divulgación.

Determinadas realizaciones de la divulgación comprenden el dominio VH y/o VL del fragmento Fv de RK22. Los fragmentos de anticuerpos de la presente invención, por ejemplo, pueden producirse fragmentos Fab, F(ab')₂, Fd y dAb por escisión de los anticuerpos por ejemplo, RK22 de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, los fragmentos Fab y F(ab')₂ inmunológicamente activos pueden generarse tratando los anticuerpos con una enzima, por ejemplo, papaína y pepsina respectivamente.

Otras realizaciones comprenden una o más CDR (por ejemplo, una o más CDR expuestas como SEC ID N°: 19-21 y 25-27), de cualquiera de los dominios VH de un anticuerpo divulgado en el presente documento (por ejemplo, los dominios VH de RK22 (expuestos como SEC ID N°: 14 y 19) y dominios VL de un anticuerpo divulgado en el presente documento (por ejemplo, los dominios VL de RK22 (expuestos como SEC ID N°: 16 y 18)). Una realización comprende un fragmento H3 del dominio VH de RK22 (expuesto como SEC ID N°: 21).

Por comodidad, las posiciones aproximadas de cada CDR dentro de los dominios VH y VL se listan en la Tabla 2.

TABLA 2

Posición aproximada de la CDR de acuerdo con las definiciones de Kabat (sin cursiva) o de AcM (<i>en cursiva</i>) dentro de los dominios variables de los anticuerpos RK22 de ratón y humanizados		
CDR	RK22 SEC ID N°: 14	RK22 SEC ID N°: 17
H1	50-54 o <i>45-54</i>	26-35
H2	69-85 o <i>69-77</i>	50-66
H3	116-128 o <i>116-128</i>	99-109

50

(continuación)

Posición aproximada de la CDR de acuerdo con las definiciones de Kabat (sin cursiva) o de AcM (<i>en cursiva</i>) dentro de los dominios variables de los anticuerpos RK22 de ratón y humanizados		
	RK22 SEC ID Nº: 16	RK22 SEC ID Nº: 18
L1	44-60 o <i>44-60</i>	24-40
L2	76-82 o <i>76-82</i>	56-62
L3	115-123 o <i>115-123</i>	95-101

Los anticuerpos descritos en el presente documento pueden comprender adicionalmente anticuerpos o dominios constantes de proteínas de unión a antígeno o partes de los mismos. Por ejemplo, un dominio VL de la invención puede estar unido en su extremo C-terminal a un anticuerpo o dominio constante de cadena ligera de la proteína de unión a antígeno, por ejemplo, una cadena $C\kappa$ o $C\lambda$ humana, preferentemente una cadena CA. De manera similar, un fragmento de unión a antígeno específico basado en un dominio VH puede estar unido a su extremo C-terminal a toda o parte de una cadena pesada de inmunoglobulina derivada de cualquier isotipo de anticuerpo, por ejemplo, IgG, IgA, IgE e IgM y cualquiera de las subclases de isotipo, particularmente IgG1 e IgG4. En realizaciones ejemplares, los anticuerpos comprenden fragmentos C-terminales de cadenas pesadas y ligeras de IgG1 λ humana. Se entiende que, debido a la degeneración del código genético, las secuencias de ADN listadas en la breve descripción de las Secuencias 1 son únicamente representativas de ácidos nucleicos que codifican las secuencias de aminoácidos, péptidos y anticuerpos de interés, y no deben considerarse como limitantes.

Determinadas realizaciones de la divulgación comprenden el dominio VH y/o VL del fragmento Fv de RK22. Realizaciones adicionales comprenden una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de cualquiera de estos dominios VH y VL. Una realización comprende un fragmento H3 del dominio VH de RK22. En determinadas realizaciones, los dominios VH y VL de la invención, son de la línea germinal, es decir, regiones marco conservadas (FR) de estos dominios están cambiados utilizando técnicas de biología molecular convencionales para coincidir con las secuencias de aminoácidos consenso de los productos génicos de la línea germinal humana. Esto también se conoce como anticuerpo humanizado o de la línea germinal. En otras realizaciones, las secuencias marco conservadas permanecen diferenciadas de la línea germinal. Los anticuerpos humanizados pueden producirse usando ratones transgénicos que no pueden expresar genes de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina endógenos, pero pueden expresar genes de cadena pesada y ligera humana.

Un aspecto adicional de la invención proporciona procedimientos para obtener un dominio de unión a antígeno de anticuerpo específico para GDF8. El experto apreciará que los anticuerpos de la invención no se limitan a las secuencias específicas de los dominios VH y VL como se indica en la Tabla 2, sino que también incluyen variantes de estas secuencias que conservan la capacidad de unión con el antígeno. Dichas variantes pueden derivarse de las secuencias proporcionadas usando técnicas conocidas en la materia. Las sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos pueden realizarse tanto en las FR como en las CDR. Aunque los cambios en las regiones marco conservadas se diseñan normalmente para mejorar la estabilidad y reducir la inmunogenicidad del anticuerpo, los cambios en las CDR normalmente se diseñan para aumentar la afinidad del anticuerpo por su diana. Dichos cambios que aumentan la afinidad se determinan típicamente de manera empírica alterando la CDR y ensayando el anticuerpo. Dichas alteraciones pueden realizarse de acuerdo con procedimientos descritos en, por ejemplo, *Antibody Engineering*, 2ª edición Borrebaeck, Oxford University Press, 1995.

Por tanto, los anticuerpos o proteína de unión a antígeno (o fragmentos de los mismos) de la invención también incluyen aquellos que interaccionan específicamente con GDF8 y tienen mutaciones en los dominios constantes de las cadenas pesada y ligera. A veces es deseable mutar e inactivar determinados fragmentos del dominio constante. Por ejemplo, las mutaciones en el dominio constante pesado son a veces deseables para producir anticuerpos con unión reducida al receptor de Fc (FcR) y/o complemento; dichas mutaciones son bien conocidas en la técnica. Un experto en la técnica también reconocerá que la determinación de qué fragmentos activos de las subunidades CL y CH son necesarios dependerá de la aplicación en la que se aplique el anticuerpo de la invención. Por ejemplo, los fragmentos activos de las subunidades CL y CH que están implicados con su unión covalente entre sí, serán importantes en la generación de un anticuerpo intacto.

El procedimiento para crear un dominio VH que es una variante de secuencia de aminoácidos de un dominio VH expuesto en el presente documento comprende una etapa de añadir, eliminar, sustituir o insertar uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos del dominio VH descrito en el presente documento, combinando opcionalmente el dominio VH proporcionado de este modo con uno o más dominios VL, y ensayar el dominio VH o la combinación o combinaciones VH/VL con respecto a la interacción específica con GDF8 y (preferentemente) ensayar la capacidad de dicho dominio de unión a antígeno para modular una o más actividades asociadas a GDF8. El dominio VL puede tener una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente como se expone en el presente documento. Puede emplearse un procedimiento análogo en el que una o más variantes de secuencias de un dominio de VL desvelado en el presente documento se combinan con uno o más dominios VH.

Un aspecto adicional de la divulgación proporciona un procedimiento de preparación de un fragmento de unión a antígeno que interacciona específicamente con GDF8. El procedimiento comprende: proporcionar un repertorio de ácidos nucleicos de partida que codifican un dominio VH que bien incluye una CDR, por ejemplo, CDR3, a reemplazar o un dominio VH que carezca de una CDR, por ejemplo, CDR3, región codificante; combinar el repertorio con un ácido nucleico donador que codifique una CDR donadora de la invención (por ejemplo, un ácido nucleico donador que codifique una CDR que comprenda un fragmento activo de las SEC ID N^o: 14, 16, 17 y 18 de tal manera que el ácido nucleico donador se inserte en la región CDR, por ejemplo, CDR3, en el repertorio para proporcionar un repertorio de productos de ácidos nucleicos que codifiquen un dominio VH; expresar los ácidos nucleicos del repertorio producto; seleccionar un fragmento de unión a antígeno específico para GDF8; y recuperar el fragmento de unión a antígeno específico o ácido nucleico que lo codifica. De nuevo, puede emplearse un procedimiento análogo en el que una CDR de VL (por ejemplo, L3) de la invención se combina con un repertorio de ácidos nucleicos se codifican un dominio VL, que bien incluye una CDR a reemplazar o que carece de una región codificante de CDR.

Una secuencia codificante de una CDR de la invención (por ejemplo, CDR3) puede introducirse en un repertorio de dominios variables que carecen de una CDR (por ejemplo, CDR3), usando tecnología de ADN recombinante. Por ejemplo, Marks y col. ((1992) *Bio/Technology* 10: 779-83) describen procedimientos de producción de repertorios de anticuerpos o de dominios variables de proteína de unión a antígeno en los que los cebadores consenso dirigidos a o adyacentes al extremo 5' del área del dominio variable se usan junto con cebadores consenso de la tercera región marco conservada de genes VH humanos para proporcionar un repertorio de dominios variables VH que carezcan de una CDR3. El repertorio puede combinarse con una CDR3 de un anticuerpo particular. Usando técnicas análogas, las secuencias derivadas de CDR3 de la presente invención pueden redistribuirse con repertorios de dominios VH o VL que carezcan de una CDR3, y combinarse los dominios VH o VL completos redistribuidos con un dominio VL o VH afín para proporcionar fragmentos de unión a antígeno específicos de la invención. El repertorio puede posteriormente presentarse en un sistema hospedador adecuado, tal como el sistema de presentación de fagos del documento WO 92/01047, de manera que puedan seleccionarse fragmentos de unión a antígeno adecuados.

La redistribución o técnicas de combinación análogas también las desvela Stemmer ((1994) *Nature* 370: 389-91), que describe una técnica en relación a un gen de β -lactamasa pero observa que la estrategia puede usarse para la generación de anticuerpos. Una alternativa adicional es generar nuevos dominios VH o VL que lleven una secuencia derivada de CDR de la invención usando mutagénesis al azar de uno o más genes VH y/o VL seleccionados para generar mutaciones dentro de todo el dominio variable. Dicha técnica se describe en Gram y col. ((1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89: 3576-80) utilizando PCR propensa a errores. Otro procedimiento que puede usarse para generar nuevos anticuerpos o fragmentos de los mismos es la mutagénesis dirigida contra las CDR de genes de VH o VL. Dichas técnicas se desvelan en Barbas y col. ((1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 3809-13) y en Schier y col. ((1996) *J. Mol. Biol.* 263: 551-67).

De manera similar, una, dos, o las tres CDR pueden injertarse en un repertorio de dominios VH o VL, que después se exploran con respecto a un compañero de unión específico o fragmentos de unión específicos para GDF8. Una parte sustancial de un dominio variable de inmunoglobulina comprenderá al menos las CDR y, opcionalmente, sus regiones marco conservadas intervinientes de los fragmentos de anticuerpo como se expone en el presente documento. La parte también incluirá al menos aproximadamente el 50 % de cualquiera o ambas FR1 y FR4, siendo el 50 % el 50 % del C-terminal de la FR1 y el 50 % del N-terminal de FR4. Restos adicionales en el extremo N-terminal o C-terminal de la parte sustancial del dominio variable pueden ser aquellos no habitualmente asociados con dominios variables de origen natural. Por ejemplo, la construcción de anticuerpos específicos o fragmentos de proteína de unión a antígeno de la presente invención fabricados por técnicas de ADN recombinante pueden dar como resultado la introducción de restos N o C-terminales codificados por engarces introducidos para facilitar la clonación u otras etapas de manipulación. Otras etapas de manipulación incluyen la introducción de engarces para unir dominios variables de la invención con secuencias de proteína adicionales que incluyen cadenas pesadas de inmunoglobulina, otros dominios variables (por ejemplo, la producción de diacuerpos) o marcadores de proteínas como se analiza con más detalle más adelante.

Aunque las realizaciones ilustradas en los Ejemplos comprenden un par "de emparejamiento" de dominios VH y VL, la invención también incluye fragmentos de unión que contienen un solo dominio variable, por ejemplo, un fragmento dAb derivado de secuencias de dominio VH o VL, especialmente dominios VH. En el caso de cualquiera de los dominios monocatenarios de unión específica, estos dominios pueden usarse para explorar dominios complementarios que pueden formar un dominio de unión a antígeno específico de dos dominios capaz de unirse a GDF8. Esto puede realizarse por procedimientos de exploración de presentación de fagos usando la estrategia combinatoria dual jerárquica como se desvela por ejemplo, en el documento WO 92/01047. En esta técnica, una colonia individual que contiene un clon de cadena H o L se usa para infectar una biblioteca completa de clones que codifican la otra cadena (L o H) y el dominio de unión a antígeno específico bicatenaria resultante se selecciona de acuerdo con las técnicas de presentación de fagos, tales como las descritas en esa referencia. Esta técnica también se desvela en Marks y col., citado anteriormente.

Los anticuerpos pueden conjugarse por procedimientos químicos con radionúclidos, fármacos, macromoléculas u otros agentes, y pueden prepararse como proteínas de fusión que comprendan una o más CDR de la invención.

Un anticuerpo o proteína de fusión de unión a antígeno que contiene un par VH-VL en el que una de estas cadenas (normalmente la VH) y otra proteína se sintetizan como una sola cadena polipeptídica. Estos tipos de productos difieren de los anticuerpos en que generalmente tienen un elemento funcional adicional (por ejemplo, el resto activo de una molécula pequeña o la característica estructural molecular principal del conjugado o macromolécula fusionada).

Además de los cambios en la secuencia de aminoácidos indicada anteriormente, los anticuerpos pueden glucosilarse, pegarse o unirse a albúmina o a un polímero no proteico. Por ejemplo, los anticuerpos desvelados en el presente documento pueden unirse a uno de una variedad de polímeros no proteicos, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol, o polioxialquilenos. Los anticuerpos pueden modificarse químicamente, por ejemplo, para aumentar su semivida circulante por conjugación covalente con un polímero. En la técnica se conocen polímeros y procedimientos ejemplares para unirlos con péptidos.

En otras realizaciones, el anticuerpo o proteína de unión a antígeno puede modificarse para que tenga un modelo de glucosilación alterado (es decir, en relación al modelo de glucosilación original o nativo). Como se usa en el presente documento, "alterado" significa que tiene uno o más restos de carbohidrato eliminados y/o que tienen uno o más sitios de glucosilación añadidos al anticuerpo original. La adición de sitios de glucosilación a los anticuerpos desvelados en el presente documento se realiza por procedimientos bien conocidos de alteración de la secuencia de aminoácidos para que contenga secuencias consenso de sitios de glucosilación. Otro medio para aumentar el número de restos carbohidrato en los anticuerpos es por acoplamiento químico o enzimático de glucósidos a los restos de aminoácidos del anticuerpo. La eliminación de cualquier resto de carbohidrato presente en los anticuerpos puede realizarse química o enzimáticamente como es conocido en la técnica.

Los anticuerpos de la invención también pueden marcarse con un marcador detectable o funcional tal como ¹³¹I o ⁹⁹Tc, que puede unirse a los anticuerpos de la invención usando química convencional conocida en la técnica. Los marcadores también incluyen marcadores enzimáticos tales como peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina. Los marcadores además incluyen restos químicos tales como biotina, que pueden detectarse mediante la unión a un resto detectable afín específico, por ejemplo, avidina marcada.

Las regiones marco conservadas (FR) estructurales pueden modificarse más sustancialmente que las CDR sin afectar de un modo adverso a las propiedades de unión de un anticuerpo. Los cambios en las FR incluyen, pero sin limitación, la humanización de una región marco conservada derivada no humana o modificando por ingeniería genética determinados restos marco conservados que son importantes para el contacto con el antígeno o para estabilizar el sitio de unión, por ejemplo, cambiando la clase o subclase del dominio constante, cambiando los restos de aminoácidos específicos que podrían alterar una función efectora tal como la unión al receptor de Fc (por ejemplo, Lund y col. (1991) J. Immunol. 147: 2657-62; Morgan y col. (1995) Immunology 86: 319-24), o cambiando la especie a partir de la cual deriva el dominio constante. Los anticuerpos pueden tener mutaciones en el dominio CH2 de la cadena pesada que reduzcan o alteren la función efectora, por ejemplo, unión al receptor de Fc y activación del complemento. Por ejemplo, los anticuerpos pueden tener mutaciones tales como las descritas en las Patentes de Estados Unidos N° 5.624.821 y 5.648.260. Los anticuerpos también pueden tener mutaciones que estabilicen el enlace disulfuro entre las dos cadenas pesadas de una inmunoglobulina, tales como mutaciones en la región bisagra de IgG4, como se desvela por ejemplo en Angal y col. (1993) Mol. Immunol. 30: 105-08.

Los polipéptidos y anticuerpos de la presente divulgación también incluyen proteínas que son estructuralmente diferentes de los polipéptidos y anticuerpos desvelados, por ejemplo, que tienen una secuencia alterada pero sustancialmente las mismas propiedades bioquímicas que las de los polipéptidos y anticuerpos desvelados, por ejemplo, que tienen cambios solamente en aminoácidos funcionalmente no esenciales. Dichas moléculas incluyen variantes alélicas de origen natural y variantes modificadas deliberadamente por ingeniería genética que contienen alteraciones, sustituciones, reemplazos, inserciones o deleciones. Los expertos en la técnica conocen bien técnicas para realizar dichas alteraciones, sustituciones, reemplazos, inserciones o deleciones.

Los anticuerpos de la invención pueden producirse adicionalmente usando animales no humanos transgénicos que se modifican para producir anticuerpos completamente humanos en lugar de los anticuerpos endógenos del animal en respuesta a la exposición por un antígeno. Véase, por ejemplo, la Publicación PCT WO 94/02602. Los genes endógenos que codifican las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina en el hospedador no humano se han incapacitado, y los locus activos que codifican las inmunoglobulinas de cadena pesada y ligera humana se insertan en el genoma del hospedador. Los genes humanos se incorporan, por ejemplo, usando cromosomas artificiales de levadura que contienen los segmentos de ADN humano requeridos. Un animal que proporcione todas las modificaciones deseadas se obtiene posteriormente como progenie por cruzamiento con animales transgénicos que contengan menos del complemento entero de las modificaciones. Una realización de dicho animal no humano es un ratón, y se denomina XENOMOUSE™ como se describe en las Publicaciones PCT WO 96/33735 y WO 96/34096. Este animal produce linfocitos B que secretan inmunoglobulinas completamente humanas. Los anticuerpos pueden obtenerse directamente del animal después de la inmunización con un inmunógeno de interés como, por ejemplo, una preparación de un anticuerpo policlonal, o como alternativa a partir de linfocitos B inmortalizados derivados del animal, tales como hibridomas productores de anticuerpos monoclonales. Adicionalmente, los genes que codifican las inmunoglobulinas con dominios variables humanos pueden recuperarse y expresarse para obtener los anticuerpos directamente o pueden modificarse adicionalmente para obtener análogos de anticuerpos tales como,

por ejemplo, moléculas Fv monocatenarias.

Por consiguiente, el término anticuerpo o la expresión proteína de unión a antígeno como se usa en el presente documento incluye anticuerpos intactos, fragmentos de anticuerpos, por ejemplo fragmentos Fab, F(ab')₂, Fd, dAb y scFv y anticuerpos intactos y fragmentos que se han mutado en sus dominios constante y/o variable (por ejemplo, mutaciones que producen anticuerpos quiméricos, parcialmente humanizados o anticuerpos completamente humanizados, así como para producir anticuerpos con un rasgo deseado, por ejemplo, unión a GDF8 potenciada y/o unión a FcR reducida). Como tales, estos anticuerpos o proteína de unión a antígeno se incluyen en el ámbito de la invención, siempre que el anticuerpo o la proteína de unión a antígeno interactúe específicamente con GDF8.

También pueden emplearse otras moléculas de unión a proteínas para modular la actividad de GDF8. Dichas moléculas de unión a antígeno incluyen productos inmunofarmacéuticos modulares pequeños (SMIP™) (Trubion Pharmaceuticals, Seattle, WA). Los SMIP son polipéptidos monocatenarios compuestos de un dominio de unión para una estructura afín tal como un antígeno, o un contrarreceptor o similar, un polipéptido de región bisagra que tenga o bien uno o ningún resto de cisteína, y dominios CH2 y CH3 de inmunoglobulina. Los SMIP y sus usos y aplicaciones se describen por ejemplo en las Solicitudes de Patentes de Estados Unidos publicadas N° 2003/0118592, 2003/0133939, 2004/0058445, 2005/0136049, 2005/0175614, 2005/0180970, 2005/0186216, 2006/0202012, 2005/0202023, 2005/0202028, 2005/0202534 y 2005/0238646, y miembros de la familia de patentes relacionadas de las mismas.

La capacidad de unión de un anticuerpo o proteína de unión a antígeno de la invención puede medirse mediante los siguientes procedimientos: análisis Biacore, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), cristalografía de rayos X, análisis de secuencias y mutagénesis de barrido como se describe en los Ejemplos dados más adelante y otros procedimientos que se conocen bien en la técnica. La capacidad de un anticuerpo o proteína de unión a antígeno de la invención para inhibir, reducir y/o neutralizar una o más actividades asociadas con GDF8 puede medirse mediante la siguiente lista de procedimientos no limitantes: ensayos para medir la proliferación de una línea celular dependiente de GDF8; ensayos para medir la expresión de polipéptidos mediados por GDF8; ensayos para medir la actividad de moléculas de señalización corriente abajo; ensayos para probar la eficacia de un anticuerpo o proteína de unión a antígeno de la invención para prevenir trastornos musculares en un modelo animal relevante; ensayos como los descritos en los Ejemplos dados más adelante; y otros ensayos que son bien conocidos en la técnica.

Un aspecto adicional de la divulgación proporciona un procedimiento de selección de anticuerpos que pueden interactuar específicamente con GDF8, y/o antagonizar específicamente una o más actividades de GDF8. El procedimiento comprende: poner en contacto una pluralidad de anticuerpos con GDF8; seleccionar una segunda pluralidad de anticuerpos que se unen a GDF8; ensayar la capacidad de la segunda pluralidad de anticuerpos para unirse con otros miembros de la superfamilia de TGF-β; y seleccionar una tercera pluralidad de anticuerpos de la segunda pluralidad de anticuerpos en los que la tercera pluralidad de anticuerpos se una con menos afinidad a otros miembros de la súper familia de TGF-β.

En otra realización, el procedimiento comprende adicionalmente las etapas de: ensayar la capacidad de la tercera pluralidad de anticuerpos para antagonizar al menos una actividad de GDF8 (por ejemplo, impedir que GDF8 se una al receptor de GDF8); y seleccionar anticuerpos que pueden antagonizar una o más actividades de GDF8 (por ejemplo, impedir la unión de GDF8 con su receptor).

Los anticuerpos anti-GDF8 de la invención también pueden ser útiles para el aislamiento, purificación y/o detección de GDF8 en el sobrenadante (o sobrenadantes), lisados celulares o en la superficie celular. Los anticuerpos desvelados en la presente invención pueden usarse para realizar diagnósticos para controlar niveles de proteína GDF8 como parte de un procedimiento de ensayo clínico. Adicionalmente, los anticuerpos de la invención pueden usarse en tratamientos que requieran la neutralización y/o inhibición de uno o más trastornos asociados con GDF8, por ejemplo, tratamientos para patologías relacionadas con los músculos. La presente invención también proporciona nuevos polinucleótidos aislados y purificados y polipéptidos relacionados con nuevos anticuerpos dirigidos contra GDF8 humano. Los genes, polinucleótidos, proteínas y polipéptidos de la presente invención incluyen, pero sin limitación, anticuerpos murinos y humanizados contra GDF8, por ejemplo, RK22 y variantes de los mismos.

Polinucleótidos y polipéptidos recombinantes antagonistas.

La presente divulgación proporciona adicionalmente como antagonistas específicos de GDF8 los ácidos nucleicos aislados y purificados que codifican epítomos específicos contra GDF8, o péptidomiméticos o anticuerpos de los mismos, como se ha descrito anteriormente. Los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente divulgación pueden comprender ADN o ARN y pueden ser total o parcialmente sintéticos. La referencia a una secuencia de nucleótidos como se expone en el presente documento incluye moléculas de ADN con las secuencias especificadas o equivalentes genómicos, así como moléculas de ARN con las secuencias especificadas en las que T se sustituye por U, salvo que el contexto requiera otra cosa.

Los polinucleótidos aislados de la presente divulgación, por ejemplo, las SEC ID N°: 3, 5, 7, 9, 11, 13 y 15 pueden

5 usarse como sondas de hibridación y cebadores para identificar y aislar ácidos nucleicos que tengan secuencias idénticas a o similares a las que codifican los polinucleótidos descritos. Como ejemplo no limitante, los polinucleótidos aislados que usan un anticuerpo o polinucleótidos de proteína de unión a antígeno de esta manera pueden usarse, por ejemplo, para producir anticuerpos específicos contra GDF8 o para identificar células que expresen dichos anticuerpos. Los procedimientos de hibridación para identificar y aislar ácidos nucleicos incluyen reacción en cadena de la polimerasa (PCR), hibridaciones de Southern, hibridación *in situ* e hibridación de Northern, y son bien conocidos por los expertos en la técnica.

10 Las reacciones de hibridación pueden realizarse en condiciones de distintas rigurosidades. La rigurosidad de una reacción de hibridación incluye la dificultad con la cual cualquiera de las dos moléculas de ácido nucleico se hibridarán entre sí. Preferentemente, cada polinucleótido de hibridación hibrida con su polinucleótido correspondiente en condiciones de rigurosidad reducida, más preferentemente en condiciones rigurosas, y lo más preferentemente en condiciones de alta rigurosidad. Ejemplos de condiciones de rigurosidad se muestran en la Tabla 3 a continuación: las condiciones de alta rigurosidad son aquellas que son al menos tan rigurosas como por ejemplo, condiciones A-F; las condiciones rigurosas que son al menos tan rigurosas como, por ejemplo, condiciones G-L; y las condiciones de rigurosidad reducida son al menos tan rigurosas como, por ejemplo, las condiciones M-R.

TABLA 3

Condición	Híbrido	Longitud del híbrido (pb) 1	Temperatura de hibridación y Tampón 2	Temperatura de lavado y Tampón 2
A	ADN: ADN	> 50	65 °C; 1 X SSC -o- 42 °C; 1X SSC, 50 % formamida	65 °C; 0,3X SSC
B	ADN: ADN	<50	TB*; 1X SSC	TB*; 1X SSC
C	ADN: ARN	> 50	61 °C; 1 X SSC -o- 45 °C; 1X SSC, 50 % formamida	67 °C; 0,3X SSC
D	ADN: ARN	<50	TD*; 1X SSC	TD*; 1X SSC
E	ARN: ARN	>50	70 °C; 1X SSC -o- 50 °C; 1X SSC, 50 % formamida	70 °C; 0,3X SSC
F	ARN: ARN	<50	TF*; 1X SSC	TF*; 1X SSC
G	ADN: ADN	>50	65 °C; 4X SSC -o- 42 °C; 4X SSC, 50 % formamida	65 °C; 1 X SSC
H	ADN: ADN	<50	TH*; 4X SSC	TH*; 4X SSC
I	ADN: ARN	>50	67 °C; 4X SSC -o- 45 °C; 4X SSC, 50 % formamida	67 °C; 1X SSC
J	ADN: ARN	<50	TJ*; 4X SSC	TJ*; 4X SSC
K	ARN: ARN	>50	70 °C; 4X SSC -o- 50 °C; 4X SSC, 50 % formamida	67°C; 1X SSC
L	ARN: ARN	<50	TL*; 2X SSC	TL*; 2X SSC
M	ADN: ADN	>50	50 °C; 4X SSC -o- 40 °C; 6X SSC, 50 % formamida	50 °C; 2X SSC
N	ADN: ADN	<50	TN*; 6X SSC	TN*; 6X SSC
O	ADN: ARN	>50	55 °C; 4X SSC -o- 42 °C; 6X SSC, 50 % formamida	55 °C; 2X SSC
P	ADN: ARN	<50	TP*; 6X SSC	TP*; 6X SSC
Q	ARN: ARN	>50	60 °C; 4X SSC -o- 45 °C; 6X SSC, 50 % formamida	60 °C; 2X SSC
R	ARN: ARN	<50	TR*; 4X SSC	TR*; 4X SSC

1 La longitud del híbrido la que se espera para regiones hibridadas de los polinucleótidos hibridantes. Cuando se hibrida un polinucleótido con un polinucleótido diana de secuencia desconocida, la longitud del híbrido se supone que es la del polinucleótido hibridante. Cuando los polinucleótidos de secuencia conocida se hibridan, la longitud del híbrido puede determinarse alineando las secuencias de los polinucleótidos e identificando la región o regiones de complementariedad de secuencia óptima.

2 SSPE (1xSSPE es NaCl 0,15 M, NaH₂PO₄ 10 mM y EDTA 1,25 mM, pH 7,4) puede sustituirse por SSC (1xSSC es NaCl 0,15 M y citrato sódico 15 mM) en los tampones de hibridación y lavado; los lavados se realizan durante 15 minutos después de completar la hibridación.

TB* - TR*: La temperatura de hibridación para los híbridos que se anticipa que son de menos de 50 pares de bases de longitud debe ser de 5-10 °C menos que la temperatura de producción (Tm) del híbrido, donde Tm se determina de acuerdo con las siguientes ecuaciones. Para los híbridos de menos de 18 pares de bases de longitud, $T_m (^{\circ}\text{C}) = 2(n^{\circ} \text{ de A + bases de T}) + 4(n^{\circ} \text{ de G + bases de C})$. Para los híbridos de entre 18 y 49 pares de bases de longitud, $T_m (^{\circ}\text{C}) = 81,5 + 16: 6(\log_{10}\text{Na}^+) + 0,41(\%G + C) - (600/N)$, donde N es el número de bases en el híbrido, y Na+ es la concentración de iones de sodio en el tampón de hibridación (Na+ para 1X SSC= 0,165 M).

Los ejemplos adicionales de condiciones de rigurosidad para la hibridación de polinucleótidos se proporcionan en Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cap. 9 y 11, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989), y Ausubel y col., eds., *Current Protocol in Molecular Biology*, Secc. 2.10 y 6.3-6.4, John Wiley & Sons, Inc. (1995).

Los polinucleótidos aislados de la presente divulgación pueden usarse como sondas y cebadores de hibridación para identificar y aislar ADN que tengan secuencias que codifican variantes alélicas de los polinucleótidos desvelados. Las variantes alélicas son formas alternativas de origen natural de los polinucleótidos desvelados que codifican polipéptidos que son idénticos a o tienen una similitud significativa con los polipéptidos codificados por los polinucleótidos desvelados. Preferentemente, las variantes alélicas tienen al menos un 90 % de identidad de secuencia (más preferentemente, al menos un 95 % de identidad; lo más preferentemente, al menos un 99 % de identidad) con los polinucleótidos desvelados.

Los polinucleótidos aislados de la presente divulgación también pueden usarse como sondas y cebadores de hibridación para identificar y aislar ADN que tengan secuencias que codifican polipéptidos homólogos a los polinucleótidos desvelados. Estos homólogos son polinucleótidos y polipéptidos aislados a partir de una especie diferente que aquélla de los polipéptidos y polinucleótidos desvelados, o dentro de la misma especie, pero con una similitud de secuencia significativa con los polinucleótidos y polipéptidos desvelados. Preferentemente, los homólogos de polinucleótidos tienen al menos un 50 % de identidad de secuencia (más preferentemente al menos un 75 % de identidad; lo más preferentemente al menos un 90 % de identidad) con los polinucleótidos desvelados, mientras que los homólogos de polipéptidos tienen al menos un 30 % de identidad de secuencia (más preferentemente al menos un 45 % de identidad; lo más preferentemente al menos un 60 % de identidad) con los anticuerpos/polipéptidos desvelados. Preferentemente, los homólogos de los polinucleótidos desvelados y polipéptidos son aquéllos aislados a partir de especies de mamíferos.

Los polinucleótidos aislados de la presente divulgación también pueden usarse como sondas y cebadores de hibridación para identificar células y tejidos que expresan el epítipo (o los epítipos) específico para GDF8 o anticuerpos de la presente invención y las condiciones en las que se expresan.

Adicionalmente, los polinucleótidos aislados de la presente divulgación pueden usarse para alterar (es decir, potenciar, reducir, o modificar) la expresión de los genes correspondientes a los polinucleótidos de la presente divulgación en una célula u organismo. Estos "genes correspondientes" son las secuencias de ADN genómico de la presente divulgación que se transcriben para producir los ARNm a partir de los cuales los polinucleótidos de la presente divulgación se derivan.

La expresión alterada de secuencias relacionadas con la divulgación en una célula u organismo puede lograrse mediante el uso de varios polinucleótidos inhibidores, tales como polinucleótidos antisentido, ribozimas que se unen y/o escinden el ARNm transcrito a partir de los genes de la invención, oligonucleótidos que forman tripletes que se dirigen a regiones reguladoras de los genes, y ARN pequeño de interferencia que causa degradación específica de secuencia del ARNm diana (por ejemplo, Galderisi y col. (1999) *J. Cell. Physiol.* 181: 251-57; Sloud (2001) *Curr. Mol. Med.* 1: 575-88; Knauert y Glazer (2001) *Hum. Mol. Genet.* 10: 2243-51; Bass (2001) *Nature* 411: 428-29). Dichos polinucleótidos inhibidores se consideran antagonistas de la divulgación. Un experto en la técnica reconocerá que los polinucleótidos inhibidores de la divulgación deben dirigirse contra el epítipo (o los epítipos) específico para GDF8 como se proporciona anteriormente (y no anticuerpos antagonistas de la invención).

Los oligonucleótidos formadores de tripletes (TFO) incluidos por la presente divulgación se unen en el surco mayor de ADN dúplex con elevada especificidad y afinidad (Knauert y Glazer, anteriormente mencionado). La expresión de los genes de la presente divulgación puede inhibirse dirigiendo los TFO complementarios a las regiones reguladoras de los genes (es decir, las secuencias de promotor y/o potenciador) para formar estructuras de triple hélice que evitan la transcripción de los genes.

En una realización, los polinucleótidos inhibidores de la presente divulgación son moléculas de ARN pequeño de interferencia (ARNpi) (véase, por ejemplo, Galderisi y col. (1999) *J. Cell Physiol.* 181: 251-57; Sloud (2001) *Curr. Mol. Med.* 1: 575-88). Estas moléculas de ARNpi son moléculas de ARN dúplex cortas que causan la degradación específica de secuencia de los ARNm diana. Esta degradación se conoce como interferencia de ARN (ARNi) (por ejemplo, Bass (2001) *Nature* 411: 428-29). Identificado originariamente en organismos inferiores, el ARNi se ha aplicado de una manera efectiva a células de mamífero y se ha demostrado recientemente que evita la hepatitis fulminante en ratones tratados con moléculas de ARNpi dirigidas a ARNm de Fas (Song y col. (2003) *Nature Med.* 9: 347-51). Además, se ha divulgado recientemente que el ARNpi dispensado intratecalmente bloquea las respuestas de dolor en dos modelos (modelo de dolor inducido por agonista y modelo de dolor neuropático) en la

rata (Dom y col. (2004) *Nucleic Acids Res.* 32(5): e49).

La estructura de dúplex de las moléculas de ARNpi puede comprender una o más hebras de ARN polimerizado, es decir, la estructura de dúplex puede formarse por una sola hebra autocomplementaria que comprende un bucle de horquilla o dos hebras complementarias, también se ha descubierto que secuencias de ARNpi con inserciones, 5 delecciones, y mutaciones simples puntuales en relación a las secuencias diana también son efectivas en la inhibición de la expresión de la secuencia diana (Fire y col., Patente de los Estados Unidos 6.506.559). Por consiguiente, se prefiere que las moléculas de ARNpi comprendan una secuencia de nucleótidos con identidad de secuencia sustancial a al menos una porción del ARNm correspondiente a un epítipo diana específico de GDF8. Por ejemplo, 10 la región dúplex de una molécula de ARNpi puede tener una identidad de secuencia mayor del 90 %, y preferentemente un 100 % de identidad de secuencia, con al menos una porción del ARNm correspondiente al epítipo específico de GDF8 diana. Como alternativa, puede definirse la identidad de secuencia sustancial como la capacidad de al menos una hebra de la región dúplex de la molécula de ARNpi para hibridar con al menos una porción del epítipo específico de GDF8 diana bajo al menos, por ejemplo, condiciones rigurosas definidas como 15 condiciones G-L en la Tabla 3 anterior. En una realización preferente pero no limitante de la divulgación la molécula de ARNpi hibrida con al menos una porción de el epítipo específico de GDF8 diana en condiciones de elevada rigurosidad, por ejemplo, aquéllas que son al menos tan rigurosas como, por ejemplo, las condiciones A-F en la Tabla 3 anterior. La longitud de las secuencias de nucleótidos sustancialmente idénticas puede ser al menos de 10, 15, 19, 21, 23, 25, 50, 100, 200, 300, 400, o 500 nucleótidos, preferentemente 19-27 nucleótidos y más preferentemente de 19 o 21 nucleótidos (véase Fire, y col., anteriormente mencionado).

Los polinucleótidos inhibidores pueden diseñarse en base a criterios bien conocidos en la técnica (por ejemplo, 20 Elbashir y col. (2001) *EMBO J.* 20: 6877-88) y/o usando algoritmos bien conocidos (por ejemplo, algoritmos disponibles públicamente). Por ejemplo, la porción diana de un polinucleótido inhibidor de la invención (por ejemplo, la región dúplex de una molécula de ARNpi) debe empezar preferentemente con AA (lo más preferido), TA, GA, o CA; una molécula de ARNpi de la invención debe comprender preferentemente una secuencia en la que la relación 25 de GC es 45-55 %; una molécula de ARNpi de la invención preferentemente no debe contener tres de los mismos nucleótidos seguidos; y una molécula de ARNpi de la invención preferentemente no debe contener siete G/C mezclados seguidos. En base a estos criterios, o en otros criterios conocidos (por ejemplo, Reynolds y col. (2004) *Nat. Biotechnol.* 22: 326-30), las moléculas de ARNpi que se dirigen a un epítipo específico de GDF8 pueden diseñarse por un experto en la técnica. Por ejemplo, en una realización, una molécula de ARNpi puede tener y/o 30 consistir esencialmente en una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en la secuencia de nucleótidos de SEC ID N°: 3, las secuencia de nucleótidos de SEC ID N°: 5, la secuencia de nucleótidos de SEC ID N°: 7, la secuencia de nucleótidos de SEC ID N°: 9, la secuencia de nucleótidos de SEC ID N°: 11 y fragmentos de las mismas. En esta realización una molécula de ARNpi además comprende el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEC ID N°: 3, el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEC ID N°: 5, el complemento de la 35 secuencia de nucleótidos de SEC ID N°: 7, el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEC ID N°: 9, el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEC ID N°: 11 y los complementos de fragmentos de las mismas.

Por ejemplo, las moléculas de ARNpi pueden generarse hibridando dos moléculas de ARN monocatenarias complementarias juntas (Fire y col., anteriormente mencionado) o mediante el uso de una molécula de ARN en horquilla simple que se pliegan sobre sí misma para producir la porción bicatenaria requerida (Yu y col. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 6047-52). Las moléculas de ARNpi pueden sintetizarse químicamente (Elbashir y col. (2001) *Nature* 411: 494-98) o producirse por transcripción *in vitro* usando patrones de ADN monocatenario (Yu y col., 40 anteriormente mencionado). Como alternativa, las moléculas de ARNpi pueden producirse biológicamente, ya sea de manera transitoria (Yu y col., anteriormente mencionado; Sui y col. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 5515-20) o de manera estable (Paddison y col. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 1443-48), usando un vector (o vectores) de expresión, descrito a continuación, que comprende polinucleótidos en orientación sentido y/o 45 antisentido en relación a su promotor. Puede usarse ARN polimerasa recombinante para la transcripción *in vivo* o *in vitro*, o la ARN polimerasa endógena de una célula modificada puede mediar la transcripción *in vivo*. Recientemente, la reducción de niveles de ARNm diana en células humanas primarias, de una manera eficiente y específica de secuencia, se ha demostrado usando vectores adenovirales que expresan ARN en horquilla, que se procesan 50 adicionalmente en moléculas de ARNpi (Arts y col. (2003) *Genome Res.* 13: 2325-32).

Los polinucleótidos inhibidores pueden construirse usando reacciones de síntesis química y ligación enzimática incluyendo procedimientos bien conocidos en la técnica. Las uniones de nucleósidos de polinucleótidos sintetizados químicamente pueden modificarse para potenciar su capacidad para resistir la degradación mediada por nucleasas, 55 evitar una respuesta general de pánico en algunos organismos que se genera por ARN dúplex, y/o para aumentar su especificidad de secuencia. Dichas modificaciones de unión incluyen, pero sin limitación, fosforotioato, metilfosfonato, fosforoamidato, boranofosfato, morfolino, y uniones de ácidos nucleicos peptídicos (PNA) (Galderisi y col., anteriormente mencionado; Heasman (2002) *Dev. Biol.* 243: 209-14; Micklefield (2001) *Curr. Med. Chem.* 8: 1157-79).

Como se describe anteriormente, los polinucleótidos aislados, o porciones continuas de los mismos, relacionados con la presente invención pueden unirse operativamente en orientación sentido o antisentido a una secuencia de control de expresión y/o ligarse en un vector de expresión para la expresión recombinante de los polinucleótidos 60 inhibidores (por ejemplo, moléculas de ARNpi) de la invención.

La presente divulgación también proporciona construcciones en forma de plásmidos, vectores, casetes de transcripción o expresión que comprenden al menos un ácido nucleico de la divulgación como los anteriores.

Los polinucleótidos aislados de la presente divulgación pueden unirse operativamente a una secuencia de control de la expresión para la producción recombinante de los epítomos específicos (por ejemplo, como miméticos de péptidos) o anticuerpos de la presente invención. Adicionalmente, un experto en la técnica reconocerá que los polinucleótidos que codifican la proteína de unión a antígeno o anticuerpo de la presente divulgación pueden unirse operativamente a secuencias de nucleótidos bien conocidas que codifican el dominio constante de varios isotipos de anticuerpos. Por ejemplo, un polinucleótido de la invención que codifica un dominio variable de cadena ligera de la invención (por ejemplo, polinucleótidos con una secuencia de nucleótidos expuesta como SEC ID N°: 15 pueden unirse operativamente a una secuencia de nucleótidos que codifica el dominio constante (o derivados del mismo), o bien una cadena ligera κ o una cadena ligera λ , de tal forma que la expresión de los nucleótidos unidos de como resultado una cadena ligera kappa o lambda completa con un dominio variable que interactúa específicamente con y/o antagoniza específicamente con GDF8. De manera similar, un polinucleótido de la invención que codifica un dominio variable de cadena pesada de la invención (por ejemplo, a polinucleótido con una secuencia de nucleótidos expuesta como SEC ID N°: 13 puede unirse operativamente a una secuencia de nucleótidos que codifica el dominio constante de un isotipo de cadena pesada (o derivados del mismo), por ejemplo, IgM, IgD, IgE, IgG e IgA. Los procedimientos generales para expresar proteínas recombinantes son bien conocidos en la técnica. Dichas proteínas recombinantes pueden expresarse en forma soluble para su uso en el tratamiento de trastornos relacionados con GDF8. Los vectores de expresión recombinante de la invención pueden portar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en las células hospedadoras (por ejemplo, orígenes de replicación), secuencias marcadoras como histidina, y genes de marcadores de selección. El gen de marcador de selección facilita la selección de las células hospedadoras en las que el vector se ha introducido. Por ejemplo, el gen marcador de selección confiere típicamente resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato, en una célula hospedadora en la que el vector se ha introducido. Los genes marcadores de selección preferidos incluyen el gen de dihidrofolato reductasa (DHFR) (para su uso en células hospedoras dhfr con selección/amplificación de metotrexato) y el gen *neo* (para la selección de G418).

Se pueden elegir o construir vectores adecuados, que contienen secuencias reguladoras apropiadas, incluyendo secuencias de promotor, secuencias de terminación, secuencias de poliadenilación, secuencias de potenciador, genes marcadores y otras secuencias según sea necesario. Los vectores pueden ser plásmidos o virales, por ejemplo, fagos, o fagémidos, según sea necesario. Para más detalles véase, por ejemplo, Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 2^a ed., Sambrook y col., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. Varias técnicas conocidas y protocolos para la manipulación de ácidos nucleicos, por ejemplo, en la preparación de construcciones de ácido nucleico, mutagénesis, secuenciación, introducción de ADN en células y expresión génica, y análisis de proteína, se describen en detalle en Current Protocols in Molecular Biology, 2^a ed., Ausubel y col. eds., John Wiley & Sons, 1992.

La presente invención también proporciona una célula hospedadora que comprende una o más de las construcciones anteriores, por ejemplo, un ácido nucleico recombinante que codifica cualquier epítomo específico de GDF8, CDR (H1, H2, H3, L1, L2, o L3), dominio VH, dominio VL, o fragmentos de unión a antígenos específicos como se proporciona en el presente documento, forma un aspecto de la presente invención.

La presente invención también incluye un procedimiento para producir un péptido mediante la expresión de la proteína a partir del ácido nucleico codificante en una célula hospedadora. La expresión puede lograrse cultivando células hospedadoras recombinantes que contienen el ácido nucleico en condiciones apropiadas.

Una variedad de líneas celulares son células hospedadoras adecuadas para la expresión recombinante de los polipéptidos y anticuerpos de la presente invención. Las líneas celulares hospedadoras de mamífero incluyen pero sin limitación a: células COS, células CHO, células 293T, células A431, células 3T3, células CV-1, células HeLa, células L, células BHK21, células HL-60, células U937, células HaK, células Jurkat así como cepas celulares derivadas del cultivo *in vitro* de tejido primario y explantes primarios. Dichas células hospedadoras también permiten el empalme de los polinucleótidos de la invención que consisten en ADN genómico.

Como alternativa, puede ser posible producir recombinantemente los polipéptidos y anticuerpos de la presente invención en eucariotas inferiores tales como levaduras o en procariotas. Las cepas de levaduras potencialmente adecuadas incluyen pero sin limitación *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, cepas de *Kluyveromyces*, y cepas de *Candida*. Las cepas bacterianas potencialmente adecuadas incluyen *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, y *Salmonella typhimurium*. Si los polipéptidos de la presente invención se producen en levaduras o bacterias, puede ser necesario modificarlos mediante, por ejemplo, fosforilación o glucosilación de los sitios adecuados, para obtener proteínas funcionales. Dichas uniones covalentes pueden lograrse usando procedimientos químicos o enzimáticos bien conocidos.

Los polipéptidos y anticuerpos de la presente invención también pueden producirse recombinantemente uniendo operativamente los polinucleótidos aislados de la presente invención a secuencias de control adecuadas en uno o más vectores de expresión de insecto, tales como vectores de baculovirus, y empleando un sistema de expresión celular de insecto. Los materiales y procedimientos para los sistemas de expresión de baculovirus/Sf9 están disponibles comercialmente en forma de kit (por ejemplo, el kit MAXBAC®, Invitrogen, Carlsbad, CA).

Seguidamente a la expresión recombinante en las células hospedadoras apropiadas, los polipéptidos y anticuerpos de la presente invención pueden purificarse a partir del medio de cultivo o extractos celulares usando procedimientos de purificación conocidos, tales como filtración en gel y cromatografía de intercambio iónico. La purificación también puede incluir cromatografía de afinidad con agentes conocidos para unirse a los polipéptidos y anticuerpos de la presente invención. Estos procedimientos de purificación también pueden usarse para purificar los polipéptidos y anticuerpos de la presente invención a partir de orígenes naturales.

Como alternativa, los polipéptidos y anticuerpos de la presente invención pueden expresarse recombinantemente en una forma que facilite la purificación. Por ejemplo, los polipéptidos pueden expresarse como fusiones con proteínas tales como proteína de unión a maltosa (MBP), glutatión-S-transferasa (GST), o tiorredoxina (TRX). Los kits para la expresión y purificación de dichas proteínas de fusión están disponibles comercialmente a través de New England BioLabs (Beverly, MA), Pharmacia (Piscataway, NJ), e Invitrogen, respectivamente. Los polipéptidos y anticuerpos de la presente invención también pueden marcarse con un epítipo pequeño y a continuación identificarse o purificarse usando un anticuerpo específico o proteína de unión a antígeno al epítipo. Un epítipo preferido es el epítipo FLAG, que está disponible comercialmente a través de Eastman Kodak (New Haven, CT).

Los polipéptidos y anticuerpos de la presente invención también pueden producirse mediante síntesis química convencional conocida. Los procedimientos para sintetizar químicamente los polipéptidos y anticuerpos de la presente invención son bien conocidos para los expertos en la técnica. Dichos polipéptidos y anticuerpos químicamente sintéticos pueden poseer propiedades biológicas en común con los polipéptidos y anticuerpos purificados naturales, y por lo tanto pueden emplearse como sustitutos biológicamente activos o inmunológicos para los polipéptidos y anticuerpos naturales.

Un aspecto adicional de la presente invención proporciona una célula hospedadora que comprende ácidos nucleicos, polipéptidos, vectores, o anticuerpos y fragmentos de los mismos como se desvela en el presente documento. Otro aspecto adicional más proporciona un procedimiento que comprende introducir un ácido nucleico de la invención en una célula hospedadora. La introducción puede emplear cualquier técnica disponible. Para células eucariotas, las técnicas adecuadas pueden incluir transfección con fosfato de calcio, DEAE Dextrano, electroporación, transfección mediada por liposomas y transducción usando un retrovirus u otro virus, por ejemplo, vaccinia o, para células de insecto, baculovirus. Para células bacterianas, las técnicas adecuadas pueden incluir transformación por cloruro de calcio, electroporación e infección usando bacteriófago.

La introducción de ácidos nucleicos puede estar seguida por causar o permitir la producción de proteínas a partir del ácido nucleico, por ejemplo, cultivando las células hospedadoras en condiciones adecuadas para la expresión génica. Dichas condiciones son bien conocidas en la técnica.

Los polinucleótidos inhibidores, epítipo (o epítopos) específico de GDF8 (por ejemplo, como miméticos de péptidos y/o inmunógenos), fragmentos específicos de anticuerpos o proteína de unión a antígeno, dominios VH, y/o dominios VL y moléculas de ácido nucleico codificante y vectores de acuerdo con la presente invención pueden proporcionarse aislados y purificados, por ejemplo, a partir de su entorno natural en forma sustancialmente pura u homogénea, o, en el caso de ácidos nucleicos, libres o sustancialmente libres de ácidos nucleicos o genes de origen distinto del de la secuencia que codifica un polipéptido con la función requerida.

Procedimientos para Detectar y Cuantificar GDF8 en Muestras Biológicas

La presente divulgación se refiere a procedimientos para detectar y cuantificar GDF-8 en muestras biológicas. En algunas realizaciones, los procedimientos comprenden inmunoensayos para detectar y cuantificar tanto GDF-8 libre y total en suero, sangre y plasma. En un caso, los inmunoensayos proporcionan datos que son útiles como biomarcadores de terapias anti-GDF-8. Específicamente, los inmunoensayos desvelados pueden usarse como marcadores predictivos/pronósticos del resultado clínico inicial antes de la terapia anti-GDF-8, como un marcador de exposición a terapias anti-GDF-8, como un marcador de la eficiencia o respuesta a un fármaco anti-GDF-8, y como un marcador diagnóstico de la participación de GDF-8 en un estado de enfermedad o proceso biológico concreto.

En concreto, los procedimientos proporcionan procedimientos diagnósticos y/o pronósticos para detectar, diagnosticar, y predecir una enfermedad o trastorno asociado con GDF-8 en mamíferos con o en riesgo de desarrollar una enfermedad o trastorno asociado con GDF-8. Los procedimientos son especialmente adecuados para su uso en la evaluación de la conveniencia de que pacientes humanos reciban agentes moduladores de GDF-8, por ejemplo, aquéllos que se unen a GDF-8 o inhiben una actividad biológica de GDF-8.

En determinadas realizaciones, la divulgación proporciona procedimientos para evaluar el progreso de individuos que están recibiendo agentes moduladores de GDF-8 o terapias anti-GDF-8. Por ejemplo, se proporcionan procedimientos para evaluar la respuesta de un individuo a la terapia con un agente modulador de GDF-8. Para evaluar la respuesta de un individuo a la terapia, los procedimientos de inmunoensayo pueden proporcionarse antes de, durante, y después de la administración del agente modulador de GDF-8. Los procedimientos para detectar la presencia de GDF-8 en mamíferos que reciben un anticuerpo terapéutico MYO-029 también están incluidos por la divulgación.

En una realización, los procedimientos de inmunoensayo de la divulgación detectan GDF-8 libre. Por ejemplo, GDF-8 libre es GDF-8 que no se ha unido a proteínas de unión a GDF-8 o a agentes moduladores de GDF-8, tales como anticuerpos de unión o neutralización de GDF-8. En otra realización, los procedimientos para detectar GDF-8 total, por ejemplo GDF-8 libre más cualquier GDF-8 unido están incluidos.

5 Un individuo que tenga, o esté en riesgo de desarrollar, un trastorno relacionado con los músculos es un candidato para los procedimientos proporcionados en el presente documento. La inhibición de la actividad de GDF-8 aumenta la masa muscular en individuos, incluyendo aquéllos que padecen trastornos asociados con los músculos. Una variedad de trastornos se asocian con tejido muscular impedido funcionalmente, por ejemplo, distrofias musculares, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), atrofia muscular, atrofia de órganos, fragilidad, enfermedad pulmonar obstructiva
10 congestiva, insuficiencia cardíaca, sarcopenia, caquexia, y síndromes de pérdida muscular causados por otras enfermedades y afecciones. Además, un individuo o mamífero que desea aumentar la masa muscular o fuerza muscular, para aumentar el crecimiento o masa del tejido muscular en animales de granja, es un candidato para un procedimiento proporcionado en el presente documento.

15 Un individuo que tenga, o esté en riesgo de desarrollar, un trastorno o afección del tejido adiposo, metabólico, o relacionado con los huesos es también un candidato para un procedimiento descrito en el presente documento. Dichos trastornos o afecciones incluyen aquéllas asociadas con la homeóstasis de la glucosa tales como, por ejemplo, el desarrollo de diabetes de tipo 2, tolerancia a la glucosa impedida, síndromes metabólicos (por ejemplo, síndrome X), resistencia a la insulina inducida por trauma, tales como quemaduras o desequilibrio de nitrógeno, y trastornos del tejido adiposo (por ejemplo, obesidad) (Kim y col., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 281: 902-906 (2001)). Por ejemplo, GDF-8 modula la diferenciación de preadipocitos a adipocitos (Id.) e inhibe la formación de
20 adipocitos a partir de células precursoras mesenquimales y preadipocitos (Rebbapragada y col., *Mol. Cell Bio.* 23: 7230-7242 (2003)). La acumulación de grasas se reduce tanto en ratones con inactivación genómica de GDF-8 y en ratones de tipo silvestre adultos en los que la proteína GDF-8 se ha administrado de manera sistémica (McPherron y col., *J. Clinical Invest.* 109: 595-601 (2002); Zimmers y col., *Science* 296: 1486-1488 (2002)).

25 Otros usos para los procedimientos de la presente divulgación serán evidentes para aquellos expertos en la técnica y se ejemplifican adicionalmente a continuación.

Inmunoensayos

Los inmunoensayos descritos en el presente documento son ELISA tipo sándwich que utiliza al menos dos anticuerpos anti-GDF-8; uno presente como reactivo de captura de GDF-8 específico para GDF8 y uno presente
30 como reactivo de detección de GDF-8 específico para GDF8. Ambos anticuerpos son capaces de unirse a antígenos de GDF-8 presentes en muestras biológicas. Uno de los anticuerpos reconoce preferentemente GDF-8 sobre BMP-11. Ambos anticuerpos son capaces de reconocer y unirse a GDF-8. Además, en determinadas realizaciones, los anticuerpos son capaces de unirse a GDF-8 que está presente en cualquiera de sus formas biológicas (por ejemplo, GDF-8 activo, GDF-8 latente, GDF-8 unido a proteínas séricas, GDF-8 unido a anticuerpos neutralizantes anti-GDF-8 MYO-029).
35

En determinadas realizaciones, el anticuerpo usado en el sujeto de ensayo es RK35 (véase SEC ID N°: 31-35 y Solicitud de los Estados Unidos US2007/0087000) que es un anticuerpo monoclonal murino aislado que se une a GDF-8. En algunas realizaciones, RK35 se utiliza como anticuerpo de captura. Los fragmentos de RK35 que se unen a GDF-8 también pueden usarse en los procedimientos de la invención.

40 En determinadas realizaciones, un segundo anticuerpo usado en el sujeto de ensayo es RK22, un anticuerpo monoclonal murino aislado que se une a GDF-8. RK22 no se une a BMP-11, como se ejemplifica a continuación. En algunas realizaciones, RK22 se utiliza como reactivo de detección, en algunas realizaciones, se usa como reactivo de captura. Los fragmentos de RK22 que se unen a GDF-8 también pueden usarse en los ensayos.

45 En otra realización, los inmunoensayos utilizan el anticuerpo MYO-029, que es un anticuerpo IgG1 anti-GDF-8 humano. MYO-029 (véase SEC ID N°: 33 y 34, Solicitudes publicadas de los Estados Unidos 2006/0240488 y 2008/0240487), también pueden usarse para bloquear la detección de GDF-8 en los inmunoensayos para obtener un nivel de fondo que pueda sustraerse de la señal generada en la ausencia de MYO-029. Esta realización puede emplearse para aumentar la sensibilidad y precisión del ensayo cuantitativo.

50 Los anticuerpos útiles en los procedimientos de la divulgación también incluyen fragmentos de unión a antígeno, tales como, por ejemplo, fragmentos Fv, que consisten en los dominios VH y VL, fragmentos Fab (Fragmento de unión a antígeno), que consisten en los dominios VH-CH1 y VL-CL unidos covalentemente mediante una unión disulfuro entre las regiones constantes. Para otros fragmentos de unión a antígeno posibles, y una revisión de la estructura del anticuerpo, véase: *A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, eds. Harlow y col., 1988.

55 Los cultivos de *E. coli* individualmente transformados con el vector fagémido pCANTAB6 que codifica MYO-029 de scFv de línea no germinal se depositaron el 2 de Octubre de 2002, en la Colección Americana de Cultivos Tisulares (American Tissue Culture Collection, ATCC) bajo los respectivos números de Designación de Depósitos PTA-4741. La dirección del depósito es 10801 University Blvd, Manassas, VA 20110, EE.UU.

Después de combinar la muestra que contiene GDF8 con el reactivo de captura cualquier componente no unido se elimina mediante lavado, y los componentes a continuación se ponen en contacto con una muestra sospechosa de contener GDF-8 en condiciones adecuadas para la unión. Después de lavar para eliminar cualquier molécula no unida, se añade un segundo anticuerpo anti-GDF-8 en condiciones de unión adecuadas. Este segundo anticuerpo se llama anticuerpo o reactivo de detección. El anticuerpo de detección puede incluir un marcador detectable, y unirse a moléculas que han reaccionado con el anticuerpo de captura. Por lo tanto, cualquier GDF-8 presente se unirá tanto al reactivo de captura unido a GDF-8 en la muestra, como al reactivo de anticuerpo de detección. Las moléculas y componentes no unidos se eliminan mediante lavado. La presencia de un marcador por lo tanto indica la presencia de GDF-8 en la muestra biológica.

- 5
- 10 Más particularmente, puede usarse un procedimiento de ELISA sándwich. Una muestra biológica que contiene o se sospecha que contenga GDF-8 es un reactivo de captura específico para GDF8. Después de un período de incubación suficiente para permitir la unión de GDF-8 al reactivo de captura, la placa (o las placas) puede lavarse para eliminar los componentes no unidos y se añade un componente de detección. Estas moléculas se dejan reaccionar con cualquier muestra capturada de GDF-8, la placa se lava y se detecta la presencia del marcador usando procedimientos bien conocidos en la técnica.
- 15

Los reactivos de ensayo anteriormente descritos, incluyendo el inmunoensayo con antígenos, así como anticuerpos a reaccionar con la muestra capturada, pueden proporcionarse en kits, con instrucciones adecuadas y otros reactivos necesarios, para llevar a cabo inmunoensayos como los descritos anteriormente. El kit también puede contener, dependiendo del uso concreto del inmunoensayo, marcadores adecuados y otros reactivos empaquetados y materiales (por ejemplo, tampones de lavado). Los inmunoensayos, tales como los descritos anteriormente, pueden llevarse a cabo usando estos kits.

20

Realizaciones Específicas de los inmunoensayos

Análisis de GDF-8 Libre

En una realización, la presente divulgación comprende un procedimiento para detectar la presencia de GDF-8 libre en una muestra biológica. Un ejemplo representativo de esta realización se ilustra en la Figura 21.

25

Como se usa en el presente documento, la expresión GDF-8 libre incluye GDF-8 que está presente en su estado maduro activo. GDF-8 maduro puede ser un monómero, dímero, u homodímero. GDF-8 libre no abarca GDF-8 latente (es decir, GDF-8 maduro asociado con propéptido de GDF-8), GDF-8 asociado con proteínas de unión a GDF-8 o GDF-8 que está asociado con agentes moduladores anti-GDF-8, tales como, por ejemplo, anticuerpos de unión y neutralización de GDF-8.

30

En una realización, los procedimientos para detectar y cuantificar GDF-8 libre comprenden las siguientes etapas: (a) combinar un anticuerpo de captura de GDF-8 y una muestra en condiciones que permitan que GDF-8, cuando esté presente en la muestra biológica, se una a el uno o más anticuerpos de captura formando un complejo de captura anticuerpo-GDF-8; añadir un anticuerpo de detección en condiciones de formación de complejo, en las que el anticuerpo de detección se une al complejo de anticuerpo de captura-GDF-8; y (b) detectar los complejos formados entre el complejo de anticuerpo de captura-GDF-8 y el anticuerpo de detección, si lo hay, como una indicación de GDF-8 en la muestra biológica.

35

El anticuerpo de detección o proteína de unión a antígeno puede además comprender un marcador detectable. En algunos casos, el anticuerpo de detección no está marcado y se utiliza un agente de detección que reconoce específicamente al anticuerpo de detección.

40

Análisis de GDF-8 total

En una realización, la presente divulgación comprende un procedimiento para detectar la presencia de GDF-8 total en una muestra biológica.

Como se usa en el presente documento, la expresión GDF-8 total incluye GDF-8 que está presente en su forma activa, madura y cualquier GDF-8 que se encuentre presente en su forma latente (es decir, GDF-8 maduro asociado con propéptido de GDF-8), GDF-8 asociado con proteínas de unión a GDF-8, o GDF-8 que está asociado con agentes moduladores anti-GDF-8, tales como, por ejemplo, anticuerpos de unión y neutralizantes de GDF-8. Una medida del GDF-8 total incluye una medida de GDF-8 que está unido por el anticuerpo terapéutico MYO-029.

45

Disociación de ácido

En una realización, los procedimientos para detectar y cuantificar GDF-8 total utilizan un procedimiento de disociación de ácido, y comprenden las siguientes etapas: (a) combinar un anticuerpo de captura de GDF-8 con una muestra biológica en condiciones ácidas (entre aproximadamente pH 1,0 a aproximadamente pH 6,0, preferentemente aproximadamente pH 2,5) que permiten a GDF-8, cuando está presente en la muestra biológica, unirse a uno o más de los anticuerpos de captura formando un complejo anticuerpo de captura-GDF-8; añadir un anticuerpo de detección del GDF-8 en condiciones de formación de complejo, en las que el anticuerpo de detección

50

55

se une al complejo anticuerpo de captura-GDF-8; y (b) detectar los complejos formados entre el complejo anticuerpo de captura-GDF-8 y el anticuerpo de detección, en caso de que esté presente, como una indicación de GDF-8 en la muestra biológica.

- 5 El anticuerpo de detección o proteína de unión a antígeno puede además comprender un marcador detectable. En algunos casos, el anticuerpo de detección no está marcado y se usa un agente de detección que reconoce específicamente al anticuerpo de detección.

Disociación por calor

- 10 En otra realización, los procedimientos para detectar y cuantificar el GDF-8 total utilizan un procedimiento de disociación por calor, y comprenden las siguientes etapas: (a) poner en contacto un anticuerpo de captura de GDF-8 o proteína de unión a antígeno con una superficie de un soporte sólido; (b) calentar una muestra biológica hasta al menos 63 °C, tal como, por ejemplo, 65 °C, 70 °C, 75 °C, 80 °C, 85 °C o 90 °C; durante al menos 3 minutos, tal como, por ejemplo, 5, 7, 9, 10, 12, 14 o 15 minutos y combinar una muestra biológica con el soporte sólido en condiciones que permitan que GDF-8, cuando esté presente en la muestra biológica, se una a uno o más de los anticuerpos de captura formando un complejo anticuerpo de captura-GDF-8; (c) añadir un marcador de detección al soporte sólido de la etapa (b) en condiciones ácidas de formación de complejo, en las que el anticuerpo de detección se une al complejo anticuerpo de captura-GDF-8; y (d) detectar los complejos formados entre el complejo de anticuerpo de captura-GDF-8 y el anticuerpo de detección, en caso que se presente, como una indicación de GDF-8 en la muestra biológica.

- 20 El anticuerpo de detección o proteína de unión a antígeno puede comprender además un marcador detectable. En algunos casos, el anticuerpo de detección no está marcado y se utiliza un agente de detección que reconoce específicamente al anticuerpo de detección.

Unas realizaciones de este procedimiento se ilustran en la Figura 12, donde se muestra que el anticuerpo MYO-029 inhibe la señal producida por el anticuerpo de detección (por ejemplo, RK22 biotinilado). De este modo, el fondo de ensayo puede calcularse y restarse del valor obtenido en la etapa (d).

25 *Realizaciones alternativas para el análisis de GDF-8 libre y total*

- En determinadas realizaciones, el anticuerpo de captura se pone en contacto con la superficie de un soporte sólido, o un vaso de reacción, por ejemplo estando unido covalentemente o no covalentemente a la superficie. El contacto puede ser directo o indirecto. La superficie puede modificarse, por ejemplo mediante tratamiento químico o de radiación para afectar las características de unión de la superficie.

- 30 En determinadas realizaciones, después de poner en contacto el anticuerpo de captura con la muestra biológica y lavarlo para retirar componentes no unidos, se pueden minimizar interacciones no específicas con una etapa de bloqueo, en la que se añade un tampón que comprende al menos un agente bloqueante, tal como una proteína que no se une específicamente a la diana, al vaso de reacción. Los tampones de bloqueo pueden comprender tampones de bloqueo disponibles comercialmente, suero, seroalbúmina bovina, leche, caseína, gelatina, y/o detergentes no iónicos, por ejemplo. En algunas realizaciones, el vaso de reacción se lava con un tampón a un pH de entre aproximadamente 5 y aproximadamente 9, tal como un tampón citrato, tampón fosfato, tampón Tris o tampón acetato. Como alternativa, el tampón está aproximadamente entre pH 3,0 y pH 5,0, por ejemplo, en los procedimientos de disociación ácida para detectar y cuantificar GDF-8 total.

- 40 La muestra biológica a ensayar en los procedimientos de la invención puede elegirse entre suero, sangre, plasma, muestra de biopsia, muestra de tejido, suspensión celular, saliva, fluido oral, fluido cerebroespinal, fluido amniótico, leche, calostro, secreción de la glándula mamaria, linfa, orina, sudor, fluido sinovial y fluido lacrimal. En determinadas realizaciones, la muestra biológica es un fluido. En algunas realizaciones, la muestra biológica se selecciona entre sangre, suero y plasma. En realizaciones específicas, la muestra biológica es suero de por ejemplo, un humano, mono, rata, ratón, bovino, ovino, o suero de pollo.

- 45 En otras realizaciones, la muestra biológica se aísla de un individuo o individuos y se trata opcionalmente antes del ensayo. Por ejemplo, la muestra puede diluirse. El tampón de dilución puede comprender opcionalmente una cantidad constante de una muestra biológica de control, seleccionada para corresponder con la muestra biológica de ensayo, por ejemplo para controlar los efectos de fondo o interferencia en la matriz de muestra. En una realización, una muestra de ensayo de plasma humano se diluye en tampón THST (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, que contiene glicina 1,0 mM, NaCl 0,5 M y Tween 20® al 0,05 % (v/v)) 1: 8 veces, y se preparan diluciones de la muestra biológica por debajo de 8 veces en THST más suero humano al 12,5 % que se ha empobrecido en GDF-8. Una muestra biológica puede diluirse aproximadamente 2, 4, 5, 8, 10, 12, 14, 15, 16, 32, 64 o 128 veces. En otras realizaciones, una muestra biológica se diluye en serie 1: 1,5 o 1: 1,6 para obtener un intervalo de puntos de datos que permita la verificación de la linealidad dilucional y efectos de matriz. Para algunas matrices de muestras biológicas, se puede seleccionar una dilución en la que se optimizan la interferencia de matriz y la sensibilidad del ensayo.

El diluyente no está particularmente restringido pero puede comprender suero, incluyendo por ejemplo, suero humano, suero humano que se ha empobrecido en GDF-8, suero de ratón, suero de ratón que se ha empobrecido

5 en GDF-8, agua desionizada o varios tampones que tienen acción de tampón en el intervalo de pH de aproximadamente 3,0 a pH aproximadamente 9,0, dependiendo de si el ensayo se va a llevar a cabo en condiciones ácidas o no. Para el análisis de GDF-8 libre, llevado a cabo a pH neutro, el pH es aproximadamente de 6,5 a aproximadamente 8,5, de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,0, de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 7,5, de aproximadamente 7,5 a aproximadamente 8,0 o de aproximadamente 8,0 a aproximadamente 8,5 (por ejemplo tampón citrato, tampón fosfato, tampón Tris, tampón acetato o tampón borato). Para el análisis de GDF-8 total, llevado a cabo a un pH ácido, el pH es, por ejemplo, de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 2,5, de aproximadamente 2,5 a aproximadamente 5,5, de aproximadamente 2,5 a aproximadamente 3,0, de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 3,5, de aproximadamente 3,5 a aproximadamente 4,0, de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 4,5 o de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 5,5, de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5.

15 En algunas realizaciones, la muestra biológica puede fraccionarse opcionalmente o concentrarse usando procedimientos bien conocidos y después añadirse a un ensayo como se describe en el presente documento para detectar GDF-8. El fraccionamiento (incluyendo purificación) o concentración puede usarse, por ejemplo, si la interferencia de matriz limita la detección de un agente que modula GDF-8 en el ensayo. Las técnicas de fraccionamiento y concentración incluyen, pero no están limitadas a, centrifugación, precipitación por sulfato de amonio, precipitación por polietilenglicol, precipitación por ácido tricloroacético (TCA), técnicas de afinidad (tales como inmunoprecipitación con una resina conjugada a un compañero de unión específico tal como un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo anti-GDF-8), técnicas cromatográficas, y otras técnicas de separación.

20 Una muestra biológica puede recolectarse de un individuo no tratado previamente o la muestra biológica puede tomarse antes, durante o después de la administración de un agente de modulación de GDF-8. Por ejemplo, una muestra puede obtenerse de un individuo 1, 2, 4, 6, 7, 8, 10, 12, 14, 15, 20, 25, 30, o más días después de la administración de un agente modulador de GDF-8. Una muestra biológica también puede obtenerse 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 10, 12, 14, 16 o más semanas después de la administración de un agente modulador de GDF-8. En algunos casos, los puntos de tiempo de hasta un año o más son apropiados. Las muestras biológicas pueden ensayarse tanto para GDF-8 libre como total. Un análisis de GDF-8 total es particularmente importante en individuos que se están tratando con agentes moduladores de GDF-8, ya que estos agentes pueden interferir con la capacidad o bien la detección del agente de captura para unirse al GDF-8 en una muestra biológica. Por tanto, el procedimiento de disociación ácida o por calor utilizado en el análisis de GDF-8 total se convierte en especialmente importante.

30 En determinadas realizaciones, se pone en contacto una alícuota de la muestra biológica a ensayar con el anticuerpo de captura o proteína de unión a antígeno y se incuban durante un periodo de tiempo suficiente (por ejemplo, 2-120 minutos, o 1-4 horas) y en condiciones adecuadas (por ejemplo, 23 °C) para permitir la unión del anticuerpo de captura a GDF-8, en caso de que esté presente en la muestra biológica y dejar que se formen los complejos anticuerpo/GDF-8. En otras realizaciones, la reacción GDF-8/anticuerpo se lleva a cabo en las condiciones rutinarias para los inmunoensayos convencionales. Un procedimiento típico comprende incuban o dejar reposar un sistema de reacción que comprende al anticuerpo de captura y muestra biológica a una temperatura no por encima de los 45 °C, tal como, por ejemplo, entre aproximadamente 4 °C y aproximadamente 40 °C, o entre aproximadamente 23 °C y aproximadamente 40 °C durante entre aproximadamente 0.5 y 40 horas, tal como, por ejemplo, entre aproximadamente 1 y aproximadamente 20 horas.

40 Seguidamente al período de incubación, el complejo anticuerpo/GDF-8, en algunas realizaciones, se lava con tampón para retirar solutos no unidos. En otras realizaciones se efectúa un ensayo simultáneo, mediante el cual la muestra biológica y anticuerpo de detección se añaden al vaso de reacción de manera concurrente.

45 En realizaciones particulares, en las que el anticuerpo de detección se añade después de la muestra biológica, un procedimiento puede comprender incuban o dejar reposar un sistema de reacción que comprende al complejo anticuerpo/GDF-8 y anticuerpo de detección a una temperatura de no por encima de 45 °C, tal como, por ejemplo, entre aproximadamente 4 °C y aproximadamente 40 °C, o entre aproximadamente 25 °C y aproximadamente 40 °C durante aproximadamente 0,5 y 40 horas o entre aproximadamente 1 y aproximadamente 20 horas.

50 En algunas realizaciones, el anticuerpo de detección, proteína de unión a antígeno o fragmento de los mismos comprende un marcador detectable. En realizaciones adicionales, el anticuerpo de detección se detecta indirectamente, por ejemplo mediante un agente de detección. En algunas realizaciones, el agente de detección está en exceso, de tal manera que esencialmente todos los anticuerpos de detección que están presentes en el vaso de reacción están unidos.

55 En algunas realizaciones, un marcador "directo" puede ser cualquier molécula unida o conjugada a miembros de unión específicos que es capaz de producir espontáneamente una señal detectable sin la adición de reactivos auxiliares. Algunos ejemplos incluyen un radioisótopo (por ejemplo, ¹²⁵I, ³H, ¹⁴C), un fluoróforo (por ejemplo, luciferasa, proteína fluorescente verde, isotiocianato de fluoresceína, isotiocianato de tetrametilrodamina, 1-*N*-(2,2,6,6-tetrametil-1-oxil-4-piperidil)-5-*N*-(aspartato)-2,4-dinitrobenzeno), un tinte (por ejemplo, flocianina, ficoeritrina, Rojo de Texas, o-ftalaldehído), moléculas luminiscentes, incluyendo moléculas quimioluminiscentes y bioluminiscentes, partículas de oro coloidal, partículas de plata coloidal, otras partículas de metales coloidales, partículas de tinte de poliestireno, partículas coloreadas diminutas tales como soles de tinte, y partículas de látex

coloreado. Muchas otras moléculas marcadoras adecuadas son bien conocidas para los expertos en la técnica y pueden utilizarse en los procedimientos de la invención.

En determinados casos, el marcador puede ser una enzima tal como, por ejemplo, fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante, oxidasa de glucosa, o β -galactosidasa. En varias realizaciones, los sustratos a usar con las enzimas específicas se seleccionan para la producción, en presencia de la enzima correspondiente, de un cambio detectable en el color, fluorescencia, o luminiscencia. La enzima puede conjugarse con el anticuerpo o proteína de unión a antígeno mediante glutaraldehído o reticulación de aminación reductora. Como se reconocerá fácilmente, sin embargo, existen amplias variedades de diferentes técnicas de conjugación, y están fácilmente disponibles para un experto en la técnica.

En una realización preferente, el anticuerpo de detección o proteína de unión a antígeno está biotinilada. Los anticuerpos anti-GDF-8 útiles como anticuerpos de detección pueden biotinilarse como se expone en el Ejemplo 1 (véase, por ejemplo, Ejemplo 1: sección I, subsección 5) varios reactivos de biotinilación son capaces de marcar proteínas de una manera eficiente, incluyendo anticuerpos. Las relaciones molares de derivados de biotina a anticuerpo pueden ser de aproximadamente 10, 15, 20, 40 u 80 a 1, y los tiempos de reacción, concentraciones de reactivo, y temperaturas pueden variarse para ajustar la cantidad de biotina incorporada en la reacción. Los derivados de biotina son bien conocidos y están disponibles en la técnica, incluyendo brazos espaciadores variables, modificaciones para afectar la solubilidad, y/o grupos de reactivos para permitir la escisión del resto de biotina. Pueden usarse succinimidil ésteres de biotina y sus derivados, incluyendo sulfosuccinimidil ésteres solubles en agua para la biotinilación de GDF-8, por ejemplo. Para cuantificar la cantidad de biotina incorporada, se usan técnicas analíticas y de medida incluyendo, por ejemplo, cromatografía líquida de alta presión de fase reversa, espectroscopía de masa, etc. Adicionalmente, están disponibles kits comerciales para cuantificar la biotina mediante ensayos colorimétricos o fluorimétricos, por ejemplo, (véase, por ejemplo, EZ™ Biotin Quantitation Kit, Pierce, que utiliza HABA (ácido 2-(4'-hidroxiazobenceno)-benzoico).

En una realización, RK-22 biotinilado es un agente de detección para detectar la unión de GDF-8 a RK35.

En una realización particular, el agente de detección biotinilado y/o marcado con enzima tal como un anticuerpo o una proteína de unión a antígeno se añade al complejo GDF-8/anticuerpo, y se deja unir. El exceso de reactivo se lava, y a continuación se añade una solución que contiene un sustrato apropiado al vaso de reacción. El sustrato sufre una reacción catalizada por enzimas que da como resultado un cambio espectrofotométricamente medible que es indicativo de la cantidad de GDF-8 presente en la muestra.

Por ejemplo, un anticuerpo de detección biotinilado o proteína de unión a antígeno puede detectarse mediante su interacción con un conjugado avidina-enzima, por ejemplo, avidina-peroxidasa de rábano picante, después de una incubación secuencial con el conjugado avidina-enzima y un sustrato cromogénico o fluorogénico adecuado. Un anticuerpo de detección biotinilado también puede detectarse con estreptavidina marcada con europio.

En determinadas realizaciones, un complejo anticuerpo/GDF-8/anticuerpo asociado con la superficie del vaso de reacción se detecta mediante evaluación cualitativa o cuantitativa de la señal del marcador. En algunos casos, se mide el marcador directamente, por ejemplo, mediante fluorescencia o luminiscencia, o indirectamente, mediante la adición de un sustrato. En otros, el marcador se mide después de la incubación con un reactivo adicional. En realizaciones en las que el marcador es biotina, puede añadirse un conjugado de avidina (tal como peroxidasa de rábano picante) en un paso posterior. En una realización particular, el conjugado de avidina puede unirse al anticuerpo de detección inmovilizado o proteína de unión a antígeno. El exceso de conjugado de avidina se lava. Se añade a continuación un sustrato de la enzima, que da como resultado un cambio medible en, por ejemplo, color, fluorescencia o luminiscencia. En algunas realizaciones el sustrato para la peroxidasa de rábano picante es 3,3',5,5'-tetrametilbencidina.

Cuantificación de GDF-8 libre y total

Los niveles de GDF-8 pueden cuantificarse usando procedimientos bien conocidos para los expertos en la técnica. En determinadas realizaciones, los niveles de GDF-8 en una muestra biológica se comparan con un nivel conocido, tal como se obtiene, por ejemplo, usando una curva patrón. La generación de curvas patrón de GDF-8 se demuestra en el Ejemplo 15. La curva patrón puede comprender GDF-8 de concentraciones conocidas diluido en un tampón. En determinadas realizaciones, el tampón es suero, tal como, por ejemplo, suero humano, suero de ratón, suero de primate, suero bovino o suero ovino. El suero está opcionalmente desprovisto de GDF8 endógeno antes de la adición de concentraciones conocidas de GDF-8. El suero puede obtenerse ganado Azul Belga que está naturalmente desprovisto de GDF-8.

En una realización, un procedimiento para cuantificar GDF-8 libre en una muestra biológica comprende combinar un anticuerpo de captura de GDF-8 o proteína de unión a antígeno y una muestra biológica en condiciones que permitan a GDF-8, cuando está presente en la muestra biológica, unirse a el uno o más anticuerpos de captura formando un complejo de anticuerpos de captura o proteína de unión a antígeno-GDF-8; añadir un anticuerpo de detección de GDF-8 marcado o proteína de unión a antígeno al soporte sólido de la etapa (b); (d) detectar los complejos formados entre el complejo anticuerpo de captura-GDF-8 y el anticuerpo de detección mediante la

detección de una señal generada por el marcador en el anticuerpo de detección de GDF-8; y (e) cuantificar el nivel de GDF-8 en la muestra biológica comparando la señal generada por los complejos que contienen el anticuerpo de detección de GDF-8 marcado con una curva patrón generada determinando las intensidades de señal correspondientes para cantidades conocidas de GDF-8.

- 5 Los procedimientos para cuantificar GDF-8 total son similares, excepto que la muestra biológica se diluye en tampón ácido.

Procedimientos de tratamiento, mejora, prevención, e inhibición del progreso de trastornos asociados a GDF-8

10 La participación de GDF8 en el desarrollo y/o regulación de trastornos asociados con GDF, por ejemplo, músculo esquelético, hueso, homeostasis de la glucosa, etc., y el descubrimiento de antagonistas de GDF8 específicos novedosos de la invención permite procedimientos para tratar, mejorar o prevenir trastornos asociados con GDF8, por ejemplo, trastornos musculares, trastornos neuromusculares, trastornos degenerativos óseos, trastornos óseos metabólicos o inducidos, trastornos del metabolismo de la glucosa, trastornos adiposos, y trastornos relacionados con la insulina. Además, los antagonistas permiten diagnosticar, pronosticar y controlar el progreso de dichos trastornos midiendo el nivel de GDF8 en una muestra biológica. En concreto, los epítomos de antagonistas
15 específicos de GDF8 (por ejemplo, péptidos miméticos de éstos, polinucleótidos inhibidores de éstos, anticuerpos de éstos, moléculas pequeñas, etc.) de la invención pueden usarse para tratar a un individuo con un trastorno asociado con GDF8, o en un procedimiento para distinguir si un paciente padece un trastorno asociado con GDF8.

20 Los antagonistas de la presente invención son útiles para prevenir, diagnosticar o tratar varios trastornos médicos asociados con GDF8 en humanos o animales. Los antagonistas pueden usarse para inhibir, reducir y/o neutralizar una o más actividades asociadas con GDF8. Más preferentemente, los antagonistas inhiben o reducen una o más de las actividades de GDF8 en relación a GDF8 que no está en presencia de un antagonista de la invención. En determinadas realizaciones, un antagonista de la invención inhibe la actividad de GDF8 en al menos el 50 %, preferentemente al menos 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 72, 76, 78, 80, 82, 84, 86 u 88 %, más preferentemente al menos un 90, 91, 92, 93, o 94 %, y aún más preferentemente al menos de un 95 % a un 100 % en relación a la
25 proteína GDF8 madura que no está unida por uno o más anticuerpos anti-GDF8. La inhibición o neutralización de la actividad de GDF8 puede medirse, por ejemplo, en ensayos de gen indicador pGL3(CAGA)₁₂ (RGA) descritos en Thies y col., anteriormente mencionado, y en ensayos de receptor ActRIIB como se ilustra en los Ejemplos.

30 Los trastornos médicos diagnosticados, pronosticados, controlados, tratados, mejorados o prevenidos por los antagonistas desvelados en el presente documento son trastornos asociados con GDF8, por ejemplo, trastornos musculares o neuromusculares, incluyendo, por ejemplo, distrofia muscular (DM; incluyendo distrofia muscular de Duchenne), esclerosis lateral amiotrófica (ELA), atrofia muscular, atrofia de órganos, fragilidad, síndrome del túnel carpiano, enfermedad pulmonar obstructiva congestiva, sarcopenia, caquexia y síndromes de pérdida de masa muscular (por ejemplo, causados por otras enfermedades y afecciones). Además, otros trastornos médicos que
35 pueden diagnosticarse, pronosticarse, controlarse, tratarse, mejorarse o prevenirse por los anticuerpos de GDF8 son trastornos del tejido adiposo tales como obesidad, diabetes de tipo 2, tolerancia impedida a la glucosa, síndromes metabólicos (por ejemplo, síndrome X), resistencia a la insulina inducida por trauma (tales como quemaduras o desequilibrio de nitrógeno), o enfermedades degenerativas óseas (por ejemplo, artrosis y osteoporosis). En realizaciones preferentes, pero no limitantes, de la invención, los trastornos médicos que se diagnostican, pronostican, controlan, tratan, mejoran o previenen mediante los antagonistas desvelados en el presente documento son
40 trastornos musculares o neuromusculares. En una realización más preferida, pero no limitante, de la invención, los trastornos musculares o neuromusculares que se diagnostican, pronostican, monitorizan, tratan, mejoran o previenen mediante los antagonistas desvelados en el presente documento es o bien DM o ELA.

45 Otros trastornos médicos que pueden diagnosticarse, tratarse, mejorarse o prevenirse mediante los antagonistas desvelados en el presente documento son aquellos asociados con una pérdida de hueso, que incluye osteoporosis, especialmente en las mujeres ancianas y/o posmenopáusicas, osteoporosis inducida por glucocorticoides, osteopenia, artrosis, y fracturas relacionadas con osteoporosis. Otras enfermedades metabólicas y trastornos diana del hueso diana incluyen baja masa ósea debido a terapia crónica con glucocorticoides, fallo gonadal prematuro, supresión de andrógenos, deficiencia de vitamina D, hiper paratiroidismo secundario, deficiencias nutricionales, y anorexia nerviosa. Los antagonistas de la invención se usan preferentemente para prevenir, diagnosticar, mejorar, o
50 tratar dichos trastornos médicos en mamíferos, en concreto en humanos, por ejemplo, mujeres que vayan a estar o estén embarazadas.

Los antagonistas de la presente invención se administran en cantidades terapéuticamente efectivas. Generalmente, una cantidad terapéuticamente efectiva puede variar con la edad del sujeto, estado, y sexo, así como la severidad de la afección médica del sujeto. La dosificación puede determinarse por un médico y ajustarse, según sea
55 necesario, para adecuarse a los efectos observados del tratamiento. La toxicidad y eficacia terapéutica de dichos compuestos puede determinarse mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la DL50 (la dosis letal al 50 % de una población) y el DE50 (la dosis terapéuticamente efectiva en el 50 % de una población). La relación de dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos, es decir, el DL50/DE50) es el índice terapéutico, y se prefieren antagonistas que muestren elevados
60 índices terapéuticos.

Los datos obtenidos a partir de los ensayos en cultivo celular y estudios en animales pueden usarse para formular una variedad de dosificaciones para su uso en humanos. La dosificación de dichos compuestos se encuentra preferentemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluye la DE50 con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación y de la vía de administración. Para cualquier antagonista usado en la presente invención, la dosis terapéuticamente efectiva puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Una dosis puede formularse en modelos animales para lograr un intervalo de concentración en plasma circulante que incluye el CI50 (por ejemplo, la concentración del antagonista del ensayo que logra una inhibición de la mitad de la máxima de los síntomas de la actividad biológica) determinada en el cultivo celular. Los niveles en plasma pueden medirse, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alto rendimiento. Los efectos de cualquier dosificación particular pueden controlarse mediante un bioensayo adecuado. Los ejemplos de bioensayos adecuados incluyen, pero sin limitación, ensayos de replicación de ADN, ensayos basados en la transcripción, ensayos de unión de proteína GDF8/receptor, ensayos de creatinina cinasa, ensayos basados en la diferenciación de preadipocitos, ensayos basados en captación de glucosa en adipocitos y ensayos inmunológicos.

Generalmente, las composiciones se administran de tal forma que los antagonistas o sus fragmentos de unión se proporcionan a una dosis de aproximadamente de 1 µg/kg a 150 mg/kg, de 1 µg/kg a 100 mg/kg, de 1 µg/kg a 50 mg/kg, de 1 µg/kg a 20 mg/kg, de 1 µg/kg a 10 mg/kg, de 1 µg/kg a 1 mg/kg, de 10 µg/kg a 1 mg/kg, de 10 µg/kg a 100 µg/kg, de 100 µg a 1 mg/kg, y de 500 µg/kg a 1 mg/kg. Preferentemente, los antagonistas se proporcionan como una dosis en bolo para maximizar los niveles circulantes de antagonistas durante el periodo de tiempo más largo después de la dosis. La infusión continua también puede usarse antes, después o en lugar de la dosificación en bolo.

Procedimientos de identificación de agentes terapéuticos para trastornos asociados con GDF8

Otro aspecto adicional de la divulgación proporciona un procedimiento para identificar agentes terapéuticos útiles en el tratamiento de, por ejemplo, trastornos musculares, del metabolismo de la glucosa, adiposos y óseos. Los ensayos de evaluación apropiados, por ejemplo, ensayos basados en ELISA, son conocidos en la técnica. En dicho ensayo de evaluación, una primera mezcla de unión se forma combinando un antagonista, en particular un péptidomimético de un epítipo específico de GDF8 o un anticuerpo o proteína de unión antígeno de la divulgación y su ligando, GDF8, y se mide la cantidad de unión entre el ligando y el anticuerpo en la primera mezcla de unión (M0). También se forma una segunda mezcla de unión combinando el antagonista, el ligando y un compuesto o agente a evaluar, y se mide la cantidad de unión entre el ligando y el anticuerpo en la segunda mezcla de unión (M1). Las cantidades de unión en la primera y la segunda mezcla de unión se comparan, por ejemplo, calculando la proporción M1/M0. El compuesto o agente se considera capaz de interactuar específicamente con GDF8 si se observa una disminución en la unión en la segunda mezcla de unión en comparación con la primera mezcla de unión (es decir, M1/M0<0,9). La formulación y optimización de mezclas de unión se encuentra dentro del nivel de capacidad en la técnica; dichas mezclas de unión también pueden contener tampones y sales necesarias para potenciar u optimizar la unión, y se pueden incluir ensayos de control adicionales en el ensayo de evaluación.

Los compuestos en los que se encuentra que reducen la unión del antagonista-ligando en al menos aproximadamente un 10 % (es decir, M1/M0<0,9), preferentemente mayor de aproximadamente un 30 %, pueden por tanto identificarse y seguidamente, si se desea, evaluarse de una manera secundaria para su capacidad de inhibir la actividad de GDF8 en otros ensayos tales como el ensayo de unión ActRIIB, u otro ensayo basado en células e *in vivo* como se describe en los Ejemplos o bien conocidos en la técnica.

Moléculas pequeñas

También puede lograrse la inhibición de GDF8 en un organismo (o sujeto) afectado por (o en riesgo de) un trastorno asociado con GDF8, o en una célula de dicho organismo involucrada en dichos trastornos, mediante el uso de moléculas pequeñas antagonistas (generalmente moléculas pequeñas orgánicas) que antagonizan, es decir, inhiben la actividad de GDF8. Se pueden identificar pequeñas moléculas antagonistas novedosas mediante los procedimientos de evaluación descritos anteriormente y pueden usarse en los procedimientos de tratamiento descritos en el presente documento.

Por el contrario, aumentar la actividad de GDF8 en un organismo (o sujeto) afectado por (o en riesgo de) un trastorno relacionado con la expresión y/o actividad disminuida de GDF8 o un trastorno relacionado con niveles disminuidos de GDF8 también puede lograrse mediante el uso de moléculas pequeñas (generalmente moléculas pequeñas orgánicas) que agonizan, es decir, potencian la actividad de GDF8. Pueden identificarse pequeñas moléculas novedosas agonistas mediante los procedimientos de evaluación y pueden usarse los procedimientos de tratamiento de la presente invención descritos en el presente documento.

Procedimientos de diagnóstico, pronóstico y control del progreso de trastornos asociados con GDF8

Además del tratamiento por ejemplo, de trastornos musculares, óseos, del metabolismo de glucosa, y de tejido adiposo, la presente invención proporciona procedimientos para el diagnóstico de dichos trastornos detectando la disminución o aumento de GDF8 en una muestra biológica, por ejemplo, suero, plasma, líquido de lavado bronco

alveolar, esputo, biopsias, (por ejemplo, de tejido muscular), etc. “Diagnóstico” o “diagnosticar” significa identificar la presencia o ausencia de una afección patológica. Los procedimientos de diagnóstico implican detectar la presencia de GDF8 por ejemplo, determinando una cantidad de ensayo del polipéptido de GDF8 en una muestra biológica de un sujeto (mamífero humano o no humano) y comparar la cantidad de ensayo con una cantidad o intervalo normal (por ejemplo, una cantidad o intervalo de un individuo (o individuos) que se sabe que no padecen dicho trastorno) para el polipéptido GDF8. Mientras que un procedimiento de diagnóstico particular puede no proporcionar un diagnóstico definitivo de trastornos asociados con GDF8, es suficiente si el procedimiento proporciona una indicación positiva que ayude al diagnóstico.

La presente divulgación también proporciona procedimientos para el pronóstico de enfermedades asociadas con GDF8, por ejemplo, enfermedades musculares, óseas, del metabolismo de glucosa y del tejido adiposo, detectando la regulación positiva de GDF8. “Pronóstico” o “pronosticar” significan predecir el desarrollo probable y/o gravedad de una afección patológica. Los procedimientos de pronóstico implican determinar la cantidad de ensayo de GDF8 en una muestra biológica de un sujeto y comparar la muestra de ensayo con una cantidad o intervalo de pronóstico (por ejemplo, una cantidad o intervalo de individuos con gravedades diversas de, por ejemplo, ELA) para GDF8. Diversas cantidades de GDF8 en una muestra de ensayo son coherentes con determinados pronósticos de enfermedades asociadas con GDF8. La detección de una cantidad de GDF8 a un nivel de pronóstico particular proporciona un diagnóstico para el sujeto.

La presente divulgación también proporciona procedimientos para controlar la evolución de las enfermedades musculares, óseas, del metabolismo de glucosa y del tejido adiposo asociadas con GDF8, detectando la regulación positiva o negativa de GDF8. Los procedimientos de control implican determinar las cantidades de ensayo de GDF8 en muestras biológicas extraídas de un sujeto en un primer y segundo tiempo, y comparar las cantidades. Un cambio de cantidad de GDF8 entre el primer y segundo tiempo indica un cambio en el transcurso de, por ejemplo, gravedad de trastornos asociados con GDF8. Un experto en la técnica reconocerá que en los trastornos asociados con GDF8 en los que es deseable un aumento en la masa muscular, una disminución en la cantidad de proteína GDF8 y/o actividad entre el primer y segundo tiempo indica la remisión del trastorno, y un aumento en la cantidad indica la progresión del trastorno. Por el contrario, para los trastornos asociados con GDF8 en las que es deseable una disminución en la masa muscular, una disminución en la cantidad de proteína GDF8 y/o actividad entre el primer y segundo tiempo indica la progresión del trastorno y un aumento de cantidad indica la remisión del trastorno. Dichos ensayos de control son también útiles para evaluar la eficacia de una intervención terapéutica particular (por ejemplo, la atenuación y/o inversión de una enfermedad) en pacientes que se están tratando de trastornos asociados con GDF8.

Los antagonistas de la presente invención pueden usarse para el diagnóstico, pronóstico o control detectando la presencia de GDF8 *in vivo* o *in vitro*. Dichos procedimientos de detección bien conocidos en la técnica incluyen ELISA, radioinmunoensayo, inmunotransferencia, transferencia de Western, inmunofluorescencia, inmunoprecipitación y otras técnicas comparables. Los antagonistas pueden además proporcionarse en un kit de diagnóstico que incorpora una o más de estas técnicas para detectar GDF8. Dicho kit puede contener otros componentes, envases, instrucciones u otro material que ayude a la detección de la proteína y uso del kit.

En los casos en los que los antagonistas están diseñados con propósitos diagnósticos, pronósticos y de control, puede ser deseable modificarlos, por ejemplo, con un grupo ligando (tal como biotina) o con un grupo marcador detectable (tal como un grupo fluorescente, un radioisótopo o una enzima). Si se desea, los antagonistas (ya sean policlonales o monoclonales) pueden marcarse usando técnicas convencionales. Los marcadores adecuados incluyen fluoróforos, cromóforos, átomos radioactivos, reactivos densos a los electrones, enzimas, y ligandos que tienen compañeros de unión específicos. Las enzimas se detectan típicamente por su actividad. Por ejemplo, la peroxidasa de rábano picante puede detectarse por su capacidad de convertir tetrametilbenzidina (TMB) en un pigmento azul, cuantificable con un espectrofotómetro. Otros marcadores adecuados pueden incluir biotina y avidina o estreptavidina, IgG y proteína A, y los numerosos pares receptor/ligando conocidos en la técnica.

Composiciones farmacéuticas y procedimiento de administración

La presente invención proporciona composiciones que comprenden los antagonistas desvelados en el presente documento de la divulgación, es decir, polipéptidos, polinucleótidos, vectores, anticuerpos, fragmentos de proteínas de unión a anticuerpo o antígeno y moléculas pequeñas. Dichas composiciones pueden ser adecuadas para uso farmacéutico y administración a pacientes. Las composiciones comprenden típicamente una o más moléculas de la presente invención, preferentemente una proteína de unión a anticuerpo o antígeno y un excipiente farmacéuticamente aceptable. Los antagonistas de la presente invención pueden usarse *in vitro*, *ex vivo* o incorporarse en una composición farmacéutica cuando se combinan con un transportador farmacéuticamente aceptable. Como se usa en el presente documento, la frase “excipiente farmacéuticamente aceptable” incluye cualquiera y todos los disolventes, soluciones, tampones, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos retardantes de la absorción, que son compatibles con la administración farmacéutica. Dicha composición puede contener, además de los antagonistas de la invención y el transportador, varios diluyentes, cargas, sales, tampones, estabilizantes, solubilizantes y otros materiales bien conocidos en la técnica. La expresión “farmacéuticamente aceptable” significa un material no tóxico que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica del principio (o principios) activos. Las características del transportador

dependerán de la vía de administración. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Las composiciones también pueden contener otros compuestos activos que proporcionen funciones terapéuticas complementarias, adicionales o potenciadas. Las composiciones farmacéuticas también pueden incluirse en un envase, paquete o dispensador junto con instrucciones para su administración.

5 La composición farmacéutica de la invención puede estar en forma de liposoma en el cual un antagonista de la invención se combina, además de con otros transportadores farmacéuticamente aceptables, con agentes anfipáticos tales como lípidos que existen en forma agregada como micelas, monocapas insolubles, cristales líquidos o capas laminares mientras estén en solución acuosa. Los lípidos adecuados para formulación liposomal incluyen, sin limitación, monoglicéridos, diglicéridos, sulfatidas, lisolecitina, fosfolípidos, saponina, ácidos biliares. La preparación
10 de dichas formulaciones liposomales se encuentra dentro del nivel de la experiencia de la técnica.

Como se usa en el presente documento, la expresión “cantidad terapéuticamente eficaz” significa la cantidad total de cada componente activo de la composición farmacéutica o procedimiento que es suficiente para mostrar un beneficio significativo al paciente, por ejemplo, mejora de los síntomas, curación, o aumento en la tasa de curación de dichas afecciones. Cuando se aplica a un principio activo individual, administrado en solitario, el término se refiere solo a ese ingrediente. Cuando se aplica a una combinación, el término se refiere a las cantidades combinadas de los principios activos que dan como resultado el efecto terapéutico, tanto si se administran en combinación, en serie o simultáneamente.
15

En la realización práctica del procedimiento de tratamiento o uso de la presente invención, una cantidad terapéuticamente eficaz de, por ejemplo, un antagonista específico para GDF8 se administra a un sujeto, por ejemplo, un mamífero (por ejemplo, un ser humano). Un antagonista de la invención puede administrarse de acuerdo con el procedimiento de la invención ya sea en solitario o en combinación con otras terapias tales como agentes antiinflamatorios. Cuando se coadministra con uno o más agentes, un antagonista de la invención puede administrarse simultáneamente con el segundo agente o secuencialmente. Si se administra secuencialmente, el médico tratante decidirá la secuencia apropiada de administración de un antagonista de la invención en combinación con otros agentes.
20
25

En una realización, los antagonistas de la invención, por ejemplo, sus composiciones farmacéuticas, se administran en terapia de combinación, es decir, combinados con otros agentes, por ejemplo, agentes terapéuticos, que son útiles para el tratamiento de afecciones o trastornos patológicos, tales como trastornos musculares, trastornos neuromusculares, trastornos óseo degenerativos, trastornos óseos inducidos o metabólicos, trastornos de tejido adiposo, trastornos del metabolismo de glucosa o trastornos relacionados con la insulina, por ejemplo, así como trastornos alérgicos e inflamatorios. La expresión “en combinación” en este contexto significa que los agentes se proporcionan sustancialmente de manera contemporánea, bien simultáneamente o secuencialmente. Si se proporcionan de manera secuencial, al comienzo de la administración del segundo compuesto, el primero de los dos compuestos es preferentemente aún detectable a concentraciones eficaces en el sitio de tratamiento o en el sujeto.
30

Una composición farmacéutica de la invención se formula para ser compatible con la vía de administración deseada. Los procedimientos para realizar la administración son bien conocidos por el experto habitual en la materia. También es posible obtener composiciones que pueden administrarse por vía tópica u oral, o que pueden atravesar las membranas mucosas. La administración de un antagonista de la invención usado en una composición farmacéutica para realizar el procedimiento de la presente invención puede efectuarse de diversas formas convencionales, tales como ingestión oral, inhalación, inyección cutánea, subcutánea o intravenosa.
35
40

Las soluciones o suspensiones utilizadas para aplicación intradérmica o subcutánea típicamente incluyen uno o más de los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites no volátiles, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metil parabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito sódico; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos; y agentes para ajustar la tonicidad tal como cloruro de sodio o dextrosa. El pH puede ajustarse con ácidos o bases, tal como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. Dichas preparaciones pueden incluirse en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiples fabricados en vidrio o plástico.
45

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para inyección incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación improvisada de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los transportadores farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacterioestática, Cremophor™ EL (BASF, Parsippany, NJ) o solución salina tamponada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser líquida hasta el punto de que exista una fácil aplicación con jeringa. Un transportador farmacéuticamente aceptable debe ser estable en las condiciones de fabricación y conservación y deben protegerse contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El transportador puede ser un medio disolvente o de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido) y mezclas adecuadas de los mismos. La correcta fluidez puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, para la conservación del tamaño de partículas requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede realizarse por diversos agentes antibacterianos y antifúngicos,
50
55
60

por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol y cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede realizarse incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

5 Cuando se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o proteína de unión a antígeno de la invención por ejemplo, por inyección intravenosa, cutánea o subcutánea, el agente de unión estará en forma de una solución acuosa libre de pirógenos parenteralmente aceptable. La preparación de dichas soluciones de proteína parenteralmente aceptables, teniendo en cuenta el pH, isotonicidad, estabilidad, se encuentra dentro de la habilidad en la técnica. Una composición farmacéutica preferida para inyección intravenosa, cutánea o subcutánea debe
10 contener, además de agentes de unión, un vehículo isotónico, tal como cloruro de sodio para inyección, Ringer para inyección, dextrosa para inyección, dextrosa y cloruro sódico para inyección, Ringer lactada para inyección, u otro vehículo como se conoce en la técnica. La composición (o composiciones) farmacéuticas de la presente invención también puede contener estabilizantes, conservantes, tampones, antioxidantes u otro aditivos conocido por los expertos en la técnica.

15 La cantidad de un antagonista de la invención en la composición farmacéutica de la presente invención dependerá de la naturaleza y de la gravedad de la afección que vaya a tratarse y de la naturaleza de los tratamientos previos a los que se ha sometido el paciente. Finalmente, el médico tratante decidirá la cantidad de antagonista con la que debe tratarse a cada paciente individual. Inicialmente, un médico tratante administra dosis bajas del antagonista y observa la respuesta del paciente. Pueden administrarse dosificaciones más grandes de antagonista hasta que se
20 obtiene un efecto terapéutico óptimo para el paciente y en este momento la dosificación generalmente no se aumenta más. Se contempla que las diversas composiciones farmacéuticas usadas para la realización práctica del procedimiento de la presente invención deben contener de aproximadamente 0,1 mg a 50 µg de antagonista por kg de peso corporal.

25 La duración de la terapia utilizando la composición farmacéutica de la presente invención variará, dependiendo de la gravedad de la enfermedad que vaya a tratarse y de la afección y de la posible respuesta idiosincrásica de cada paciente individual. Se contempla que la duración de cada aplicación de antagonista será mediante, por ejemplo, vía subcutánea y por ejemplo, en el intervalo de una vez a la semana. Finalmente el médico tratante decidirá la duración apropiada de la terapia utilizando la composición farmacéutica de la presente invención.

30 Las composiciones orales generalmente incluyen un diluyente inerte o un transportador comestible. Éstas pueden incluirse en cápsulas de gelatina o comprimirse en comprimidos. Para los fines de administración oral terapéutica, el antagonista (por ejemplo, anticuerpo o proteína de unión a antígeno, molécula pequeña, etc.) de la invención puede incorporarse con excipientes y usarse en forma de comprimidos o cápsulas. Pueden incluirse agentes de unión farmacéuticamente compatibles y/o materiales adyuvantes como parte de la composición. Los comprimidos, píldoras, cápsulas pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes o compuestos de una naturaleza similar; un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina, un excipiente tal como
35 almidón o lactosa; un agente disgregante tal como ácido algínico; Primogel™ o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o Sterates™; un emoliente tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; un agente aromatizante tal como menta, metil salicilato o aroma de naranja.

40 Cuando una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica de la invención, por ejemplo, un antagonista específico para GDF8, se administra por vía oral, el agente de unión estará en forma de comprimido, cápsula, polvo, solución o elixir. Cuando se administra en forma de comprimido, la composición farmacéutica de la invención puede contener adicionalmente un transportador sólido tal como gelatina o un adyuvante. El comprimido, cápsula y polvo contiene de aproximadamente del 5 al 95 % de agente de unión, y preferentemente aproximadamente del 25 al 90 % de agente de unión. Cuando se administra en forma líquida, puede añadirse un
45 transportador líquido tal como agua, petróleo, aceites de origen animal o vegetal tales como aceite de cacahuete, aceite mineral, aceite de soja, o aceite de sésamo, o aceites sintéticos (después de tener en cuenta las alergias del paciente individual y/o una gran población de individuos contra dichos transportadores líquidos). La forma líquida de la composición farmacéutica puede contener adicionalmente solución salina fisiológica, dextrosa u otra solución de sacáridos, o glicoles tales como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol. Cuando se administra en forma líquida, la
50 composición farmacéutica contiene de aproximadamente del 0,5 al 90 % en peso del agente de unión y preferentemente aproximadamente del 1 al 50 % del agente de unión.

55 Para la administración por inhalación, un antagonista de la invención se administra en forma de una pulverización en aerosol de un envase o dispensador presurizado, que contiene un propulsor adecuado, por ejemplo, un gas tal como dióxido de carbono o un nebulizador. Por consiguiente, los compuestos descritos en el presente documento pueden administrarse por inhalación al tejido pulmonar. La expresión "tejido pulmonar" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier tejido del tracto respiratorio e incluye tanto el tracto respiratorio superior como inferior a menos que se indique lo contrario. Un antagonista específico de GDF8 puede administrarse en combinación con una o más de las modalidades existentes para el tratamiento de enfermedades pulmonares.

60 En ejemplo de administración, el compuesto se formula para un nebulizador. En una realización, el compuesto puede conservarse en una forma liofilizada (por ejemplo, a temperatura ambiente) y reconstituirse en solución antes

de la inhalación.

También es posible formular el compuesto para inhalación usando un dispositivo médico, por ejemplo, un inhalador (véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 6.102.035 (un inhalador en polvo) y 6.012.454 (un inhalador en polvo seco)). El inhalador puede incluir compartimentos individuales para el compuesto activo a un pH adecuado para la conservación y otro comportamiento para el tampón neutralizante, y un mecanismo para combinar el compuesto con un tampón neutralizante inmediatamente antes de la atomización. En una realización, el inhalador es un inhalador de dosis medida.

Aunque no necesariamente, pueden utilizarse potenciadores de administración tales como tensioactivos para potenciar adicionalmente la administración pulmonar. Un "tensioactivo" como se usa en el presente documento se refiere a un compuesto que tiene restos hidrófilos y lipófilos que promueven la absorción de un fármaco interaccionando con un interfase entre dos fases no miscibles. Los tensioactivos son útiles con partículas secas por diversas razones, por ejemplo, reducción de la aglomeración de partículas, reducción de fagocitosis de macrófagos, etc. Cuando se acopla con un tensioactivo pulmonar, puede conseguirse una absorción más eficaz del compuesto ya que los tensioactivos, tales como DPPC, facilitarán enormemente la difusión del compuesto. Los tensioactivos se conocen bien en la técnica e incluyen, sin limitación, fosfoglicéridos, por ejemplo, fosfatidilcolinas, L-alfa-fosfatidilcolina dipalmitoil (DPPC) y difosfatidil glicerol (DPPG); hexadecanol; ácidos grasos; polietilenglicol (PEG); polioxietileno-9; aрил éter; ácido palmítico; ácido oleico; trioleato de sorbitán (Span 85); glicocolato; surfactina; poloxómero; ésteres de ácidos grasos de sorbitán; trioleato de sorbitán; tiloxapol; y fosfolípidos.

La administración sistémica también puede ser mediante administración transmucosa y transdérmica. Por ejemplo, en el caso de anticuerpos que comprenden la parte Fc, las composiciones pueden ser capaces de realizar la transmisión a través de las membranas mucosas (por ejemplo, intestino, boca o pulmones) mediante la ruta mediada por el receptor Fc-Rn (por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 6.030.613). En general, la administración transmucosa puede realizarse, por ejemplo, utilizando pastillas para chupar, pulverizadores nasales, inhaladores o supositorios. Para administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en pomadas, bálsamos, geles, parches o cremas como se conoce generalmente en la técnica. Para la administración transmucosa o transdérmica, se usan en penetrantes apropiados a la barrera a filtrar en la formulación. Dichos penetrantes se conocen generalmente en la técnica incluyen, por ejemplo, detergentes, sales biliares y derivados de ácidos fusídicos.

Las composiciones farmacéuticas también pueden consistir en composiciones adecuadas para terapia génica, es decir, composiciones que comprenden los polinucleótidos desvelados en el presente documento. En el caso de terapia génica, el transportador farmacéuticamente aceptable puede incluir, por ejemplo, lípidos, esferas de colágeno, sistemas de emulsión catiónicos, agua, tampones salinos, vectores virales, restos de quilomicrones, nanopartículas poliméricas (por ejemplo, gelatina-ADN o quitosano-ADN), partículas de oro, complejos poliméricos, lipoplejos, poliplexos, etc. (véase, por ejemplo, Gardlik y col. (2005) Med. Sci. Monit. 11(4): RA110-21).

Estabilización y Retención

En una realización, un antagonista específico de GDF8 está físicamente asociado con un resto que mejora su estabilización y/o retención en circulación, por ejemplo, en sangre, suero, linfa, lavado broncopulmonar o broncoalveolar, u otros tejidos, por ejemplo, al menos 1,5, 2, 5, 10, o 50 veces.

Los antagonistas de la invención desvelados en el presente documento pueden prepararse con transportadores que protegerán frente a la eliminación rápida del organismo, tal como formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de administración microencapsulados. Pueden usarse polímeros biodegradables biocompatibles, tales como etilvinilacetato, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Los procedimientos para la preparación de dichas formulaciones serán evidentes para los expertos en la técnica. Las suspensiones liposomales que contienen los antagonistas descritos en la presente invención también puede usarse como transportadores farmacéuticamente aceptables. Estos pueden prepararse de acuerdo con procedimientos conocidos por expertos en la materia.

Por ejemplo, un antagonista específico de GDF8 puede asociarse con un polímero, por ejemplo, un polímero sustancialmente no antigénico, tal como óxidos de polialquileno u óxidos de polietileno. Los polímeros adecuados variarán sustancialmente en peso. Pueden usarse polímeros que tienen un peso molecular promedio que varía aproximadamente de 200 a aproximadamente 35.000 (o de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 15.000, o de aproximadamente 2.000 a aproximadamente 12.500).

Por ejemplo, un antagonista específico de GDF8 puede conjugarse con un polímero hidrosoluble, por ejemplo, polímeros de polivinilo hidrófilos, por ejemplo, alcohol polivinílico y polivinilpirrolidona. Una lista no limitante de dichos polímeros incluye polímeros de óxido de polialquileno tales como polietilenglicol (PEG) o polipropilenglicoles, polioles polioxietilenados, copolímeros de los mismos y copolímeros de bloque de los mismos, siempre que la solubilidad en agua de los copolímeros de bloque se mantenga. Los polímeros útiles adicionales incluyen polioxialquilenos tales como polioxietileno, polioxipropileno y copolímeros de bloque de polioxietileno y polioxipropileno (Pluronic); polimetacrilatos; carbómeros; polisacáridos ramificados o no ramificados, que comprenden los monómeros de sacárido D-manosa, D y L-galactosa, fucosa, fructosa, D-xilosa, L-arabinosa, ácido

D-glucurónico, ácido siálico, ácido D-galacturónico, ácido D-manurónico (por ejemplo, ácido polimanurónico o ácido algínico), D-glucosamina, D-galactosamina, D-glucosa y ácido neuramínico incluyendo homopolisacáridos y heteropolisacáridos tales como lactosa, amilopectina, almidón, almidón hidroxietílico, amilosa, sulfato de dextrano, dextrano, dextrinas, glucógeno o la subunidad polisacárida de ácidos mucopolisacáridos, por ejemplo, ácido hialurónico; polímeros de alcoholes de azúcar tales como polisorbitol y polimanitol; heparina; etc.

Otros compuestos también pueden unirse al mismo polímero, por ejemplo, una citotoxina, un marcador, u otro agente de direccionamiento, por ejemplo otro antagonista de GDF8 o un ligando no relacionado. Para la reticulación pueden utilizarse óxidos de polialquileno monoactivados terminados en alcoxi (PAO), por ejemplo, polietilenglicoles terminados en monometoxi (mPEG), polímeros terminados el alquilo C1-4 y óxidos de polietileno (glicoles) bisactivados (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos No. 5.951.974).

En una realización, el polímero de antes de la reticulación con el ligando no necesita ser, pero es preferentemente, hidrosoluble. Generalmente, después de la reticulación, el producto es hidrosoluble, por ejemplo, muestra una solubilidad en agua de al menos aproximadamente 0,01 mg/ml, y más preferentemente de al menos 0,1 mg/ml, y aún más preferentemente de al menos aproximadamente 1 mg/ml. Además, el polímero no debe ser muy inmunogénico en la forma del conjugado, ni tampoco debe poseer viscosidad que sea incompatible con infusión intravenosa, aerosolización o inyección, si el conjugado se pretende administrar por dichas vías.

En una realización, el polímero contiene solamente un grupo sencillo que es reactivo. Esto ayuda a impedir la reticulación de moléculas de ligando entre sí. Sin embargo, está dentro del ámbito del presente documento maximizar las condiciones de reacción para reducir la reticulación entre moléculas de ligando o purificar los productos de reacción a través de filtración en gel o cromatografía de intercambio iónico para recuperar derivados sustancialmente homogéneos. En otras realizaciones, el polímero contiene dos o más grupos reactivos con el fin de unir múltiples ligandos a la estructura del polímero. De nuevo, pueden utilizarse filtración en gel o cromatografía de intercambio iónico para recuperar el derivado deseado en forma sustancialmente homogénea.

El peso molecular del polímero puede variar hasta aproximadamente 500.000 D, y preferentemente es de al menos aproximadamente 20.000 D, o de al menos aproximadamente 30.000 D, o de al menos aproximadamente 40.000 D. El peso molecular seleccionado puede depender del tamaño eficaz de conjugado a conseguir, la naturaleza (por ejemplo, estructura, tal como lineal o ramificada) del polímero y el grado de derivatización.

Puede usarse un enlace covalente para unir un antagonista específico de GDF8 con un polímero, por ejemplo, reticulación a un grupo amino N-terminal del ligando y grupos épsilon amino encontrados en los restos de lisina del ligando así como otros grupos amino, imino, carboxilo, sulfhidrilo, hidroxilo u otros grupos hidrófilos. El polímero puede unirse covalentemente directamente al antagonista GDF8 sin el uso de un agente reticulante multifuncional (comúnmente bifuncional). La unión covalente a grupos amino se realiza por reacciones químicas conocidas basadas en cloruro cianúrico, diimidazol carbonilo y grupos reactivos aldehído (alcóxido PEG mas acetyl dietílico de bromoacetaldehído, PEG más DMSO y anhídrido acético, o cloruro de PEG mas el fenóxido de 4-hidroxibenzaldehído, ésteres de succinimidil activados, ditiocarbonato de PEG activado, 2,4,5-triclorofenilcloroformato o P-nitrofenilcloroformato activado con PEG). Los grupos carboxilo pueden derivatizarse por acoplamiento de PEG-amina usando cabodiimida. Los grupos sulfhidrilo pueden derivatizarse acoplando el PEG sustituido por maleimido (por ejemplo, alcoxi-PEG amina más 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato) de sulfosuccinimidilo (véase el documento WO 97/10847) o PEG-maleimida). Como alternativa, los grupos amino libres del ligando (por ejemplo, grupos amino épsilon en restos de lisina) pueden tiolarse con 2-imino-tiolano (reactivo de Traut) y después acoplarse con derivados que contengan maleimida de PEG, por ejemplo, como se describe en Pedley y col. (1994) Br. J. Cancer 70: 1126-30.

Están disponibles polímeros de PEG funcionalizados que pueden unirse a un antagonista de GDF8, por ejemplo, de Shearwater Polymers, Inc. (Huntsville, AL). Dichos derivados de PEG comercialmente disponibles incluyen, por ejemplo, amino-PEG, ésteres de aminoácido PEG, PEG-hidracida, PEG-tiol, PEG-succinato, PEG carboximetilado, PEG-ácido propiónico, aminoácidos de PEG, succinimidil succinato PEG, succinimidil propionato PEG, succinimidiléster de PEG carboximetilado, succinimidilcarbonato de PEG, ésteres de succinimidilo de aminoácidos de PEG, PEG-oxicarbonilimidazol, PEG-nitrofenil carbonato, PEG tresilato, éter glicídico-PEG, PEG-aldehído, vinilsulfona de PEG, maleimida de PEG, PEG-ortopiridil disulfuro, PEG heterofuncionales, derivados de PEG vinil, silanos de PEG, y fosfóidos de PEG. Las condiciones de reacción para el acoplamiento de estos derivados de PEG pueden variar dependiendo del antagonista específico de GDF8, de grado deseado de PEGilación, y del derivado PEG utilizado. Algunos factores implicados en la elección de derivados de PEG incluyen: el punto de unión deseado (tal como grupos R de lisina, cisteína), estabilidad hidrolítica y reactividad de los derivados, estabilidad, toxicidad y antigenicidad de la unión, idoneidad para análisis, etc. Instrucciones específicas para el uso de cualquier derivado particular se encuentran disponibles a través del fabricante.

Los conjugados de antagonistas de GDF8 y un polímero pueden separarse de los materiales de partida que no han reaccionado, por ejemplo, por filtración en gel o cromatografía de intercambio iónico u otras formas de cromatografía, por ejemplo, HPLC. Especies heterólogas de los conjugados se purifican entre sí de la misma manera. La resolución de diferentes especies (por ejemplo, que contienen uno o dos restos de PEG) también es posible debido a la diferencia en las propiedades iónicas de los aminoácidos que no han reaccionado (véase, por

ejemplo, el documento WO 96/34015).

Los polinucleótidos y proteínas de la presente divulgación se espera que presenten uno o más de los usos o actividades biológicas (incluyendo los asociados con ensayos citados a continuación) identificados en el presente documento. Los usos o actividades descritos para las proteínas de la presente divulgación pueden proporcionarse mediante la administración o uso de dichas proteínas, o mediante la administración o uso de los polinucleótidos que codifican dichas proteínas (tales como, por ejemplo, en terapias génicas o vectores adecuados para la introducción de ADN).

Puede ser ventajoso formular composiciones orales o parenterales en forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y uniformidad de la dosificación. La forma de dosificación unitaria como se usa en el presente documento se refiere a unidades físicamente separadas adecuadas como dosificaciones unitarias para el sujeto a tratar, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el transportador farmacéutico requerido. La especificación de las formas de dosificación unitarias de la divulgación se dictaminan por y directamente dependen de las características únicas del compuesto activo, del efecto terapéutico particular a conseguir, y de las limitaciones inherentes en la técnica de formulación de dicho compuesto activo para el tratamiento de individuos.

Otro aspecto de la presente divulgación se refiere por consiguiente a kits para realizar la administración de los antagonistas de GDF8 de la invención, por ejemplo, con o sin otros compuestos terapéuticos o para el uso de los antagonistas de GDF8 como una herramienta de investigación o terapéutica para determinar la presencia y/o nivel de GDF8 en una muestra biológica, tal como un kit de ELISA. En una realización, el kit comprende uno o más antagonistas anti-GDF8 formulados en un transportador farmacéutico, y al menos un agente, como por ejemplo, un agente terapéutico, formulado según sea apropiado, en una o más preparaciones farmacéuticas individuales.

Los ejemplos a continuación se exponen para ayudar a comprender la invención pero no pretenden ni deben limitar el ámbito de la invención en modo alguno. Los ejemplos no incluyen descripciones de procedimientos convencionales tales como formación de hibridomas, ELISA, ensayos de proliferación, análisis de citometría de flujo y técnicas de ADN recombinante. Dichos procedimientos son conocidos por los expertos habituales en la técnica.

La presente invención se ilustra adicionalmente y se respalda por los siguientes ejemplos. Sin embargo, no debe considerarse que estos ejemplos limiten adicionalmente el ámbito de la invención. Al contrario, un experto habitual en la técnica entenderá fácilmente que hay otras realizaciones modificaciones y equivalentes de la presente invención sin salirse de la esencia de la presente invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: Creación de células de hibridoma y aislamiento de anticuerpos RK22 anti-GDF8

Se inmunizaron ratones con inactivación genética de GDF8 (miostatina) (McPherron y col. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94: 12457-61) por inyección subcutánea con adyuvante completo de Freund y 20 µg de dímero de GDF8 recombinante que se purificó de medio acondicionado con células CHO como se describe en Lee y McPherron (1999) Curr. Opin. Genet. Dev. 9: 604-07. Se proporcionaron a intervalos de 2 semanas diversas inyecciones de refuerzo de la misma cantidad de GDF8 y adyuvante incompleto de Freund. Se administró una inyección intravenosa final en la vena de la cola de 2 µg de PBS antes del aislamiento de los esplenocitos de los ratones demostrando las altas titulaciones de anticuerpos anti-GDF8. Los esplenocitos aislados se fusionaron con células de mieloma de ratón (Número de Referencia de ATCC P3X63.Ag8.653). Después de 10-14 días los sobrenadantes de los hibridomas se recogieron y se ensayaron por ELISA para detectar los niveles de anticuerpos anti-GDF8, véase el Ejemplo 2. Para asegurar la monoclonalidad, los hibridomas se seleccionaron para estudios posteriores clonados por dilución limitante repetida.

Los sobrenadantes de hibridomas que expresaban anti-GDF8 y/o anticuerpos purificados de los sobrenadantes usando procedimientos de cromatografía de afinidad convencionales bien conocidos en la técnica se ensayaron para la especificidad en ensayos descritos en el Ejemplo 2. De trece clones inicialmente ensayados para la unión a GDF8, RK22 estaba entre los seleccionados para análisis posterior.

Ejemplo 2: El anticuerpo RK22 interacciona específicamente con GDF8

Ejemplo 2.1: RK22 tiene una mayor afinidad por GDF8 que por BMP11 en ensayos ELISA

Se utilizaron técnicas ELISA convencionales usando GDF8 o BMP11 para determinar la especificidad de RK22 en la unión con GDF8, es decir, para determinar si los anticuerpos demostraban una mayor afinidad por GDF8 que por BMP11. Se purificaron GDF8 humano recombinante (GDF8 maduro y propéptido de GDF8) y la proteína BMP11 y se caracterizaron como previamente se divulga en la Solicitud Publicada de Patente de Estados Unidos N° 2004/0142382. El complejo latente de GDF8 y el complejo latente de BMP11 se marcaron cada uno con biotina individualmente a una proporción de 20 moles de EZ-link Sulfo-NHS-Biotina (Pierce, Rockford, IL, N° Cat. 21217) con respecto a 1 mol de complejo durante 2 horas en hielo. La reacción se finalizó disminuyendo el pH utilizando TFA al 0,5 %, y el complejo biotinilado se sometió a cromatografía en una columna C4 Júpiter de 250 x 4,6 mm

(Phenomenex, Torrance, CA) para separar la proteína madura (por ejemplo, GDF8 maduro del propéptido de GDF8 o BMP11 maduro del propéptido de BMP11). Las fracciones de GDF8 biotinilado maduro o BMP11 biotinilado maduro eluidas con un gradiente de TFA/CH₃CN se agruparon, concentraron y cuantificaron mediante un kit de reactivo de ensayo de proteína MicroBCATM (Pierce, Rockford, IL, N° Cat. 23235).

- 5 Una placa de microtitulación de 96 pocillos (previamente revestida durante una noche a 4 °C con 5 µg/ml de estreptavidina en PBS) se revistió con 0,5 µg/ml de GDF8 biotinilado o BMP11 biotinilada durante 1 h a temperatura ambiente. El exceso de GDF8 o BMP11 se eliminó lavando con PBS que contenía Tween 20 al 0,1 % (v/v) (tampón PBST). Las placas se bloquearon durante 1 h a temperatura ambiente en solución SuperBlock™ (Pierce) y después se aclararon con PBS. Las placas revestidas con GDF8 o BMP11 se incubaron a temperatura ambiente durante 1 h
- 10 con 100 µl de sobrenadante prebloqueado recogido de hibridomas de RK22 o con anticuerpo RK22 purificado a diversas concentraciones. Para controlar la unión no específica, el anticuerpo RK35 que se había observado que se unía e inhibía tanto a GDF8 como a BMP11 se utilizó junto con un anticuerpo irrelevante (Ac Irr.) que se demostró que no se unía ni a GDF8 ni a BMP11 y también se ensayaron medios de control individualmente. El anticuerpo no unido se retiró mediante 3 lavados de PBST seguido de 3 lavados con PBS. Cincuenta µl de una dilución 1: 5000 de conjugado de IgG de cabra anti-ratón con HRP se añadió a cada pocillo. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 h. Cada placa se lavó tres veces con PBST, y posteriormente, 3 veces con PBS y se revelaron para detectar una reacción de color por la adición del reactivo TMB (tetrametilbenzidina). La reacción colorimétrica se detuvo por la adición de 100 µl de H₂SO₄ 0,18 M. La señal generada se midió leyendo la densidad óptica a 450 nm de cada pocillo usando un lector de placa de microtitulación.
- 15
- 20 Como se muestra en las Figuras 1A y 1B, los sobrenadantes de los hibridomas de RK22 tuvieron una mayor afinidad por GDF8 que por BMP11 en comparación con el sobrenadante aislado del anticuerpo control, RK35. La uniformidad de la mayor afinidad para GDF8 por RK22 se confirmó demostrando que la mayor afinidad por GDF8 de estos anticuerpos no era dependiente de la dosis. Como puede observarse en la Figura 1A y B, a cada concentración ensayada los anticuerpos RK22 demostraron mayor unión a GDF8 que a BMP11. RK22 mostró escasa unión a
- 25 BMP11 mientras que por otro lado, el anticuerpo de control RK35 se unió tanto a GDF8 como a BMP11.

Ejemplo 2.2: Afinidades de unión de RK22 por GDF8

- Las interacciones cinéticas moleculares del anticuerpo RK22 con GDF-8 se analizaron cuantitativamente usando tecnología de resonancia de plasmón BIAcore, y se derivaron las constantes de velocidad cinética aparentes. En estos estudios se midió la unión del anticuerpo soluble a GDF-8 unido a la fase sólida. La orientación de la superficie del GDF-8 inmovilizado sobre la superficie del biosensor se controló usando GDF-8 biotinilado (bio-GDF-8), el bio-GDF-8 se inmovilizó sobre chips de biosensor de estreptavidina y después, diversas concentraciones de anticuerpo se aplicaron por triplicado y la unión se midió en función del tiempo. A partir de estas mediciones se derivaron las constantes de velocidad de disociación aparente (K_d) y de velocidad de asociación (K_a) y se usaron para calcular una constante de afinidad de unión (K_d) para la interacción. La concentración activa de RK22, definida como la
- 30 fracción de anticuerpo que es biológicamente funcional, se determinó midiendo la fracción de anticuerpo capaz de unirse al bio GDF-8 inmovilizado en el chip usando el BIAcore con limitaciones parciales de transporte de masa revistiendo una elevada densidad superficial e inyectando el anticuerpo a diferentes caudales. La tasa de asociación y disociación para cada concentración de anticuerpo se calcularon simultáneamente usando ajuste global con el programa informático BIAevaluation versión 3.0.2.
- 35

- 40 El sistema BIAcore 2000, Sensor Chip SA (BR-1000-32), tampón HBS/EP (HEPES 0,01 M pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3,0 mM y polisorbato 20 al 0,005 % (v/v), *N*-hidroxisuccinimida (NHS-EP)) se obtuvieron en BIAcore AB, Uppsala, Suecia. El bio-GDF8 humano (Lote 25251-15) se purificó. Se preparó TFA al 0,1 % (v/v) (Sigma) en agua. Los datos experimentales de las determinaciones cinéticas de la interacción anticuerpo-antígeno se realizaron usando el programa informático BIAevaluation versión 3.0.2.

- 45 Para preparar la superficie bio-GDF8, se mantuvo un flujo continuo de tampón HBS/EP sobre la superficie del sensor. La estreptavidina sobre la superficie del sensor se acondicionó con 3 inyecciones (de 1 minuto cada una) de una solución que contenía NaCl 1 M y NaOH 25 mM. Para un recubrimiento a alta densidad (>2000 UR) el bio-GDF8 se diluyó a 1 µg/ml en tampón HBS/EP y se inmovilizó sobre el chip de estreptavidina fluyéndolo sobre el mismo. Para el recubrimiento a baja densidad (20-60 UR) GDF8 se diluyó adicionalmente a 0,1 µg/ml y el volumen de bio-GDF8 inyectado varió de acuerdo con la densidad necesaria. La superficie de estreptavidina sobre la celda de flujo se utilizó como superficie de referencia. Como control se utilizó la primera celda de flujo como superficie de
- 50 referencia para corregir el índice refractivo de masa, los efectos de matriz y la unión no específica, la segunda, tercera y cuarta células de flujo se recubrieron con la molécula de captura.

- 55 La fracción del anticuerpo RK22 capaz de unirse a bio GDF-8 inmovilizado sobre el chip se analizó usando el BIAcore con limitaciones parciales de transporte de masa. En este experimento, el anticuerpo anti-GDF-8 a 200 nM y 100 nM (concentraciones medidas basadas en la DO 280) se inyectaron a caudales de 2, 10, 30, 50 y 100 µl/min. Las limitaciones de transporte de masa pueden detectarse por inspección visual de los gramos del sensor, dado que las pendientes aumentaron con caudales en aumento. Las superficies del biosensor se regeneraron usando 5 µl de TFA al 0,1 %.

Se diluyeron ambos anticuerpos RK22 anti-GDF-8 en tampón HBS-EP (Biacore AB), se inyectaron alícuotas sobre el bio-GDF8 inmovilizado a un caudal de 30 ul/min, después de la inyección durante tres minutos, la disociación se monitorizó en tampón BIAcore durante diez minutos al mismo caudal. Las concentraciones de anticuerpo inyectadas fueron 300, 150, 75, 37,5, 18,7, 9,3, 4,6, 2,3 y 0 nM; cada inyección se realizó por triplicado. Los efectos del blanco y tampón se restaron de cada sensograma utilizando una doble referencia. Las superficies del biosensor se regeneraron utilizando 5 ul de TFA al 0,1 %, antes de la inyección de la siguiente muestra HBS-EP fluyó a través de cada celda. La respuesta se midió en unidades de resonancia (UR) que representan la masa de unión de RK22.

Los datos cinéticos se analizaron usando el programa informático BIAevaluation 3.0.2 suponiendo tanto un analito bivalente (A) uniéndose a ligando monovalente (B). $A+B = AB \ K_a1 \cdot K_d1$; $AB+B = AB2 \ K_a2 \cdot K_d2$; y un analito monovalente (A) uniéndose a ligando monovalente (B) $A+B = AB \ K_a1 \cdot K_d1$. Las constantes de velocidad de disociación (k_d) y de asociación (k_a) aparentes se calcularon a partir de las regiones apropiadas de los sensogramas. La constante de afinidad de unión de la interacción entre el anticuerpo y GDF8 se calcularon a partir de las constantes de velocidad cinética mediante la siguiente fórmula: $K_d = k_d / k_a$. Como puede observarse en la Figura 2, RK22 demostró un valor K_d de 7 nM en la media de tres experimentos.

15 **Ejemplo 3: RK22 inhibe la señalización de GDF8 *in vitro* e *in vivo***

Ejemplo 3.1: Inhibición de la actividad biológica del GDF-8 humano recombinante purificado en el ensayo de gen indicador basado en células usando RK22

Para demostrar la actividad de GDF-8 en el ensayo *in vitro* basado en células, se desarrolló un ensayo con gen indicador (RGA) usando un vector indicador pGL3 (CAGA)12 que expresa luciferasa bajo el control del promotor inducido por TGF- β . Se describió previamente que la secuencia CAGA era una secuencia sensible a TGF- β dentro del promotor del gen inducido por TGF- β PAI-1 (Thies S y col 2001). Se preparó un vector indicador que contenía 12 cajas CAGA utilizando el plásmido indicador de luciferasa básico pGL3 (Promega, Madison, WI). La caja TATA y el sitio de inicio de la transcripción del promotor mayor principal de adenovirus (-35/+10) se insertó entre los sitios BgIII y HindIII. Los oligonucleótidos que contenían 12 repeticiones de las cajas CAGA AGCCAGACA se hibridaron y se clonaron en el sitio XhoI. La línea celular de rhabdomyosarcoma humano A204 (ATCC HTB-82) se transfectó de manera transitoria con pGL3 (CAGA)12 usando el reactivo de transfección FuGENE 6 (Boehringer Mannheim, Alemania). Después de la transfección, las células se cultivaron en placas de 96 pocillos en medio McCoy 5A complementado con glutamina 2 mM, estreptomycin 100 U/ml, penicilina 100 μ g/ml y suero de ternero fetal al 10 % durante 16 h. Después, las células se trataron con o sin GDF-8 10 ng/ml en medio McCoy 5A con glutamina, estreptomycin, penicilina y albúmina de suero bovino 1 mg/ml durante 6 h a 37 °C. La luciferasa se cuantificó en las células tratadas utilizando el Sistema de Ensayo Luciferasa (Promega). El ensayo se repitió usando BMP-11 10 ng/ml.

Para ensayar la actividad inhibidora de RK22, se preincubó GDF-8 con anticuerpo RK22 durante 1 h a temperatura ambiente. Esta mezcla se añadió después a las células transfectadas y se incubaron durante 6 h a 37 °C. La luciferasa se cuantificó usando el Sistema de Ensayo Luciferasa (Promega). La capacidad de RK22 para bloquear la actividad de BMP-11 se midió utilizando el mismo protocolo.

Como se observa en la Figura 3, la inducción de la actividad del indicador pGL3(CAGA)12 como LCPS cuando las células no se trataron (bkgd) o tratadas con 10 ng/ml de GDF8 en ausencia de RK22. Cada uno de estos anticuerpos redujo al menos una actividad de GDF8, es decir, la inducción de luciferasa mediada por GDF8, de una manera sensible a la dosis, con un valor CI50 de 0,4 nM para RK22. El anticuerpo control RK35 tuvo una CI50 de 0,2 nm, y un anticuerpo irrelevante tuvo una CI50 de >100 nM. Aunque RK22 inhibió la señalización mediada por GDF8, estos anticuerpos no inhibieron significativamente la actividad biológica de BMP11; la CI50 para inhibición de la actividad de BMP11 por RK22 no fue detectable, 30 nM y >100 nM, respectivamente. Estos datos demuestran que RK22 inhibe específicamente la señalización de GDF8 *in vitro* con un grado similar a como lo hace el anticuerpo RK35 no específico.

Ejemplo 3.2: RK22 inhibe la actividad de GDF8 in vivo

Para determinar si los anticuerpos RK22 antagonizan la actividad de GDF8 *in vivo*, se seleccionó RK22 como anticuerpo representativo para ensayar adicionalmente en ratones SCID adultos. Los ratones SCID padecen una inmunodeficiencia combinada severa y por lo tanto no generan una reacción inmunológica después de inyecciones de anticuerpos tales como RK22. Se inyectó RK22 a ratones SCID durante un período de cuatro semanas. Se administraron tres dosificaciones de RK22: 1 mg/kg/semana, 10 mg/kg/semana y 40 mg/kg/semana. Myo-29 administrado a una dosis de 10 mg/kg/semana se usó como un control positivo y se comparó con las diferentes concentraciones de RK22 administradas.

La masa muscular se usó como un indicador para la actividad de GDF8 en ratones tratados con RK22. Se extirparon tres grupos de músculos diferentes, gastrocnémico, tibial anterior y cuádriceps, y se determinó el peso muscular. Como se muestra en la Figura 4, RK22 aumentó significativamente la masa muscular a una dosis de 10 mg/kg/semana. En comparación con el control positivo, Myo29 aumentó la masa muscular aproximadamente un 10 % tanto a la dosis de 10 mg/kg/semana para RK22 como Myo29.

Ejemplo 4: Caracterización de sitios de unión RK22

Ejemplo 4.1: Valoración de la inhibición de RK22 de la unión de GDF8 a ActRIIB

Para determinar si los anticuerpos RK22 son capaces de antagonizar la actividad de GDF8 impidiendo la unión la unión de GDF8 con su receptor ActRIIB, se ensayaron los anticuerpos en un ensayo de unión a ActRIIB (por ejemplo, un ensayo de neutralización). La capacidad de los anticuerpos RK22 purificados se exploró para inhibir la unión de GDF8 biotinilado con la proteína de fusión ActRIIB inmovilizada en una placa de ensayo de microtitulación de 96 pocillos de plástico. La quimera recombinante ActRIIB-Fc (R&D Systems, Minneapolis, MN, Cat. N° 339-RB/CF) se revistió sobre placas de ensayo de fondo plano de 96 pocillos (Costar, NY, N° Cat. 3590) a 1 µg/ml en tampón del carbonato sódico 0,2 M durante una noche a 4 °C. Después, las placas se bloquearon con 1 mg/ml de albúmina de suero bovino y se lavó siguiendo un protocolo ELISA convencional. Veinte ng/ml de GDF8 biotinilado en solitario o preincubado durante una hora a temperatura ambiente con diversas concentraciones de RK22 se añadieron a la placa ELISA bloqueada. Para establecer la fuerza de los clones medida por valores CI₅₀, se añadió una titulación de anticuerpos. Se incluyeron GDF8 biotinilado preincubado con anticuerpo irrelevante o un anticuerpo control que bloquea la unión de GDF8 a ActRIIB como controles. Una hora después a temperatura ambiente, los complejos anticuerpo-proteína bloqueada se lavaron de nuevo y la cantidad de GDF8 unido a ActRIIB unido a la placa se detectó con estreptavidina marcada con europio utilizando el kit de reactivo DELFIATM (PerkinElmer LifeSciences, Boston, MA) en un ensayo fluorométrico resuelto en tiempo (FRT).

En la Figura 5 se muestran los resultados del ensayo de neutralización de ActRIIB. Por lo tanto, aunque es posible que los anticuerpos RK22 inhiban la señalización de GDF8 inhibiendo la capacidad de GDF8 de unirse a ActRIIB, es más probable que esté implicado otro mecanismo.

Ejemplo 4.2: RK22 se une a epítomos específicos de GDF8.

Aunque GDF8 y BMP11 están estrechamente relacionados, RK22 es específico para GDF8. Por consiguiente, se llega a la hipótesis de que los epítomos reconocidos por estos anticuerpos son también específicos contra GDF8 y por tanto, los epítomos específicos contra GDF8 pueden usarse como antagonistas (por ejemplo, como péptidomiméticos) para inhibir específicamente la señalización de GDF8 y/o explorar o preparar antagonistas específicos de GDF8.

Para determinar los epítomos de GDF8 reconocidos por anticuerpos RK22, 48 péptidos solapantes de 13 restos que presentan toda la secuencia de GDF8 maduro expuesta como SEC ID N°: 1 se sintetizaron directamente en un papel de celulosa utilizando la técnica de síntesis *in situ* (Molina y col. (1996) Peptide Res. 9: 151-55; Frank y col. (1992) Tetrahedron 48: 9217-32). El solapamiento de los péptidos fue de 11 aminoácidos. En esta matriz, los restos de cisteína se reemplazaron con serina para reducir las complicaciones químicas que están producidas por la presencia de cisteínas. Las membranas de celulosa modificadas con polietilenglicol y aminoácidos protegidos con Fmoc se adquirieron en Abimed (Lagenfeld, Alemania). La matriz se definió sobre la membrana por acoplamiento de un espaciador β-alanina, y los péptidos se sintetizaron utilizando química de acoplamiento DIC (diisopropilcarbodiimida)/HOBT (hidroxibenzotriazol) convencional como se ha descrito anteriormente (Molina y col., citado anteriormente; Frank y col.; citado anteriormente).

Los aminoácidos activados se motearon usando un robot Abimed ASP 222. Las etapas de lavado y desprotección se realizaron manualmente y los péptidos se acetilaron en N-terminalmente después del ciclo de síntesis final. Después de la síntesis peptídica, la membrana se lavó en metanol durante 10 min y en bloqueante (TBST (solución salina tamponada con Tris con Tween TM 20 al 0,1 % (v/v) y caseína al 1% (p/v)) durante 10 min. Después, la membrana se incubó con 2,5 µg/ml de anticuerpo RK22 anti-GDF8 en bloqueador durante una hora con agitación suave. Después de lavado con bloqueador 3 veces durante 10 min, la membrana se incubó con anticuerpo secundario marcado con HRP (0,25 µg/ml en bloqueador) durante 30 min. Después, la membrana se lavó tres veces durante 10 min cada una con bloqueador y 2 veces durante 10 min cada una con TBST. El anticuerpo unido se visualizó usando el reactivo SUPERSIGNALTM West (Pierce) y una cámara digital (Alphananotech Fluoromager). Las transferencias puntuales se muestran en la Figura 6 y los resultados se resumen en la Tabla 4. Las transferencias puntuales demuestran que RK22 se une a un epítomo (o epítomos) de GDF8 que tiene y/o consisten esencialmente en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: DFGLDS (SEC ID N°: 4), FEAFGWDWIIAPKRY (SEC ID N°: 6), FVFLQKYPHTLVHQ (SEC ID N°: 8), SSGESEFVF (SEC ID N°: 10), WIIAPKRYKANYSSGESEFVFLQKY (SEC ID N°: 11), y posiblemente subsecuencias de las mismas. En particular, el epítomo (o epítomos) para RK22 mapean en una región de GDF8 que supuestamente interacciona con el receptor de Tipo I de GDF8 (ALK4/ALK5).

TABLA 4

Regiones aproximadas de GDF8 humano unido por anticuerpos monoclonales de ratón	
	RK22
Área epitópica	Regiones de reconocimiento del receptor de Tipo I y N-terminal

(continuación)

Regiones aproximadas de GDF8 humano unido por anticuerpos monoclonales de ratón	
	RK22
Interacción con los aminoácidos de la SEC ID N°: 1 (aproximada)	1-6; 24-38; 49-63

Ejemplo 5: Humanización de RK22*Ejemplo 5.1: Secuenciación de anticuerpos*

- 5 Los genes pesado variable (VH) y ligero variable (VL) que codifican RK22 se clonaron de las células de hibridoma que producían el anticuerpo RK22 y después se determinaron las secuencias de aminoácidos. Estas secuencias se listan en la Tabla 1 como SEC ID N°: 14 y 16.

Ejemplo 5.2: Línea germinal de anticuerpo RK22

- 10 Los datos de la secuencia de los anticuerpos se usaron para identificar la secuencia de la línea germinal más próxima para la cadena pesada y ligera de RK22, por ejemplo, DP-5 y DP-7 presentaron aproximadamente una identidad del 65 % y 71 % con VH de RK22, respectivamente (Figura 7); mientras que DPK 24 presentó una identidad de aproximadamente el 78 % con VL de RK22 (Figura 8). Se realizaron las mutaciones apropiadas usando técnicas convencionales de mutagénesis dirigida a sitios con los cebadores mutagénicos apropiados. La mutación de secuencias de anticuerpos se confirmó por análisis de secuencia. Esta memoria descriptiva se entiende con más profundidad a la luz de las enseñanzas de las referencias citadas con la memoria descriptiva.

Ejemplo 6: Formatos de inmunoensayo tipo sándwich para cuantificar y detectar GDF8

- 20 Cada uno de los anticuerpos descritos en los Ejemplos a continuación se biotinilaron usando un kit de biotinilación Sulfo-LC EZ Link de Pierce. A partir de estudios previos, se determinó que un exceso de 40 veces de NHS-biotina era óptimo para la biotinilación de ambos anticuerpos. Se biotinilaron 400 ug de cada anticuerpo usando un exceso molar de 40 veces de biotina. Esto dio como resultado una incorporación de aproximadamente 3 a 5 mmoles de biotina por mmol de anticuerpo. Después de la biotinilación, todos los anticuerpos se dializaron en PBS durante una noche a 4 °C y la concentración de proteína total se determinó por BCA. Para determinar la proporción molar de incorporación de biotina, se añadió una solución del anticuerpo biotinilado a una mezcla de ácido 2-(4'-hidroxiazobenceno)benzoico (HABA) y avidina. Debido a su mayor afinidad por la avidina, la biotina desplazó al HABA de su interacción con avidina y la absorbancia a 500 nm disminuyó proporcionalmente. La cantidad de biotina conjugada con un anticuerpo puede cuantificarse midiendo la absorbancia de la solución HABA-avidina antes y después de la adición de la muestra biotinilada. El cambio de absorbancia se refiere a la cantidad de biotina incorporada en el anticuerpo.

- 30 Adicionalmente, el suero utilizado en los estudios descritos más adelante está desprovisto de GDF8 endógeno. Se preparó una columna de afinidad de reducción de GDF-8 en suero usando 1 mg de anticuerpo monoclonal MYO-29 inmovilizado en perlas de sefarosa activadas con bromuro de cianógeno. La columna se lavó previamente con ácido acético 0,1 M y se neutralizó con PBS que contenía NaCl 250 mM pH 7,2 antes de la adición de suero humano. Debido a la activación aparente de GDF-8 latente por calentamiento a 65 °C, el suero se precalentó 65 °C durante diez minutos y después se hizo pasar tres veces a través de una columna de afinidad anti-GDF8 de MYO-029 1 mg y se comprobó la actividad en ensayos de GDF-8 libre y total. Inicialmente, 2,5 ml de volúmenes de suero se hicieron pasar sobre la columna. Después de un ensayo inicial, volúmenes más grandes de suero (alícuotas de 13 ml) se calentaron y se redujeron en GDF-8 por pases múltiples sobre la columna de afinidad con lavados intermedios de la columna en ácido acético 0,1 M. Este suero empobrecido se usó como la matriz para la generación de curvas patrón con concentraciones conocidas de GDF-8 maduro.

- 40 *Ejemplo 6.1 Experimentos del emparejamiento de anticuerpos: Comparación de formatos de inmunoensayo: Captura de RK35 con detector de RK22 o captura de RK22 con detector de RK35.*

- 45 Cada anticuerpo monoclonal anti-GDF-8 se recubrió individualmente en borato sódico 0,1 M en una placa de 96 pocillos de alta unión, (Immulon 4 HBX) durante una noche a 4 °C o durante 1 hora a 37 °C a una concentración de 1 µg/ml. La placa se lavó y después se bloqueó durante diez minutos con reactivo Pierce Superblock. Se diluyó GDF-8 de reserva (1,77 mg/ml en ácido trifluoroacético TFA al 0,1 %) a 10 µg/ml en ácido trifluoroacético (TFA) 0,1 % en tubos de plástico siliconizados y posteriormente se diluyó en suero humano empobrecido en GDF8 a concentraciones que variaban de 12,5 ng/ml a 0,2 ng/ml como calibradores para la generación de curvas patrón. La curva patrón se procesó por triplicado usando las columnas 1-3 de la placa de ensayo. En una placa de 96 pocillos independiente previamente bloqueada, se añadieron alícuotas de 30 µl de suero de ensayo a cada uno de los 6 pocillos (para determinaciones por triplicado) que contenía 120 µl de tampón THST (concentración final, suero al 20 %; volumen total, 150 µl). Para el ensayo de GDF-8 total, se transfirieron 80 µl de esta solución a una placa de PCR de 96 pocillos y se calentó a 80 °C durante 5 minutos. Las muestras calentadas se enfriaron en hielo antes de la

adición a la placa de ensayo.

A los pocillos utilizados para la curva patrón, se añadieron 65 µl de tampón THST a todos los pocillos seguido por 10 µl de suero calibrador para enrasar el volumen final a 100 µl. De la placa de preparación, se retiraron 50 µl de muestra de suero al 20 % no caliente y se añadieron a la placa de ensayo para una concentración de suero final de 10 % de suero en un volumen total de 100 µl. De la placa calentada, se añadieron 50 µl de suero al 20 % a una placa de ensayo secundaria. Las placas de ensayo secundarias se incubaron a temperatura ambiente con agitación. Después de 1,5 horas, las placas se lavaron y se añadió reactivo Superblock durante 5 minutos. Se añadieron RK22 o RK35 biotinilado a los pocillos a 150 ng/ml durante 1,5 horas con agitación. Las placas se lavaron y volvieron a bloquearse antes de la adición de 100 µl de dilución de estreptavidina ultrasensible-HRP (1: 20.000) durante 1 hora temperatura ambiente con agitación. Las placas se lavaron y volvieron a bloquearse antes de la adición de sustrato TMB durante 15 minutos a temperatura ambiente con agitación. La reacción se detuvo mediante la adición de H₂SO₄ 0,5 M y se leyeron en un lector de placa Spectramax de Molecular Devices a 450 nm. En las Figuras 9A y 9B puede observarse una comparación de los formatos de inmunoensayo: captura de RK35/detector de RK22 o captura de RK22/detector de RK35. Como se observa, cualquier formato pudo detectar entre 100 y 10 pg/ml de GDF8 en tampón de ensayo THST o en suero al 10 %.

Ejemplo 6.2 Efectos de suero sobre el ensayo de GDF-8

Los resultados previos sugieren que los efectos de fondo en suero aumentan los valores de absorbancia en el intervalo de 0,3 unidades de DO a aproximadamente 0,5 unidades de DO dependiendo de la muestra de suero a analizar (datos no mostrados). Se determinó que la causa de aumento de señal se debía al efecto HAMA (es decir, una reacción de IgG de suero humana con los anticuerpos monoclonales de ratón usados en el ensayo) analizando el suero humano contra RK22 revestido o no revestido (control) con placas de ensayo HBX (Figura 10). Las placas sin anticuerpo monoclonal no mostraron aumento de señal lo que sugiere que el aumento del fondo no se debía a la unión no específica del suero a la placa sino que era dependiente de la presencia de anticuerpo monoclonal.

Varios intentos para reducir el fondo no tuvieron éxito, incluyendo disociación con ácido y la adición de exceso de IgG de diversas especies para bloquear la unión de IgG humana a las IgG murinas (datos no mostrados). La adición de un reactivo disponible comercialmente, especialmente diseñado para reducir la interferencia HAMA del ensayo (Reactivo de Inhibición de Inmunoglobulina (II R)) fue exitosa cuando se añadió al siguiente inmunoensayo. 1 µg/ml de RK35 diluido en Borato de Na 0,1 M pH 8,5 se usó como reactivo de captura. Myo-29 se tituló sobre la placa +/- suero +/- IIR y también 250 pg/ml de GDF8 y se incubó durante 1,5 horas. Se añadió RK22 biotinilado a una dilución de 1: 10.000 en tampón de ensayo THST y se incubó durante 1,5 horas. 100 µl de estreptavidina-HRP diluida a 1: 20.000 en THST seguido por el revelado de la reacción en TMB. Como puede observarse en la Figura 11, el fondo HAMA se redujo usando el reactivo IIR.

Ejemplo 6.3: Inhibición de la unión de GDF8 con anticuerpo MYO-029

MYO-029 (depositada el 2 de octubre, 2002, en la Colección Americana de Cultivos de Tejidos (ATCC) bajo los Números de Denominación de Depósito respectivos PTA-4741) es un anticuerpo terapéutico que se ha usado en ensayos clínicos en un esfuerzo para aumentar la fuerza muscular en pacientes con trastornos musculares. En el inmunoensayo para detectar GDF8 en pacientes a los que se ha administrado Myo-029, como se describe en el presente documento, se ha mostrado que tiene reactividad cruzada de anticuerpo de ensayo RK35 con MYO-029 por la unión a GDF-8. Para verificar esta reactividad cruzada MYO-029 se recubrió en las placas de ensayo. Se añadieron 1200 pg/ml de GDF-8 a cada pocillo. Después se añadieron concentraciones en aumento de RK22 biotinilado o RK35 biotinilado. Como se observa en la Figura 12, GDF-8 no marcado compite con RK35 biotinilado por la unión a MYO-029 y no se generó señal en esta configuración. No se produjo señal con RK35 biotinilado, lo que indica reactividad cruzada entre RK35 y MYO-029 por la unión a GDF8.

Ejemplo 6.4: El uso de MyO-029 como un competidor para GDF8

Se realizaron ensayos usando ambas configuraciones de ensayo (RK35/RK22 o RK22/RK35) y cantidades en aumento de anticuerpo terapéutico MYO-029 con una concentración constante de GDF-8 (250 pg/ml) añadido en tampón de ensayo o en suero humano al 10 %. Como se observa en la Figura 13A, RK22 se usó como anticuerpo de captura. GDF-8 a 250 pg/ml se incubó durante 1,5 horas a temperatura ambiente con RK35 biotinilado a 150 ng/ml y concentraciones en aumento de MYO-029 (de 0 a 20 µg/ml). Incluso la concentración más alta de MYO-029 solo se observó una inhibición de aproximadamente el 30 %. Como se observa en la Figura 13B se usó RK35 como anticuerpo de captura. GDF-8 a 250 pg/ml se incubó durante 1,5 horas a temperatura ambiente con RK22 biotinilado y concentraciones en aumento de MYO-029. Se observó una inhibición de casi el 100 % a las concentraciones de MYO-029 ≥ 5 µg/ml.

Ejemplo 6.5 Recuperación de adición en suero humano usando el formato de detección RK35 de captura/RK22.

En experimentos de recuperación de adición se analizaron tres muestras de suero humano para la recuperación de GDF-8. Cada muestra se diluyó a 600 pg/ml en suero de GDF-8 maduro al 100 % y se diluyó en serie dos veces para producir muestras de 600, 300 y 150 pg/ml de GDF-8. Cada una de estas muestras se analizó en el formato de

RK35 de captura/RK22 de detección con o sin la adición de 20 µg/ml de MYO-29, véase la Figura 14A. Se calculó la reducción de señal debida a la adición de MYO-29, véase la Figura 14B. Estos valores se compararon con una curva patrón de GDF-8 generada en tampón de ensayo THST y los valores observados frente a los valores esperados para GDF-8 se trazan en la Figura 15. Los valores observados se encuentran bastante por debajo de los valores esperados, lo que indica que solo las curvas patrón en tampón no cuantifican con precisión los valores GDF-8 encontrados en muestras de suero.

Ejemplo 6.6 El uso de suero frente a tampón de ensayo para la generación de curvas patrón

En este estudio se usó suero de ratón normal y suero de ratón GDF-8 KO. Estos sueros, junto con el suero humano normal y el tampón THST, se utilizaron para generar curvas patrón usando la proteína GDF-8 madura, véase la Figura 15. La diferencia en la pendiente entre las curvas patrón generadas en suero frente al tampón explican por qué los valores observados frente a los previstos en experimentos de recuperación/adición difieren tan drásticamente (Figura 16) cuando el tampón es el medio usado para la generación de curvas patrón. La pendiente reducida de la curva patrón en suero en comparación con la curva patrón en tampón remarca los efectos de matriz del suero sobre la señal producida y sugiere que las curvas patrón deben generarse en suero. El suero de ratón KO no está disponible en las cantidades necesarias para el desarrollo del ensayo y el suero normal de ratón tiene altos niveles endógenos de GDF-8 que podrían interferir con la predicción de GDF-8 en muestras de suero desconocidas. El suero normal humano también tiene niveles endógenos de GDF-8, aunque menores que el de ratón normal, que también añade un factor de interferencia no deseado. Una posible alternativa sería empobrecer un conjunto de suero humano normal de GDF-8 para su uso como matriz de calibración de ensayo.

Ejemplo 6.7 Inactivación/disociación del anticuerpo Myo-29 en suero

Los estudios anteriores demostraron que la presencia de MYO-029 interfiere con la cuantificación precisa de GDF-8 en el formato RK35/RK22 por reactividad cruzada con el epítipo para el anticuerpo RK35. Se llegó a la hipótesis de que si se pudiesen disociar complejos GDF-8/MYO-029 en una muestra, sería posible desarrollar un inmunoensayo que midiese de modo preciso GDF-8 en presencia de MYO-029. Existen algunas posibilidades para la disociación de anticuerpos de sus antígenos, incluyendo la disociación ácida y la termodesnaturalización. Basándose en un informe (Brown y col., 1990, Growth Factors 3, 35-43) de que TGF-β latente puede activarse irreversiblemente por termotratamiento. Un gradiente de temperatura de 65 °C a 80 °C en tampón de ensayo THST no tuvo ningún efecto sobre la inhibición demostrada por el anticuerpo MYO-029 en el ensayo de GDF-8. Sin embargo, se realizó un experimento piloto con suero normal no añadido, suero añadido con 400 pg/ml de GDF-8 maduro o suero añadido con GDF-8 latente. En este experimento, el anticuerpo MYO-029 se añadió al 20 %a suero y se calentó a 80 °C durante siete minutos (véase Figura 17). Los resultados indican que la actividad de GDF-8 en el ensayo se mantuvo a esta temperatura y que el anticuerpo MYO-029 se inactivo en suero calentado a 80 °C. Esta inactivación se demostró de dos formas: 1) muestras de suero calentadas en presencia de Myo-029 tuvieron el mismo resultado de señal que las muestras de control calentadas sin la adición de MYO-029 y 2) la señal de ensayo pudo reducirse de nuevo a niveles de fondo mediante la adición de MYO-029 reciente después del calentamiento de la muestra. Estos resultados se observaron en suero normal, suero al que se añadió GDF-8 maduro y suero al que se añadió GDF-8 latente. Las muestras de suero a las que se añadió GDF-8 latente demuestran un aumento en la señal que parece dependiente del material de GDF-8 latente y no de GDF-8 maduro. Para determinar una duración más precisa para la inactivación efectiva, se realizó un experimento cinético usando suero normal añadido con 5 µg/ml de MYO-029. Los resultados indican que el anticuerpo MYO-029 está completamente inactivado en tan pronto como tres minutos a 80 °C.

Ejemplo 6.8 Reducción de GDF8 en suero humano

Para reducir suero humano en GDF-8 endógeno, se preparó una columna de afinidad con 1 mg de anticuerpo MYO-029 inmovilizado covalentemente en perlas de sefarsa mediante activación con bromuro de cianógeno. La columna se prelavó y se hicieron pasar pequeñas alícuotas de suero humano sobre la columna y se ensayaron para actividad de GDF-8 en el ensayo ELISA GDF-8. Adicionalmente, el suero se precalentó a 65 °C y después se enfrió antes de pasarse sobre la columna. El suero calentado, cuando se procesa en el ensayo de GDF-8, presenta un aumento de señal que puede deberse a la activación inmunológica de GDF-8 latente en suero. La Figura 18 muestra el aumento de señal en el ensayo de GDF-8 después del calentamiento y también la reducción de señal en el suero calentado/empobrecido (C/E). Cabe destacar que no se observó aumento de la señal en el suero C/E cuando volvió a calentarse a 80 °C.

Ejemplo 6.9 Curvas patrón en suero C/E

Usando suero desprovisto de GDF-8 endógeno se generaron curvas patrón de inmunorreactividad en condiciones de calor y no calor usando tanto GDF-8 maduro como GDF-8 latente. Se añadió GDF-8 maduro en suero al 100 % y se diluyó en serie de 2500 pg/ml a 40 pg/ml. GDF-8 latente se usó a una concentración de proteína 20 veces la de GDF8 maduro que en el intervalo de 50.000 pg/ml a 800 pg (Figura 19). Los resultados de este experimento muestran un aumento significativo en la señal de ensayo cuando se calienta GDF-8 latente en suero C/E al 100 % a 80 °C. Obsérvese que en la Figura 18, el suero C/E calentado a 80 °C no mostró el aumento de señal característico que se observa en suero normal. Esto da credibilidad a la hipótesis de que el aumento observado en suero normal

se debe a GDF-8 latente endógeno. Por otro lado, la señal generada con GDF-8 maduro no aumenta después del calentamiento y en experimentos repetidos tiene una tendencia a disminuir con el calentamiento a 80 °C.

Ejemplo 6.10 Análisis de GDF8 libre y total en ocho muestras de suero normal

Ocho muestras de suero normal, previamente se congelaron previamente congeladas, descongelaron y ensayaron para GDF-8 total y libre usando el ensayo de temperatura ambiente (libre) y la etapa de calentamiento a 80 °C (total) para activar GDF-8 latente. La curva patrón para este análisis se generó usando suero C/E con concentraciones conocidas de proteína GDF-8 madura añadidas como el calibrador de GDF-8. La curva patrón varió de 12.500 pg/ml a 188 pg/ml y se usó un análisis de ajuste de curva de regresión no lineal con un coeficiente de correlación de 0,999 (véase Figura 20) para calcular valores GDF-8 en las ocho muestras de suero desconocidas. Como se ha descrito anteriormente, el cambio en la densidad óptica inducido por la adición de Myo-029 es directamente proporcional a la cantidad endógena de GDF-8 en la muestra. La Figura 21 es una representación de los datos primarios que se usan para determinar la concentración de GDF-8. Esta figura ilustra la señal GDF-8 libre y su señal reducida correspondiente por la adición del anticuerpo MYO-029, así como el GDF-8 total y su señal correspondiente reducida por la adición de MYO-029. La Figura 22 presenta los resultados de un experimento de reproducibilidad de ensayo. El ensayo de GDF8 libre y total presenta un alto grado de reproducibilidad. Esto es especialmente cierto para el ensayo de GDF-8 libre (a temperatura ambiente). La señal de ensayo aumentada en el ensayo total (calentado a 80 °C), de día a día se debe a un aumento en el tiempo de calentamiento de cinco a diez minutos. Se observó repetidamente la reducción en la señal de ensayo con una duración de tiempo en aumento de calentamiento de la muestra y puede reflejar la desnaturalización del antígeno y la pérdida de inmunorreactividad.

Ejemplo 6.11 GDF8 endógeno termoactivado está sub-detectado en presencia de MYO-029

En el experimento mostrado en la Figura 23 se incubó suero humano en presencia o en ausencia de MYO-029, después se termodesnaturalizó a diversas temperaturas antes del análisis por ELISA. La cuantificación de los niveles de GDF-8 en muestras de ensayo se realizó mediante interpolación de los resultados del análisis de una curva patrón que consistían en una dilución en serie de dímero de GDF-8 recombinante purificado de concentración conocida añadida en el suero humano agrupado empobrecido en GDF-8 por cromatografía de afinidad. La detección máxima de GDF-8 en ausencia de MYO-029 ocurrió a aproximadamente 60 °C. La presencia de MYO-029 enmascaró la detección de GDF-8 en suero a bajas temperaturas. La incubación a temperaturas mayores de 65 °C restableció parcialmente la detección de GDF-8 en presencia de MYO-029. Sin embargo, las concentraciones de GDF-8 calculadas a temperaturas mayores de 65 °C mostraron que el ensayo subestimaba sustancialmente la cantidad total de GDF-8 presente en el suero.

Ejemplo 6.12 GDF8 se detecta en presencia de Myo-029 a pH bajo

La detección subóptima de GDF-8 cuando se calienta a temperaturas necesarias para la disociación de MYO-029 provocó la evaluación de procedimientos alternativos. La Figura 24 demuestra la capacidad del ELISA de disociación ácida para detectar niveles similares de GDF-8 en ausencia y presencia de MYO-029. En experimentos anteriores la mezcla GDF-8/MYO-029 se neutralizó antes de la unión al anticuerpo de captura. En estas condiciones MYO-029 fue capaz de competir por la unión con el anticuerpo de captura, RK35, tras la neutralización. En la Figura 24 se demuestra que cuando las condiciones de captura se mantienen a un pH ácido bajo, RK35 aún es capaz de unirse a GDF-8 mientras que MYO-029 no, y por lo tanto la recuperación completa de la detección de GDF-8 puede conseguirse en presencia o ausencia de anticuerpo terapéutico.

Ejemplo 6.13 RK35 se une a GDF8 en condiciones ácidas

Para verificar que RK35 (pero no MYO-029) puede unirse a GDF-8 en condiciones ácidas, se titularon independientemente RK35 y MYO-029 en suero humano y la etapa de captura del analito se realizó en condiciones ácidas. Cantidades en aumento de RK35 en solución fueron capaces de unirse y competir por la unión a GDF-8 en el RK35 unido a la placa, dando como resultado una detección disminuida de GDF-8 en condiciones ácidas. MYO-029 fue incapaz de unirse a GDF-8 en solución aproximándose a un pH de 3,0, independientemente de la concentración de MYO-029 añadida, dejando a GDF-8 en solución disponible para unirse al anticuerpo RK35 recubierto en la placa ELISA (véase Figura 25). Por tanto, la capacidad de RK35 para unirse a GDF-8 en condiciones en las que MYO-029 no puede, puede servir como un atributo útil que puede aprovecharse para medir los niveles de GDF-8 en presencia de MYO-029. La disociación ácida de MYO-029 de GDF-8 es eficaz incluso con concentraciones en aumento de MYO-029. Los datos de la Figura 25 muestran que aumentar la concentración de MYO-029 a 100 µg/ml no disminuyó la detección de GDF-8 usando el protocolo de disociación ácida. Esta figura también muestra la reducción significativa en la detección de GDF-8 usando el protocolo de disociación con calor, Figura 26.

La acidificación de suero humano da como resultado estimaciones mucho mayores de los niveles de GDF-8 en suero a los previamente indicados. Para demostrar que las estimaciones aumentadas en suero son el resultado de una mayor detección de GDF-8 y no se deben a un artefacto inducido por ácido, se analizaron el suero de un ratón con inactivación genética modificado por ingeniería genética y un animal con inactivación genética de GDF-8 de origen natural, la vaca Azul Belga. La Figura 27 muestra que el suero tanto del ratón con inactivación genética como

de la vaca Azul Belga no pudieron producir una señal sobre el fondo de placa cuando se midieron a un pH bien neutro o ácido. Los valores indicados en el presente documento están en unidades de densidad óptica y permiten realizar una evaluación comparativa aunque la ausencia de una curva de calibrador da como resultado la incapacidad para determinar la cantidad absoluta de GDF-8.

5 *Ejemplo 6.14 Ajuste de la curva de calibración*

Para evaluar la variabilidad inter-ensayo e intra-ensayo del procedimiento de disociación ácida, se analizaron alícuotas de suero de vaca Azul Belga añadido con dímero de GDF-8 recombinante. Se prepararon cuatro soluciones madre independientes de la curva de calibración y se ensayaron por triplicado en cinco localizaciones diferentes de una placa de 96 pocillos.

- 10 Puede usarse un modelo logístico de 4 o 5 parámetros para ajustar una curva de calibración para este ensayo. La media aritmética de los triplicados puede usarse como los datos primarios para el ajuste del modelo. Típicamente, las varianzas a diferentes niveles de concentración tienden a ser diferentes. Para obtener una curva de calibración que sea precisa a concentraciones tanto bajas como altas, debe emplearse un procedimiento no lineal ponderado de mínimos cuadrados o una transformación estabilizante de la varianza de los datos de la densidad óptica seguido por un procedimiento no lineal de sin ponderar de mínimos cuadrados.

Las Figuras 28A-C contrastan tres procedimientos diferentes de ajuste de curva de calibración para cinco placas ELISA GDF-8 en cuanto a sus errores relativos de las concertaciones retrocalculadas para patrones de calibración. Si se toman los errores relativos al 20 % como aceptables, entonces pueden usarse el ajuste de los modelos logísticos tanto de 4 como de 5 parámetros ajustados sobre la raíz cuadrada de la densidad óptica.

20 *Ejemplo 6.15 Precisión y exactitud del ensayo*

Para evaluar la variabilidad inter e intra ensayo del procedimiento de disociación ácida se analizaron alícuotas de suero de la vaca Azul Belga añadidas con dímero de GDF-8 recombinante. Se prepararon cuatro soluciones madre independientes de la curva de calibración y se sometieron a ensayo por triplicado en cinco localizaciones diferentes de una placa de 96 pocillos. La Figura 29 muestra el diseño de placa de cinco placas que se procesaron en tres días diferentes. Las concentraciones de las muestras con adición se calcularon a partir de una curva de calibración ajustada para cada placa por un modelo logístico de 5 parámetros. Los coeficientes de variación (CV) intra e inter placa y los errores relativos (ER) se resumen en las Tablas 1 y 2. Las precisiones tanto intra-placa como inter-placa se encuentran dentro del 20 % en base a cualquier procedimiento de cálculos de CV.

TABLA 5

Variabilidad intra-placa de muestras con adición					
Muestra	Nominal (netml)	Número de Placas	Promedio CV N° 1 (%)	Promedio CV (%)	Promedio Relativo (%)
LLOQ	0,5	5	2,9	4,5	55,0
L-QC	2,0	5	2,4	3,2	37,1
M-QC	10,0	5	2,6	3,2	23,3
H-QC	40,0	5	10,2	11,5	11,7
CV N° 1 = DT/Media de la muestra					
CV N° 2 = DT/Concentración nominal					

30

TABLA 6

Variabilidad inter-placa de las muestras con adición				
Muestra	Concentración nominal	CV N° 1 (%)	CV N° 2 (%)	Error Relativo
LLOQ	0,5	7,0	10,8	55,0
L-QC	2,0	6,0	8,3	37,1
M-QC	10,0	7,2	8,9	23,3
H-QC	40,0	12,1	13,5	11,7
CV N° 1 = DT inter-placa/Media de la muestra				
CV N° 2 = DT inter-placa/Concentración nominal				

Ejemplo 7: Medición de las concentraciones de miostatina en suero humano

Usando el ensayo como se describe anteriormente, se midieron las concentraciones circulantes de miostatina y se compararon en sueros de seres humanos sanos. En un estudio se evaluaron los niveles de miostatina de sueros de hombres jóvenes y de edad avanzada. También se examinaron los efectos del tratamiento con testosterona sobre los niveles circulantes de miostatina usando muestras conservadas de un estudio de respuesta a la dosis de testosterona. En ese estudio, cuyos detalles se habían publicado previamente (Bhasin S y col. J Clin Endocrinol Metab 2005; 90: 678-88, Bhasin S y col. Am J Physiol Endocrinol Metab 2001; 281: E1172-81, y Storer TW y col. J Clin Endocrinol Metab 2003; 88: 1478-85), la administración de dosis graduadas de testosterona a hombres sanos jóvenes y de edad avanzada se asoció con aumentos dependientes de la dosis en la masa musculoesquelética y la fuerza. En otro estudio se evaluaron los sueros de mujeres sanas y quirúrgicamente menopáusicas.

En el primer estudio las muestras de suero procedían de hombres jóvenes sanos, de una edad de 18-35 años y de hombres de edad avanzada de una edad de 60-75 años, con niveles normales de testosterona, que participaron en un estudio de respuesta a la dosis de testosterona como se ha citado anteriormente. Los protocolos del estudio fueron aprobados por los comités de revisión institucional de la Charles R. Drew University y del Harbor-UCLA Research and Education Institute. Los criterios de exclusión incluyeron un historial de cáncer de próstata, PSA >4 ng/ml, una puntuación de >7 en el cuestionario de síntomas del tracto urinario inferior de la AUA, un hematocrito >48 %, apnea del sueño grave, diabetes mellitus, cardiopatía congestiva, infarto de miocardio en los seis meses anteriores, el uso de andrógenos en el año anterior, o la participación en regímenes de entrenamiento de ejercicio de moderado a intenso. Después de un período de control de cuatro semanas, los participantes se asignaron al azar a uno de los cinco grupos de tratamiento para recibir inyecciones mensuales de un agonista de GnRH (depósito de leuprolida, 7,5 mg; TAP, North Chicago, IL) para suprimir la producción de gonadotropina endógena. Los participantes también recibieron inyecciones intramusculares semanales de enantato de testosterona (TE, Delatestril, 200 mg/ml; Savient Pharmaceuticals, Inc., Iselin, NJ) en una de cinco dosis: 25 mg, 50 mg, 125 mg o 300 mg semanalmente.

Las muestras de suero (o muestras de calibrado en suero de vaca Azul Belga) se mezclaron con tampón de disociación ácida (Glicina-HCl 0,2 M, pH 2,5) a una proporción de 1:13,3. Para ensayos no disociativos, las muestras se mezclaron con tampón THST (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 500 mM, Glicina 1 mM, Tween-20 al 0,05 %; pH 8,0) en lugar de tampón de Glicina-HCl. Las placas de ensayo (Immulon 4 HBX N° 3855) se incubaron con RK35 a 2,0 mg/ml en tampón de recubrimiento (Borato Sódico 100 mM, pH 9,1) durante una noche a 4 °C, se lavaron y se bloquearon con 200 µl/pocillo de SuperBlock-TBS (Pierce N° 37535). Las muestras de suero diluido (100 µl) se transfirieron a la placa de ensayo, se incubaron a temperatura ambiente durante 90 min, se lavaron 4 veces con THST y 100 µl de anticuerpo secundario RK22 biotinilado (0,1 µg/ml) se añadió a cada pocillo durante 90 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron cuatro veces con THST, y 100 µl de Estreptavidina-HRP (SouthernBiotech N° 7100-05) diluido 1:40,000 en tampón THST se añadió durante una hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron de nuevo cuatro veces con THST, y se revelaron por adición de 100 µl de sustrato TMB durante 12 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 100 µl de H₂SO₄ 0,5 M por pocillo y las placas ELISA se leyeron a una DO de 450 nm con una corrección de longitud de onda ajustada a 540 nm.

Intervalo de curva de calibración: Se generó una curva de calibración representando la DO y la concentración correspondiente de cada calibrador. Se usó un ajuste logístico de 5 parámetros para ajustar la curva de calibración. Se preparó una curva de calibración que consistía en diluciones dobles de miostatina madura humana recombinante en sueros de vaca Azul Belga extendiéndose de 73 pg/ml a 75.000 pg/ml antes de cada ensayo. La imprecisión intra e inter-ensayo de los valores de retrolectura para once calibraciones se determinó a partir de seis procesos analíticos. Se calcularon la media, DT, % de CV y % de sesgo de las concentraciones extrapoladas para cada desarrollo analítico (para evaluar la imprecisión intra-ensayo) y para todos los desarrollos analíticos (para evaluar la imprecisión inter-ensayo). Los límites inferior y superior de cuantificación se definieron como las concentraciones de calibración inferiores (LLQ) y superiores (ULQ) que podrían medirse con un % de CV y % de sesgo ≤30 % intra-ensayo.

Preparación de muestras de validación: Se prepararon tres conjuntos de muestras de validación correspondientes a concentraciones bajas, en la mitad del intervalo, y altas de miostatina usando muestras de suero de sujetos sanos con concentraciones de miostatina endógena en intervalo inferior y medio de la curva de calibración respectivamente. La muestra de alta validación fue una muestra de suero de un sujeto sano al que se había añadido proteína miostatina recombinante.

Imprecisión intra e inter-ensayo: Los CV intra e inter-ensayo se midieron en seis alícuotas individuales de cada una de las tres muestras de validación (baja, media, alta) en cinco desarrollos analíticos independientes. El intervalo de aceptación del proceso analítico CQ (media de variación de ensayo total +/-2 DT) se determinó a partir de las concentraciones de miostatina medidas en 23 alícuotas distintas de cada una de las tres muestras de CQ en 25 desarrollos analíticos independientes. Una alícuota de cada una de las tres muestras CQ (CQ baja, CQ media y CQ alta) se analizó en cada desarrollo analítico de muestras. Se aceptó un desarrollo analítico si las concentraciones medias de miostatina en dos de tres muestras de CQ se encontraban dentro del intervalo de aceptación establecido.

5 Otros ensayos: Los niveles de testosterona total en suero se midieron mediante un radioinmunoensayo específico que se había validado previamente frente a cromatografía líquida en tándem con espectrometría de masas (LC-MSI/MS). Los coeficientes de variación intra e inter-ensayo para el ensayo total T fueron del 8,2 % y del 13,2 %, respectivamente. T libre, separado del suero por un procedimiento de diálisis en equilibrio, se midió por un radioinmunoensayo sensible que tenía una sensibilidad de 0,22 pg/ml, y coeficientes de variación intra e inter-ensayo del 4,2 % y del 12,3 %, respectivamente (Sinha-Hikim y col. J Clin Endocrinol Metab 1998; 83: 1312-8). Los procedimientos de radioinmunoensayo y LC/MS/MS se compararon analizando muestras preparadas en suero separado por carbón vegetal al cual se habían añadido cantidades conocidas de T. Estas mediciones demostraron una correlación de 0,99 entre el radioinmunoensayo y la medición LC-MS/MS. Se midieron los niveles de globulina de unión a hormonas sexuales en suero (SHBG) mediante un ensayo inmunofluorométrico que tenía una sensibilidad de 6,25 nmol/l. La composición corporal se evaluó al inicio y durante la semana 20 por absorciometría de rayos X de energía dual (DEW, Hologic 4500, Waltham, MA). Se usó un fantoma de composición corporal para calibrar la máquina antes de realizar cada medición.

10 Análisis estadísticos: Todas las variables de resultados se evaluaron con respecto a la distribución y homogeneidad de varianza; variables que no cumplieron los supuestos de homogeneidad de varianza o distribución normal se transformaron logarítmicamente. Se usó ANOVA para evaluar diferencias entre grupos de dosis estratificados por edad, más jóvenes frente a edad más avanzada, en un solo momento con el ensayo de Sheffe para determinar qué grupos diferían significativamente si se identificaba una diferencia por ANOVA. Los cambios en los grupos desde el inicio al tratamiento se evaluaron con ensayos de t emparejados. El alfa se estableció a 0,05 para determinar la significación estadística. Los datos se presentan como media +/- DTM o cambio % medio del inicio +/- DTM, salvo que en las leyendas de la figura se indique otra cosa.

15 Características del ensayo con miostatina: Intervalo lineal: La imprecisión media intra e inter-ensayo se determinó a partir de seis desarrollos analíticos para cada una de los once calibradores (73-75.000 pg/ml) en la curva patrón (Tabla 7, a continuación). El CV inter-ensayo para el calibrador de 73 pg/ml fue 36,4 %, que superó el límite aceptable (<30 %). Por lo tanto, el LLQ del ensayo se determinó por el siguiente punto calibrador (147 pg/ml) en el cual el CV inter-ensayo y el % de sesgo fueron 19,7 % y 3,4 %, respectivamente. El CV inter-ensayo de 32,4 % para el calibrador de 75.000 pg/ml tampoco se encontraba dentro del límite aceptable (<30 %) definiendo de este modo la ULQ al siguiente punto de calibrador más bajo (37.500 pg/ml) en el cual el CV y el % de sesgo eran 3,6 % y 0,8 %, respectivamente. El intervalo lineal cuantitativo del ensayo se extendió de 143 pg/ml a 37.500 pg/ml en una matriz biológicamente relevante.

25

30

TABLA 7:

Imprecisión intra e inter-ensayo de la curva de calibración de miostatina

CV Intra-ensayo											
Concentración (ng/ml)	75.000	37.500	18.750	9.375	4.688	2.344	1.172	586	293	147	73
Media intra-ensayo % CV	36,2	13,2	5,0	4,4	2,9	3,9	8,6	11,3	12,1	7,9	14,1
Nº de desarrollos analíticos	2	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
CV Inter-ensayo											
Concentración (pg/ml)	75.000	37.500	18.750	9.375	4.688	2.344	1.172	586	293	147	73
Nº de desarrollos analíticos	Concentraciones medias retrocalculadas a partir de desarrollos analíticos individuales										
1	77.628	38.353	18.715	9.398	4.786	2.274	1.169	541	271	122	154
2	48.648	39.596	18.532	9.393	4.905	2.284	1.012	608	273	168	107
3	93.777	37.040	18.865	9.386	4.706	2.254	1.239	629	266	159	55
4	47.567	35.705	18.875	9.354	4.674	2.407	1.123	605	280	117	106
5	53.495	37.477	18.862	9.224	4.889	2.316	1.070	611	261	149	109
6	45.918	39.503	18.926	9.264	4.736	2.420	1.135	524	286	198	64
Media (pg/ml)	61.172	37.789	18.796	9.336	4.782	2.326	1.124	586	273	152	99
DT	19.837	1.348	147	75	96	71	79	43	9	30	36
% CV	32,4	3,6	0,8	0,8	2,0	3,1	7,0	7,3	3,3	19,7	36,4
% sesgo	-18,4	0,8	0,2	-0,4	2,0	-0,8	-4,1	0,0	-6,8	3,4	35,6
N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6

Imprecisión intra e inter-ensayo: Las concentraciones medias de miostatina (pg/ml, +/- DT) en las muestras de validación baja, media y alta en cinco desarrollos analíticos fueron 3739 +/- 146, 7615 +/- 125 y 18268 +/- 948, respectivamente. El CV intra-ensayo medido para las muestras de validación baja, media y alta (n = 5 para cada muestra de validación) fue 4,1 %, 4,7 % y 7,2 %, respectivamente, y el CV inter-ensayo fue 3,9 %, 1,6 % y 5,2 %, respectivamente.

Especificidad del ensayo: La proteína miostatina madura tiene un alto grado de conservación de secuencias entre las especies de mamíferos (4), lo que permite el uso del ensayo de miostatina en muchas muestras no humanas, incluyendo ratón, rata, perro, vaca y mono. Las muestras de suero de ganado (Azul Belga) deficiente en miostatina y de ratones con una mutación inactivadora en el gen de miostatina (mstn KO) se ensayaron en condiciones disociativas ácidas y se compararon con animales normales de la misma especie (Figura 29A). La miostatina en suero fue abundante en ratones normales (-120 ng/ml), mientras que en suero de vaca normal se estimó un promedio de aproximadamente 40 ng/ml. Por otro lado, la proteína miostatina era indetectable en los sueros tanto de ganado de vaca Azul Belga como en ratones KO para miostatina, lo que confirma la especificidad del ensayo para miostatina ya que las mutaciones en estos animales sin miostatina anulan la síntesis de la proteína.

Características iniciales de sujetos humanos: Cincuenta y dos de los 61 hombres jóvenes aleatorizados y 51 de los 62 hombres de edad avanzada aleatorizados completaron la fase del tratamiento. Se encontraban disponibles suficiente suero para los ensayos de miostatina y datos de composición corporal en la semana 20 para 50 hombres jóvenes y 48 hombres de edad avanzada; estos sujetos se incluyeron en este análisis secundario y sus características iniciales se muestran en la Tabla 8 a continuación. La tasa de cumplimiento de fármaco global fue mayor del 99 %.

La testosterona total inicial, testosterona libre, porcentaje de testosterona libre, concentración de SHBG no difirieron entre los cinco grupos de dosificación al inicio en ninguno de los grupos de jóvenes o de edad avanzada. Sin embargo, los hombres de edad avanzada tenían una testosterona total en suero y libre más baja y mayor SHBG que los hombres jóvenes. El peso corporal, índice de masa corporal, y porcentaje de masa grasa fue mayor en hombres de edad avanzada que en los hombres jóvenes, mientras que la altura fue similar en ambos.

TABLA 8

Características iniciales de los sujetos evaluados		
	Hombres jóvenes (n=50)	Hombres de edad avanzada (n=48)
Edad (años)	26,5 ± 4,6	66,4 ± 4,7
Altura (cm)	176,3 ± 16,4	175,9 ± 5,7
Peso (kg)	75,1 ± 10,9	83,2 ± 11,7
IMC (kg/m²)	24,1 ± 3,0	26,9 ± 3,5
Masa corporal magra (kg)	57,6 ± 7,2	57,9 ± 6,3
Porcentaje de masa grasa	18,0 ± 6,4	26,6 ± 5,4
Nivel total de testosterona	578,4 ± 165,2	330,6 ± 96,1

Niveles de miostatina en hombres jóvenes y de edad avanzada: Los niveles de miostatina en suero se distribuyeron normalmente en hombres tanto jóvenes como de edad avanzada. Los hombres jóvenes tenían niveles de miostatina significativamente más altos que los hombres de edad avanzada (8,0 +/- 0,3 frente a 7,0 +/- 0,4 ng/ml, P=0,03) (Figura 30A). Los niveles de miostatina en suero no estaban significativamente correlacionados con la masa corporal magra medida mediante DEXA en hombres tanto jóvenes como de edad avanzada (Figuras 30B y 30C). De manera similar, no hubo correlación significativa entre los niveles de miostatina y el peso corporal, índice de masa corporal o niveles de testosterona en suero al inicio (no mostrado).

Efectos de la administración de testosterona sobre los niveles de miostatina en hombres: Los niveles de miostatina en suero al inicio no difirieron significativamente entre los cinco grupos de dosis tanto entre los hombres jóvenes como de edad avanzada. Los niveles de miostatina en suero fueron significativamente más elevados en el día 56 en comparación con el inicio tanto en hombres jóvenes como de edad avanzada (Figura 31A). Los cambios en las concentraciones de miostatina en suero no difirieron significativamente entre los cinco grupos de dosis tanto en los hombres jóvenes como de edad avanzada. Los hombres de edad avanzada experimentaron un aumento del porcentaje significativamente mayor en los niveles de miostatina que los hombres jóvenes (Figura 31B). Los aumentos en los niveles de miostatina durante la terapia con testosterona no eran sostenidos; por tanto, los niveles de miostatina en suero en el día 140 no fueron significativamente distintos a los del inicio.

Los incrementos en los niveles de miostatina por encima del inicio estaban relacionados con cambios en las concentraciones de testosterona. Los cambios en los niveles de miostatina desde el inicio hasta el día 56 se correlacionaban positivamente con los cambios en las concentraciones de testosterona total (Figura 32A) y libre

5 (Figura 32C) en hombres jóvenes, pero no en hombres de edad avanzada (Figuras 32B y 32D). Como se ha indicado anteriormente, el tratamiento con testosterona se asoció con aumentos significativos en la masa corporal magra; los cambios en la masa corporal magra se correlacionaban significativamente con la dosis de testosterona y concentración de testosterona, como se ha descrito previamente. Sin embargo, los cambios en la masa corporal magra no se correlacionaban significativamente con el porcentaje absoluto o cambio porcentual (Figura 32E y 32F) en las concentraciones de miostatina.

10 Niveles de miostatina en mujeres: En otro estudio, se compraron muestras de suero de mujeres sanas, jóvenes con menstruación, de 19-21 años y mujeres posmenopáusicas, de 67-87 años, en BioServe, Beltsville, MD. Estas participantes habían dado su consentimiento en participar en un estudio de Bioserve aprobado por el IRB. Las mujeres quirúrgicamente menopáusicas tenían 18-55 años de edad, se habían sometido a cirugía ovárica al menos 6 meses antes de la incorporación y FSH en suero >30 U/L, IMC <35 kg/m², un frotis PAP y una mamografía normales en los anteriores 12 meses, y habían aportado un consentimiento informado por escrito aprobado por el IRB de la Boston University.

15 Los niveles de miostatina en suero en mujeres jóvenes no diferían significativamente de los de hombres jóvenes (Figura 33). Los niveles de miostatina en mujeres jóvenes con menstruación, con cirugía menopáusica y mujeres con menopausia natural no diferían significativamente.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 20 <110> Wyeth
- <120> Anticuerpos contra GDF8 y usos de los mismos
- <130> AM102658
- 25 <150> 61/001783
- <151> 01-11-2007
- <160> 36
- 30 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 109
- <212> PRT
- 35 <213> *Homo sapiens*
- <400> 1

ES 2 514 518 T3

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

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

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

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

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

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

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

<210> 2
 <211> 375
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 2

Met Gln Lys Leu Gln Leu Cys Val Tyr Ile Tyr Leu Phe Met Leu Ile
 1 5 10 15

5

10

ES 2 514 518 T3

Val Ala Gly Pro Val Asp Leu Asn Glu Asn Ser Glu Gln Lys Glu Asn
 20 25 30

Val Glu Lys Glu Gly Leu Cys Asn Ala Cys Thr Trp Arg Gln Asn Thr
 35 40 45

Lys Ser Ser Arg Ile Glu Ala Ile Lys Ile Gln Ile Leu Ser Lys Leu
 50 55 60

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

Leu Pro Lys Ala Pro Pro Leu Arg Glu Leu Ile Asp Gln Tyr Asp Val
 85 90 95

Gln Arg Asp Asp Ser Ser Asp Gly Ser Leu Glu Asp Asp Asp Tyr His
 100 105 110

Ala Thr Thr Glu Thr Ile Ile Thr Met Pro Thr Glu Ser Asp Phe Leu
 115 120 125

Met Gln Val Asp Gly Lys Pro Lys Cys Cys Phe Phe Lys Phe Ser Ser
 130 135 140

Lys Ile Gln Tyr Asn Lys Val Val Lys Ala Gln Leu Trp Ile Tyr Leu
 145 150 155 160

Arg Pro Val Glu Thr Pro Thr Thr Val Phe Val Gln Ile Leu Arg Leu
 165 170 175

Ile Lys Pro Met Lys Asp Gly Thr Arg Tyr Thr Gly Ile Arg Ser Leu
 180 185 190

Lys Leu Asp Met Asn Pro Gly Thr Gly Ile Trp Gln Ser Ile Asp Val
 195 200 205

Lys Thr Val Leu Gln Asn Trp Leu Lys Gln Pro Glu Ser Asn Leu Gly
 210 215 220

Ile Glu Ile Lys Ala Leu Asp Glu Asn Gly His Asp Leu Ala Val Thr
 225 230 235 240

Phe Pro Gly Pro Gly Glu Asp Gly Leu Asn Pro Phe Leu Glu Val Lys
 245 250 255

Val Thr Asp Thr Pro Lys Arg Ser Arg Arg Asp Phe Gly Leu Asp Cys

ES 2 514 518 T3

	260		265		270
	Asp Glu His Ser Thr Glu Ser Arg Cys Cys Arg Tyr Pro Leu Thr Val				
	275		280		285
	Asp Phe Glu Ala Phe Gly Trp Asp Trp Ile Ile Ala Pro Lys Arg Tyr				
	290		295		300
	Lys Ala Asn Tyr Cys Ser Gly Glu Cys Glu Phe Val Phe Leu Gln Lys				
	305		310		315
	Tyr Pro His Thr His Leu Val His Gln Ala Asn Pro Arg Gly Ser Ala				
		325		330	335
	Gly Pro Cys Cys Thr Pro Thr Lys Met Ser Pro Ile Asn Met Leu Tyr				
		340		345	350
	Phe Asn Gly Lys Glu Gln Ile Ile Tyr Gly Lys Ile Pro Ala Met Val				
		355		360	365
	Val Asp Arg Cys Gly Cys Ser				
	370		375		

5 <210> 3
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 3
 gattttggtc ttgactgt 18

15 <210> 4
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 4

Asp Phe Gly Leu Asp Cys
 1 5

20 <210> 5
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

25 <400> 5
 ttgaagctt ttgatggga ttgattatc gctcctaaaa gatat 45

30 <210> 6
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 514 518 T3

<400> 6

Phe Glu Ala Phe Gly Trp Asp Trp Ile Ile Ala Pro Lys Arg Tyr
 1 5 10 15

5 <210> 7
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 7
 ttgtatttt tacaaaaata tcctcact catctggtac accaa 45

15 <210> 8
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 8

Phe Val Phe Leu Gln Lys Tyr Pro His Thr His Leu Val His Gln
 1 5 10 15

20 <210> 9
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

25 <400> 9
 tgctctggag agtggaatt tgtatt 27

30 <210> 10
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

35 <400> 10

Cys Ser Gly Glu Cys Glu Phe Val Phe
 1 5

40 <210> 11
 <211> 75
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

45 <400> 11

tggtattatcg ctccataaaag atataaggcc aattactgct ctggagagtg tgaatttgta 60

tttttacaaa aatat 75

50 <210> 12
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 12

ES 2 514 518 T3

Trp Ile Ile Ala Pro Lys Arg Tyr Lys Ala Asn Tyr Cys Ser Gly Glu
1 5 10 15

Cys Glu Phe Val Phe Leu Gln Lys Tyr
 20 25

5 <210> 13
<211> 360
<212> ADN
<213> *Mus musculus*

<400> 13

caggttcagc	tccagcagtc	tggggctgag	ctggcaagac	ctggggcttc	agtgaagttg	60
tcttgcaagg	cttctggcta	cacctttact	agctactgga	tgcagtggtt	aaaacagagg	120
cctggacagg	gtctggaatg	gattggggct	atztatcctg	gagatggtga	tactaggtac	180
actcagaagt	tcaagggcaa	ggccacattg	actgcagata	aatcctccag	cacagcctac	240
atgcaactca	gcagcttggc	atctgaggac	tctgcggtct	attactgtgc	aagaatgggt	300
ggttacgacc	ggtactactt	tgactactgg	ggccaaggca	ccactctcac	agtctctca	360

10

15 <210> 14
<211> 120
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 14

ES 2 514 518 T3

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

5 <210> 15
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

<400> 15

	gacattgtga	tgacacagtc	tccatcctcc	ctggctatgt	cagtaggaca	gaaggtcact	60
	atgagctgca	agtccagtca	gagcctttta	aatagtgcc	atcaaaagaa	ctatttgcc	120
	tggtaccagc	agaaaccagg	acagtctcct	aaacttctgg	tatactttgc	atocactagg	180
	gaatctgggg	tccctgatcg	cttcataggc	agtggatctg	ggacagattt	cactcttacc	240
	atcagcagtg	tcgaggctga	agacctggca	gattacttct	gtcagcaaca	ttataacact	300
10	ccgctcacgt	tcggtgctgg	gaccaagctg	gagctgaaa			339

15 <210> 16
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 16

ES 2 514 518 T3

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

Gln Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30

Ala Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

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

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

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln
 85 90 95

His Tyr Asn Thr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
 100 105 110

Lys

<210> 17
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 17

ES 2 514 518 T3

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Trp Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Thr Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Met Gly Gly Tyr Asp Arg Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 18
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 18

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30

10

ES 2 514 518 T3

Ala Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Phe Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95

His Tyr Asn Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110

Lys

5 <210> 19
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 19

10 Ser Tyr Trp Met Gln
 1 5

15 <210> 20
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 20

Ala Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Thr Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

20 <210> 21
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

25 <400> 21

Ala Arg Met Gly Gly Tyr Asp Arg Tyr Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

30 <210> 22
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

35 <400> 22

ES 2 514 518 T3

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Ala Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

5 <210> 23
<211> 7
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

10 <400> 23

Phe Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

15 <210> 24
<211> 9
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 24

20 Gln Gln His Tyr Asn Thr Pro Leu Thr
1 5

25 <210> 25
<211> 10
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 25

30 Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met Gln
1 5 10

<210> 26
<211> 9
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

35 <400> 26

Ala Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr
1 5

40 <210> 27
<211> 13
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 27

45 Ala Arg Met Gly Gly Tyr Asp Arg Tyr Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

50 <210> 28
<211> 17
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 28

ES 2 514 518 T3

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Ala Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
 1 5 10 15

Ala

5 <210> 29
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 29

10 Phe Ala Ser Thr Arg Glu Ser
 1 5

15 <210> 30
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 30

20 Gln Gln His Tyr Asn Thr Pro Leu Thr
 1 5

25 <210> 31
 <211> 348
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*
 <400> 31

gaagtgcagc tggaggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatgcca tgtcttgggt tgcagcagact 120
 ccggagaaga ggctggagtg ggtcgcaacc attagtagtg gtggtagtta cacctcctat 180
 ccagacagtg tgaagggtcg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac 240
 ctgcaaatga gcagtctgag gtctgaggac acggccatgt attactgtgc aagacaagac 300
 tatgctatga actactgggg tcaaggaacc tcagtcaccg tctctca 348

30 <210> 32
 <211> 300
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*
 35 <400> 32

gacattgaga tgaccagtc tcacaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc 60
 atcacctgca aggccagtc ggatgtgagt actgctgtag cctggatatca acagaaacca 120
 ggacaatctc ctaaactact gctttactcg gcatcctacc ggtacactgg agtccctgat 180
 cggttcactg gcagtggatc tgggacggat ttcactttca ccatcagcag tgtgcaggct 240
 gaagacctgg cagtttatta ctgtcagcaa cattatagta ctccgtggac gttcgggtgga 300

ES 2 514 518 T3

<210> 33
 <211> 351
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 33

cagggtgcagc tgggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60
 tcctgcaagg catctggata caccttcacc agctactata tgcaactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggaata atcaacccta gtggtggtag cacaagctac 180
 gcacagaagt tccagggcag agtcaccatg accagggaca cgtccacgag cacagtctac 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagacgag 300
 aactgggggt tcgaccctg gggccaggga accctggtca ccgtctcgag t 351

10

<210> 34
 <211> 315
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 34

tcctatgagc tgactcagcc accctcagtg tccgtgtctc caggacagac agccaccatt 60
 acctgctctg gacatgcact gggggacaaa tttgtttcct ggtatcagca gggatcaggc 120
 cagtcccctg tattggtcat ctatgacgat acccagcggc cctcagggat ccctgggcga 180
 ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc actctgacca tcagcgggac ccaggctatg 240
 gatgaggctg actatTTTTg tcaggcgtgg gacagcagct tcgtattcgg cggagggacc 300
 aaggtcaccg tccta 315

20

<210> 35
 <211> 1543
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

25

<400> 35

ES 2 514 518 T3

gaacatgacg ggcgccctggg tggccctcgc cctcctctgg ggatcgctgt gcgccggctc 60
 tgggcgtggg gaggtgaga cacgggagtg catctactac aacgccaaact gggagctgga 120
 gcgcaccaac cagagcggcc tggagcgctg cgaaggcgag caggacaagc ggctgcaactg 180
 ctacgcctcc tggcgcaaca gctctggcac catcgagctc gtgaagaagg gctgctggct 240
 agatgacttc aactgctacg ataggcagga gtgtgtggcc actgaggaga acccccaggt 300
 gtactttctgc tgctgtgaag gcaacttctg caacgaacgc ttcactcatt tgccagaggc 360
 tgggggcccg gaagtcacgt acgagccacc cccgacagcc cccaccctgc tcacgggtgct 420
 ggcctactca ctgctgcca tcgggggcct ttcctcatc gtctgctgg ccttttggat 480
 gtaccggcat cgcaagcccc cctacggta tgtggacatc catgaggacc ctgggcctcc 540
 accaccatcc cctctggtgg gcctgaagcc actgcagctg ctggagatca aggctcgggg 600
 gcgctttggc tgtgtctgga aggccagct catgaatgac tttgtagctg tcaagatctt 660
 cccactccag gacaagcagt cgtggcagag tgaacgggag atcttcagca cacctggcat 720
 gaagcacgag aacctgctac agttcattgc tgccgagaag cgaggctcca acctcgaagt 780
 agagctgtgg ctcatcacgg ccttccatga caagggtcc ctcacggatt acctcaaggg 840
 gaacatcatc acatggaacg aactgtgtca tgtagcagag acgatgtcac gaggcctctc 900
 atacctgcat gaggatgtgc cctggtgccg tggcgagggc cacaagcctg ctattgcccc 960
 cagggacttt aaaagtaaga atgtattgct gaagagcgcac ctcacagccg tgctggctga 1020
 ctttggcttg gctgttcgat ttgagccagg gaaacctcca ggggacacc acggacaggt 1080
 aggcacgaga cggatcatgg ctctgaggt gctcgagggg gccatcaact tccagagaga 1140
 tgccctcctg cgcattgaca tgtatgccat ggggttgggtg ctgtgggagc ttgtgtctcg 1200
 ctgcaaggct gcagacggac ccgtggatga gtacatgctg ccctttgagg aagagattgg 1260
 ccagcacctt tcgttgagg agctgcagga ggtggtggtg cacaagaaga tgaggccac 1320
 cattaagat cactggttga aacaccggg cctggcccag ctttgtgtga ccatcgagga 1380
 gtgctgggac catgatgcag aggtctgctt gtccgcgggc tgtgtggagg agcgggtgtc 1440
 cctgattcgg aggtcggta acggcactac ctccgactgt ctcgtttccc tggtgacctc 1500
 tgtcaccaat gtggacctgc ccctaaaga gtcaagcatc taa 1543

<210> 36
 <211> 512
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 36

ES 2 514 518 T3

Met Thr Ala Pro Trp Val Ala Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu Cys
 1 5 10 15

Ala Gly Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr
 20 25 30

Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg
 35 40 45

Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg
 50 55 60

Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp
 65 70 75 80

Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn
 85 90 95

Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg
 100 105 110

Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro
 115 120 125

Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr Ser Leu Leu
 130 135 140

Pro Ile Gly Gly Leu Ser Leu Ile Val Leu Leu Ala Phe Trp Met Tyr
 145 150 155 160

Arg His Arg Lys Pro Pro Tyr Gly His Val Asp Ile His Glu Asp Pro
 165 170 175

Gly Pro Pro Pro Pro Ser Pro Leu Val Gly Leu Lys Pro Leu Gln Leu
 180 185 190

Leu Glu Ile Lys Ala Arg Gly Arg Phe Gly Cys Val Trp Lys Ala Gln
 195 200 205

Leu Met Asn Asp Phe Val Ala Val Lys Ile Phe Pro Leu Gln Asp Lys
 210 215 220

ES 2 514 518 T3

Gln Ser Trp Gln Ser Glu Arg Glu Ile Phe Ser Thr Pro Gly Met Lys
 225 230 235 240

His Glu Asn Leu Leu Gln Phe Ile Ala Ala Glu Lys Arg Gly Ser Asn
 245 250 255

Leu Glu Val Glu Leu Trp Leu Ile Thr Ala Phe His Asp Lys Gly Ser
 260 265 270

Leu Thr Asp Tyr Leu Lys Gly Asn Ile Ile Thr Trp Asn Glu Leu Cys
 275 280 285

His Val Ala Glu Thr Met Ser Arg Gly Leu Ser Tyr Leu His Glu Asp
 290 295 300

Val Pro Trp Cys Arg Gly Glu Gly His Lys Pro Ser Ile Ala His Arg
 305 310 315 320

Asp Phe Lys Ser Lys Asn Val Leu Leu Lys Ser Asp Leu Thr Ala Val
 325 330 335

Leu Ala Asp Phe Gly Leu Ala Val Arg Phe Glu Pro Gly Lys Pro Pro
 340 345 350

Gly Asp Thr His Gly Gln Val Gly Thr Arg Arg Tyr Met Ala Pro Glu
 355 360 365

Val Leu Glu Gly Ala Ile Asn Phe Gln Arg Asp Ala Phe Leu Arg Ile
 370 375 380

Asp Met Tyr Ala Met Gly Leu Val Leu Trp Glu Leu Val Ser Arg Cys
 385 390 395 400

Lys Ala Ala Asp Gly Pro Val Asp Glu Tyr Met Leu Pro Phe Glu Glu
 405 410 415

Glu Ile Gly Gln His Pro Ser Leu Glu Glu Leu Gln Glu Val Val Val
 420 425 430

His Lys Lys Met Arg Pro Thr Ile Lys Asp His Trp Leu Lys His Pro
 435 440 445

Gly Leu Ala Gln Leu Cys Val Thr Ile Glu Glu Cys Trp Asp His Asp
 450 455 460

Ala Glu Ala Arg Leu Ser Ala Gly Cys Val Glu Glu Arg Val Ser Leu

ES 2 514 518 T3

465 470 475 480

Ile Arg Arg Ser Val Asn Gly Thr Thr Ser Asp Cys Leu Val Ser Leu
 485 490 495

Val Thr Ser Val Thr Asn Val Asp Leu Pro Pro Lys Glu Ser Ser Ile
 500 505 510

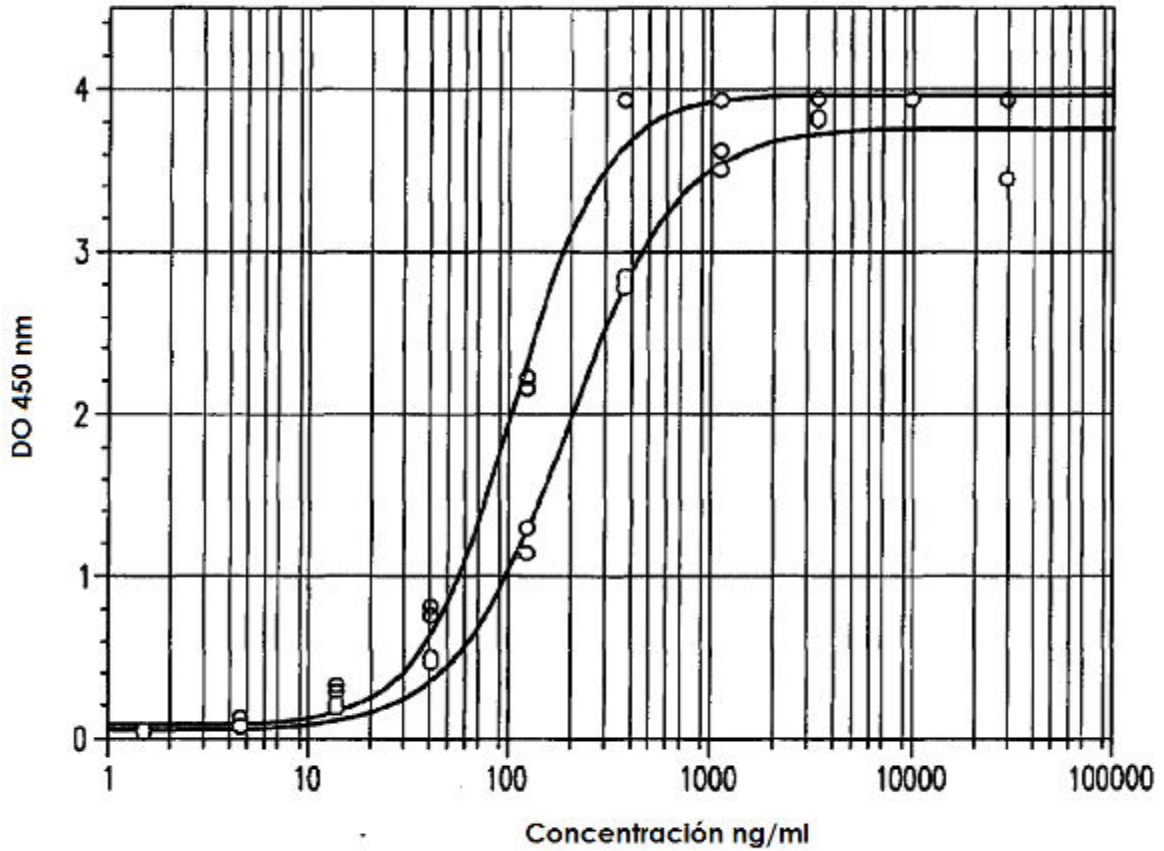
REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-GDF8 o proteína de unión a antígeno que se une específicamente a GDF8 y que no se une específicamente a BMP11 que comprende:
 - 5 una región variable pesada (VH) de anticuerpo que comprende la primera, segunda y tercera región determinante de la complementariedad (CDR) de la región VH definida por la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 14 o SEC ID N°: 17; y una región variable ligera (VL) de anticuerpo que comprende la primera, segunda y tercera CDR de la región VL definida por la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 16 o SEC ID N°: 18 en el que las CDR se definen usando el esquema de numeración de Kabat o el esquema de numeración de AcM.
- 10 2. Un anticuerpo anti-GDF8 o proteína de unión a antígeno que se une específicamente a GDF8 y que no se une específicamente a BMP11 que comprende:
 - 15 - una cadena pesada que comprende una primera, segunda y tercera región determinante de la complementariedad (CDR), en la que la primera CDR comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID N°: 19 o SEC ID N°: 25; en la que la segunda CDR comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID N°: 20 o SEC ID N°: 26, y en la que la tercera CDR comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID N°: 21 o SEC ID N°: 27, y
 - una cadena ligera que comprende una primera, segunda y tercera CDR, en la que la primera CDR comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID N°: 22 o SEC ID N°: 28; en la que la segunda CDR comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID N°: 23 o SEC ID N°: 29, y en la que la tercera CDR comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID N°: 24 o SEC ID N°: 30.
- 20 3. El anticuerpo anti-GDF8 o proteína de unión a antígeno de la reivindicación 1 o 2, en el que dicha cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 14; y la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 17.
- 25 4. El anticuerpo anti-GDF8 o proteína de unión a antígeno de la reivindicación 1 o 2, en el que dicha cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 16; y la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 18.
5. El anticuerpo anti-GDF8 o proteína de unión a antígeno de la reivindicación 1 o 2, en el que dicha cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 16; y dicha cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 14.
- 30 6. El anticuerpo anti-GDF8 o proteína de unión a antígeno de la reivindicación 1 o 2, en el que dicha cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 18; y en el que el anticuerpo comprende además una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 17.
7. Un anticuerpo anti-GDF8 o proteína de unión a antígeno que se une específicamente a GDF8 y que no se une específicamente a BMP11, en el que dicho anticuerpo o proteína de unión a antígeno se une a un epítipo seleccionado de SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 8, SEC ID N°: 10 y SEC ID N°: 12.
- 35 8. El anticuerpo anti-GDF8 o proteína de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicha cadena ligera comprende un dominio constante de cadena ligera kappa o lambda.
9. El anticuerpo anti-GDF8 o proteína de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicha cadena pesada comprende un dominio constante pesado seleccionado del grupo que consiste en dominios constantes pesados de IgA, IgE, IgD, IgG e IgM.
- 40 10. El anticuerpo anti-GDF8 o proteína de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicha cadena pesada está mutada para alterar una función efectora de dominio constante pesado.
11. El anticuerpo anti-GDF8 o proteína de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dicho anticuerpo anti-GDF8 o proteína de unión a antígeno está parcial o totalmente humanizada.
- 45 12. El anticuerpo anti-GDF8 o proteína de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que dicho anticuerpo anti-GDF8 o proteína de unión a antígeno inhibe específicamente la señalización por GDF8 pero no por BMP11.
13. Un polinucleótido que codifica el anticuerpo anti-GDF8 o proteína de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.
- 50 14. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 13, en el que dicho polinucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico de SEC ID N°: 13 o SEC ID N°: 15.
15. Un polinucleótido que se hibrida en condiciones rigurosas con el polinucleótido de la reivindicación 14 o con su complementario.

16. Un vector que comprende el polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en el que el polinucleótido se une operativamente a una secuencia reguladora.
17. Una célula hospedadora que comprende el vector de la reivindicación 16.
- 5 18. Un procedimiento de producción de un anticuerpo anti-GDF8 o proteína de unión a antígeno que comprende el cultivo de la célula hospedadora de la reivindicación 17, y el aislamiento del anticuerpo anti-GDF8 o proteína de unión a antígeno que expresa dicha célula hospedadora.
19. El anticuerpo anti-GDF8 o proteína de unión a antígeno aislados producidos por el procedimiento de la reivindicación 18.
- 10 20. Un anticuerpo anti-GDF8 o proteína de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para su uso en el tratamiento de distrofia muscular, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), sarcopenia, caquexia, desgaste muscular, atrofia muscular, fragilidad, distrofia muscular pseudohipertrófica, distrofia muscular facioescapulohumeral, distrofia muscular de la cintura, distrofia muscular de Duchenne, distrofia muscular de Becker, distrofia muscular de Emery Dreifuss, síndrome de espina rígida, síndrome de Ullrich, distrofia muscular de Fukuyama, síndrome de Walker Warberg, enfermedad muscular óculocerebral, distrofia muscular congénita, distrofia miotónica (Enfermedad de Steinart), enfermedad de Gower, trastorno de tejido adiposo, obesidad, un trastorno metabólico, diabetes, prediabetes, tolerancia alterada a glucosa, dislipidemia, síndrome metabólico, insulinoresistencia inducida por traumatismo, trastorno de pérdida ósea, osteoporosis, osteoporosis inducida por glucocorticoides, osteopenia, artritis, fracturas relacionadas con osteoporosis, pérdida de hueso producida por terapia crónica con glucocorticoides, pérdida ósea producida por disfunción gonadal prematura, pérdida ósea producida por supresión de andrógenos, pérdida ósea producida por déficit de vitamina D, pérdida ósea producida por hiperparatiroidismo secundario, pérdida ósea producida por déficits nutricionales y pérdida ósea producida por anorexia nerviosa.
- 15 20 21. El anticuerpo anti-GDF8 o proteína de unión a antígeno de la reivindicación 20 para su uso en el tratamiento de distrofia muscular de Duchenne.

25

ELISA DE UNIÓN A GDF8 SA/BIO

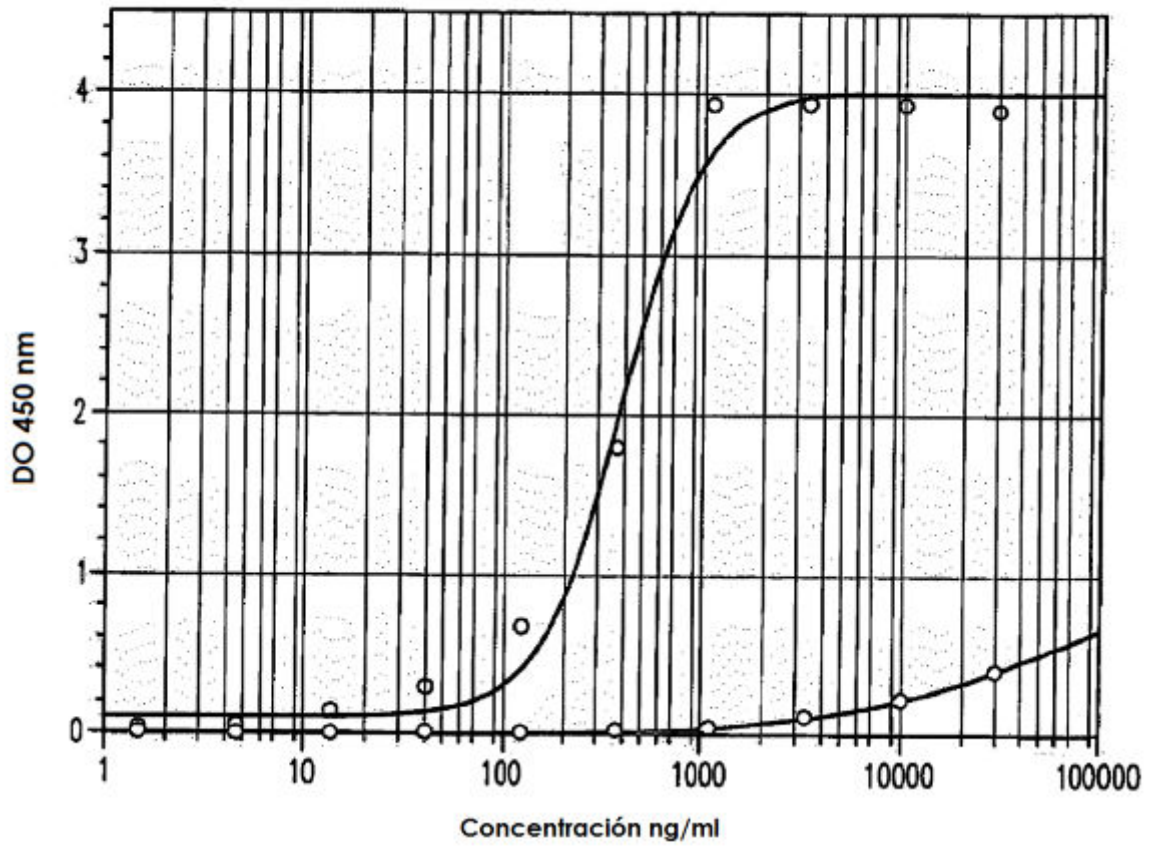


$$y = \frac{(A-D)}{(1+(x/C)^B)} + D$$

	<u>A</u>	<u>E</u>	<u>C</u>	<u>D</u>	<u>R²</u>
○ Gráfica nº 1 (RK22: Concentración frente a valores)	0,052	1,57	192,742	3,771	0,994
○ Gráfica nº 2 (RK35B2: Concentración frente a valores)	0,078	1,835	104,592	3,986	0,996

FIG. 1A

ELISA BMP11 SA/BIO



$$y = \frac{(A-D)}{1+(x/C)^B} + D$$

	<u>A</u>	<u>E</u>	<u>C</u>	<u>D</u>	<u>R²</u>
○ Gráfica nº 1 (RK22: Concentración frente a valor medio)	-0,006	0,787	61236,5	1,104	0,999
○ Gráfica nº 2 (RK35B2: Concentración frente a valor medio)	0,104	2,214	386,743	4,003	0,993

FIG. 1B

Constantes de velocidad cinética de la interacción entre el anticuerpo RK-22 y GDF-8

		Modelo Langmuir (análisis global)									
Anticuerpo	Nº de lote	Actividad (%)	ka1 (1/MS)	kd1(1/s)	KA1 (1/M)	Kd (M)	Kd (nM)	Rmáx	Chi2		
71 UR (2.6.03)	PK1901	82,54	1,47E+05	5,72E-04	2,58E+08	3,88E-09	3,88	44,00	7,47		
45 UR (4.30.03)	PK1901	82,54	4,61E+04	6,33E-04	7,28E+07	1,37E-08	13,70	84,00	2,12		
42.4 UR (6.14.03)	PK1901	82,54	1,56E+05	4,82E-04	3,24E+08	3,09E-09	3,00	39,4	3,67		
Promedio de tres experimentos independientes			1,16E+05	5,62E-04	2,18E+08	6,89E-09	7				
		Modelo bivalente (análisis global)									
Anticuerpo	Nº de lote	Actividad (%)	ka1 (1/MS)	kd1(1/s)	KA1 (1/M)	Kd (M)	KD (nM)	Rmáx	Chi2		
71 UR (2.6.03)	PK1901	82,54	8,36E+04	7,80E-04	1,07E+08	9,33E-09	9,33	53,00	0,84		
45 UR (4.30.03)	PK1901	82,54	2,31E+04	6,30E-04	3,67E+07	2,73E-08	27,00	84,00	1,29		
42.4 UR (6.14.03)	PK1901	82,54	7,81E+04	7,14E-04	1,09E+08	9,14E-09	9,00	49,2	0,299		
Promedio de tres experimentos independientes			6,16E+04	7,08E-04	8,44E+07	1,52E-08	15				

FIG.2

Ensayo con gen indicador
 Los Ig RK de hibridomas purificados
 inhiben la señalización de GDF-8 *in vitro*

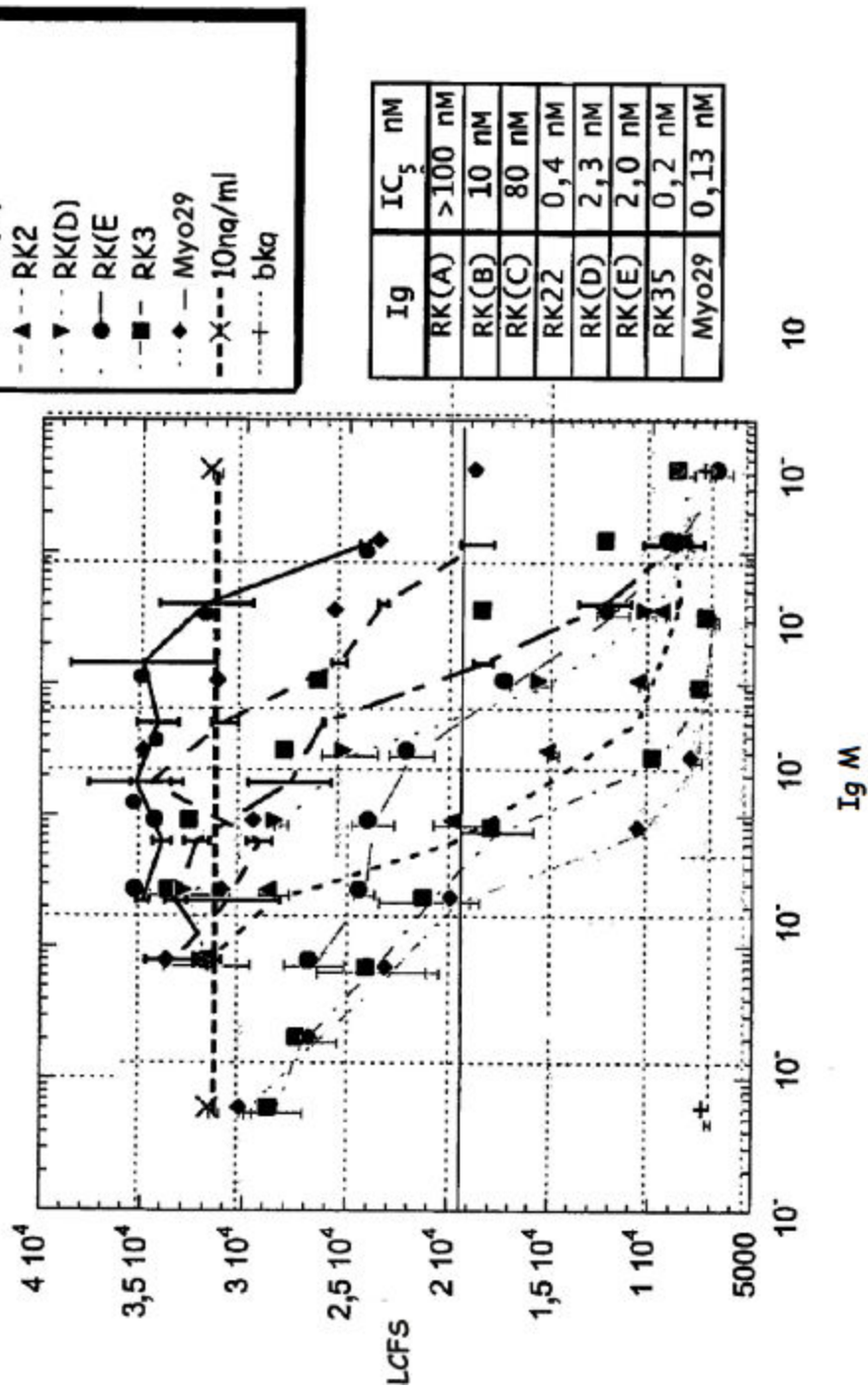


Figura 3

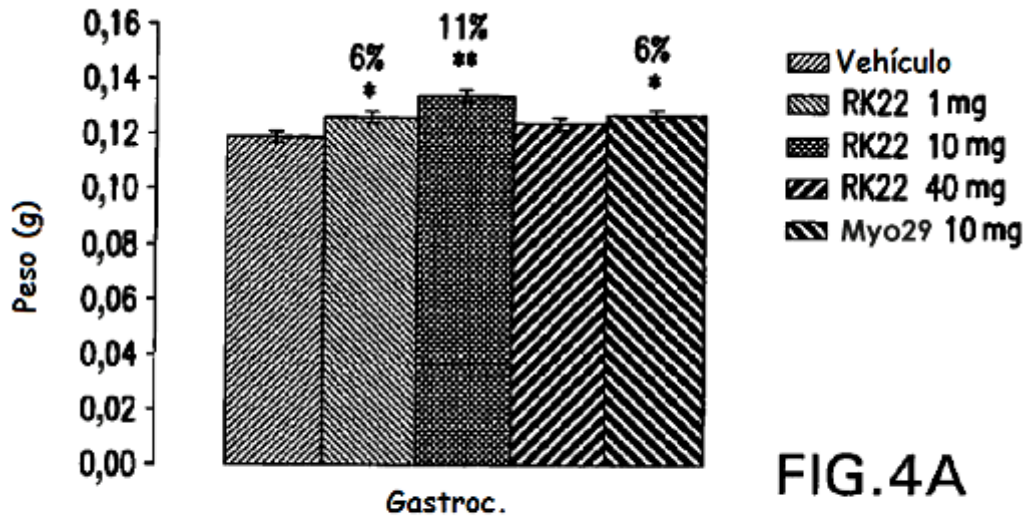


FIG.4A

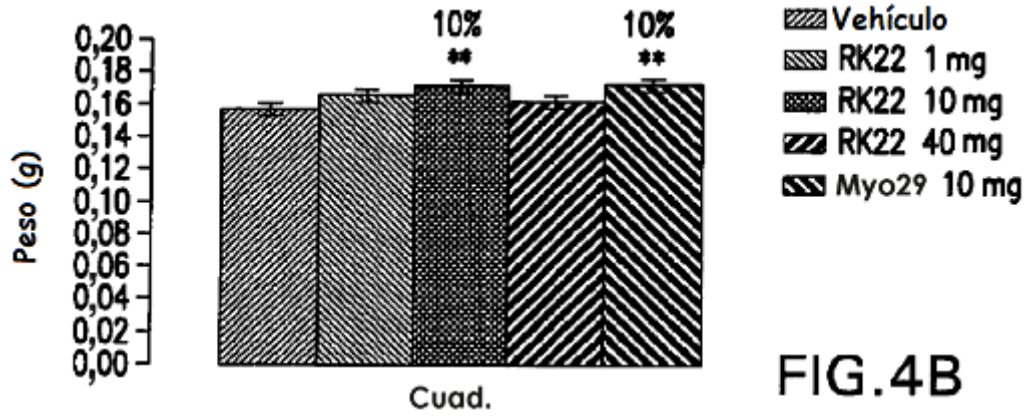


FIG.4B

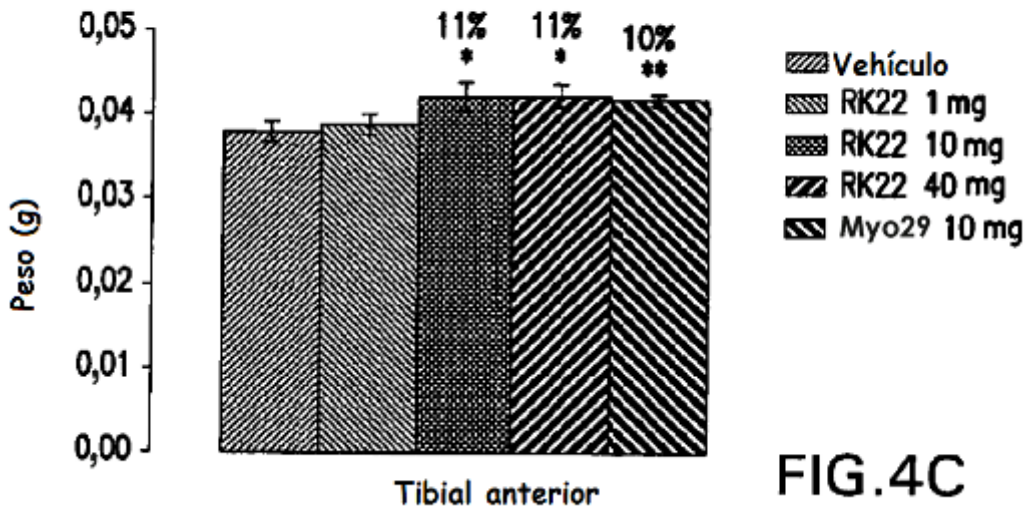


FIG.4C

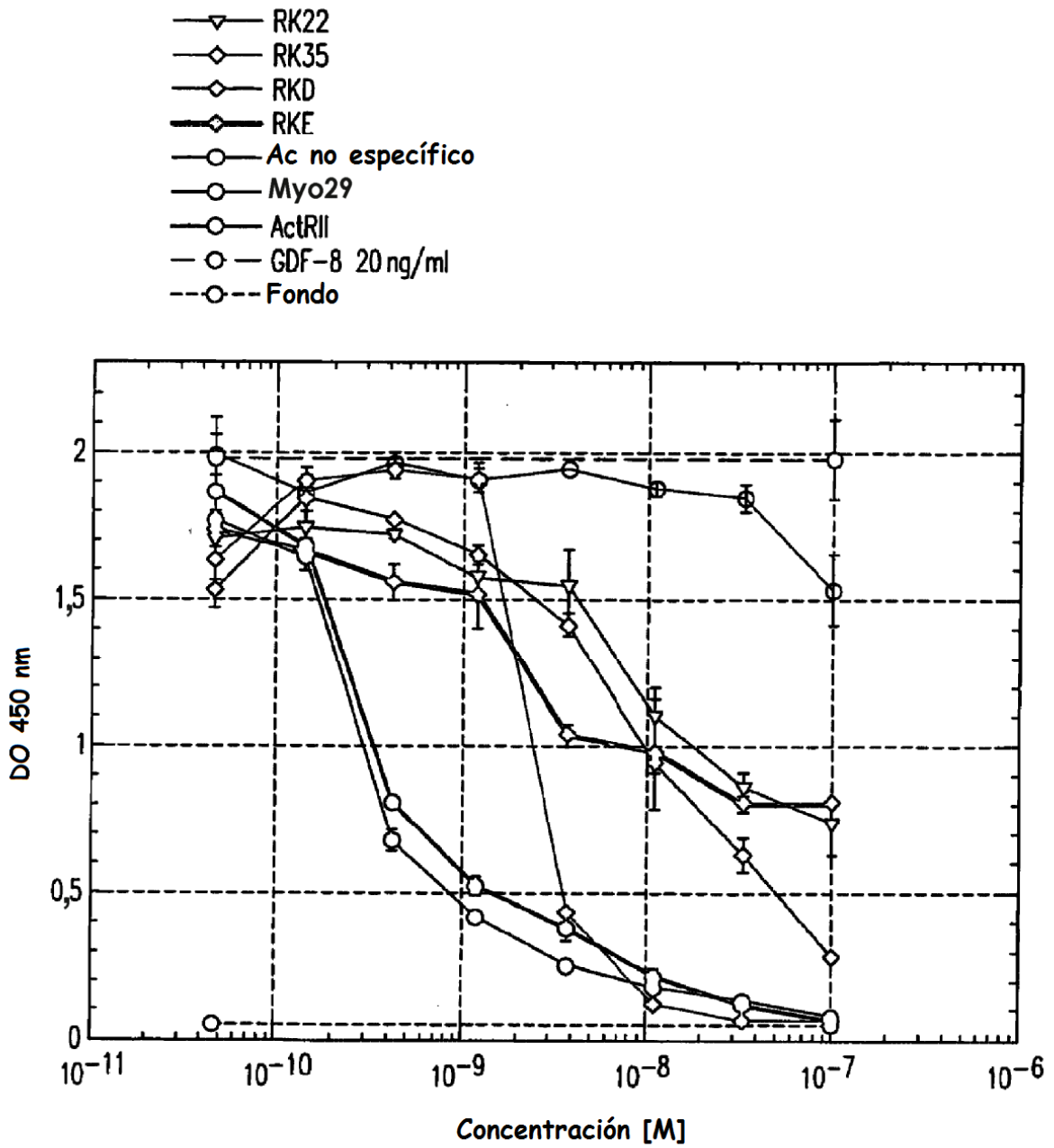


FIG.5

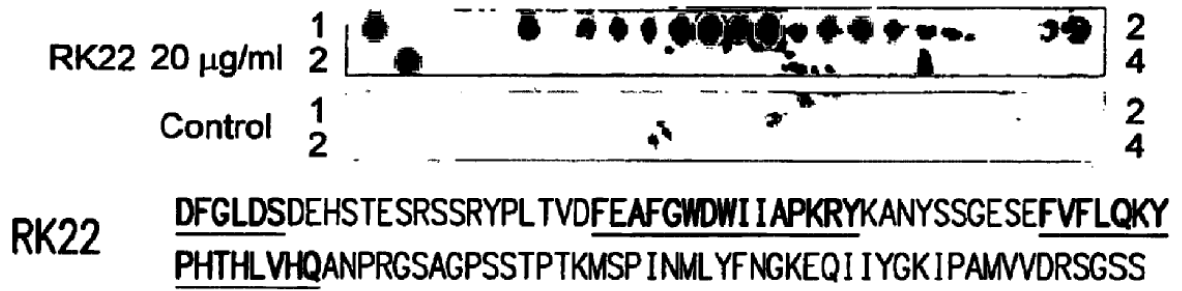


FIG.6

Porcentaje de identidad con mRK22: DP-7=71,43
 DP-5=65,306

DP-5_1germ_VH	QVQLVQSGAE	VKKPGASVKV	SCKVSGYTLT	ELSMH	WVRQA	PGKLEWMG
DP-7_1germ_VH	QVQLVQSGAE	VKKPGASVKV	SCKASGYTFT	SYMH	WVRQA	PGQGLEWMI
RK22_VH	QVQLQDSGAE	LARPGASVKL	SCKASGYTFT	SYWQ	WVKQR	PGQGLEWIGA
DP-5_1germ_VH	FDPEGETIY	AQKFGQRTM	TEDTSDTAY	MELSSL	RSED	TAVYYCAT~~
DP-7_1germ_VH	INPSGGTSY	AQKFGQRTM	TRDTSITVY	MELSSL	RSED	TAVYYCAR~~
RK22_VH	IYPGDGTRY	TQKFKGKATL	TADKSSSTAY	QLSSL	ASED	SAVYYCARMG
DP-5_1germ_VH	~~~~~	~~~~~V~~~~				
DP-7_1germ_VH	~~~~~	~~~~~V~~~~				
RK22_VH	<u>GYDRYFDY</u> W	GQGTTLTVSS				

Los aminoácidos en las regiones marco conservadas (FW) que son diferentes en los clones de ratón y de ser humano se destacan en negrita.

Las regiones CDR se indican subrayadas.

Sustituciones de 20 aa en las regiones marco conservadas de VH de RK 22 humanizada basadas en FW DP-5.

Sustituciones de 19 aa en las regiones marco conservadas de VH de RK 22 humanizada basadas en FW DP-7.

Sustituciones de 19 aa en las regiones marco conservadas.

Sustituciones de 20 aa en FW DP-5

FIG.7

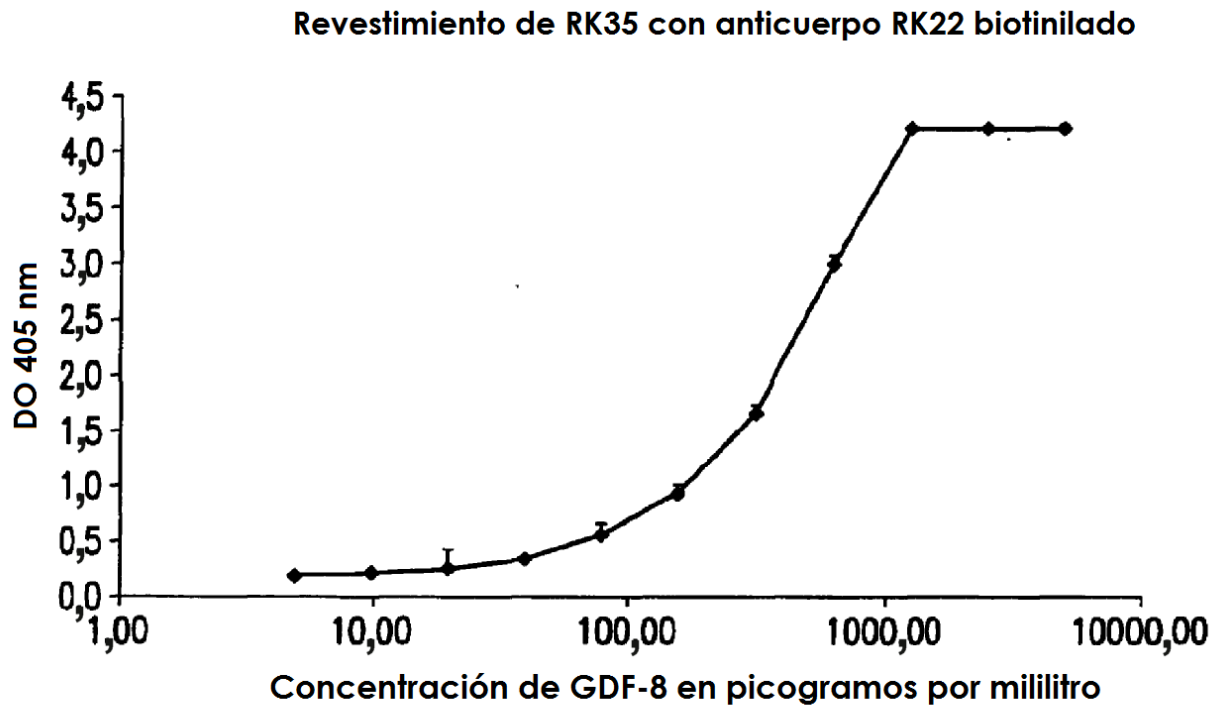


FIG.9A

Revestimiento de RK22 con RK35 biotinilado

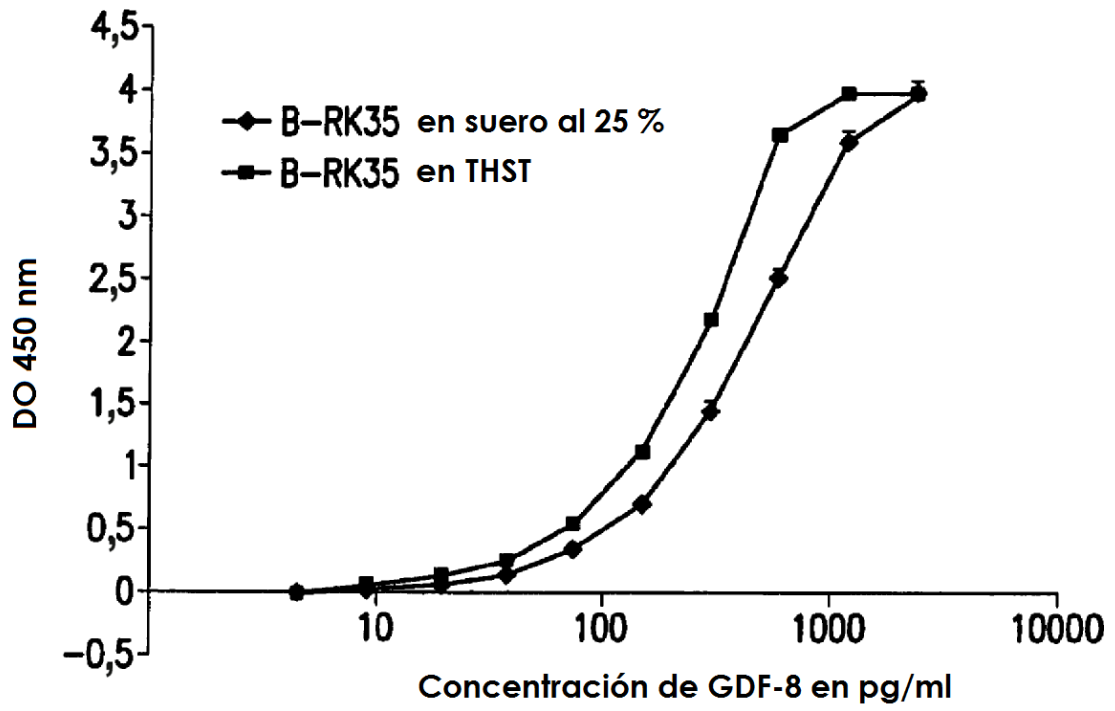


FIG.9B

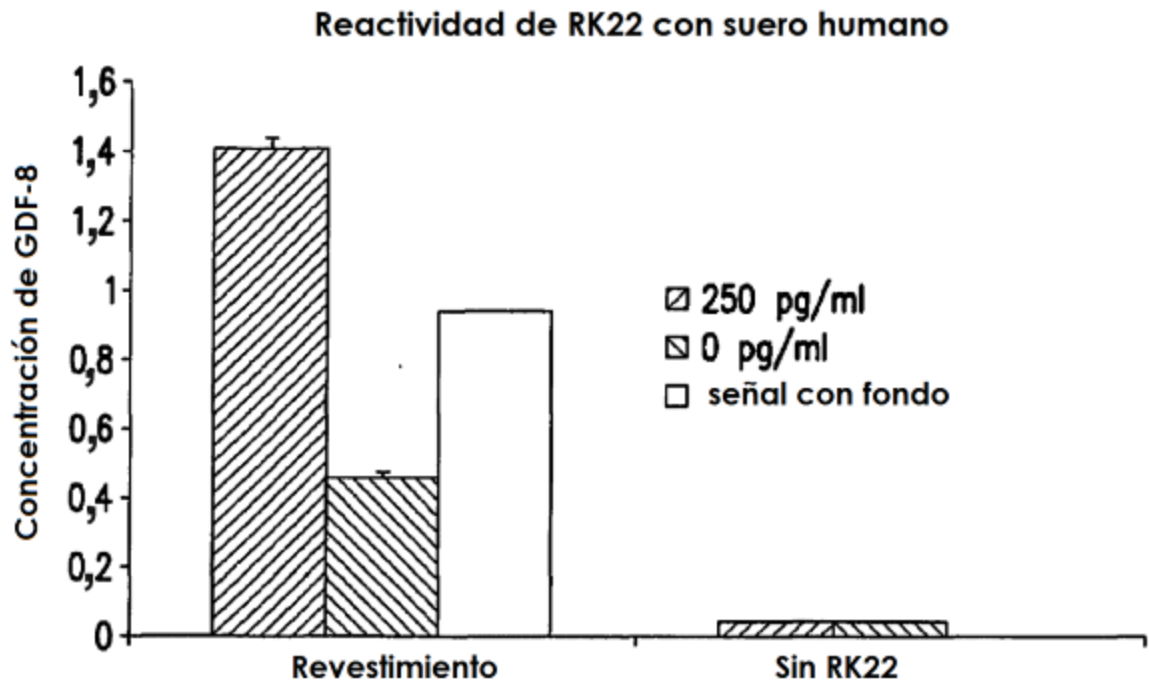


FIG.10

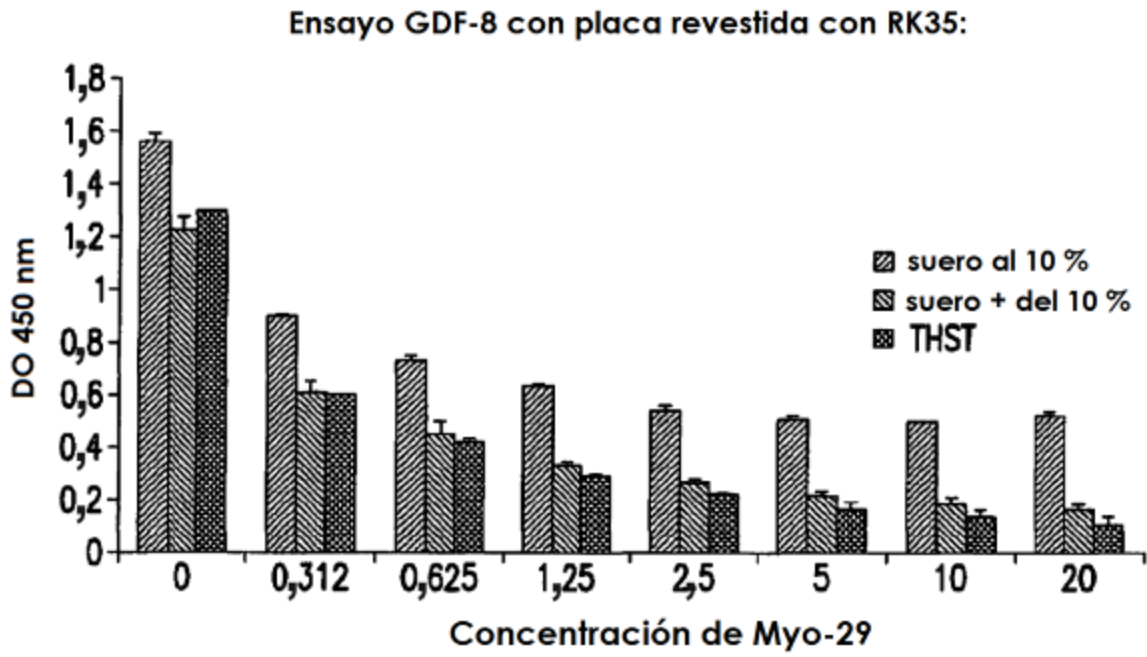


FIG.11

Interferencia de Myo29 con RK22 o RK35.

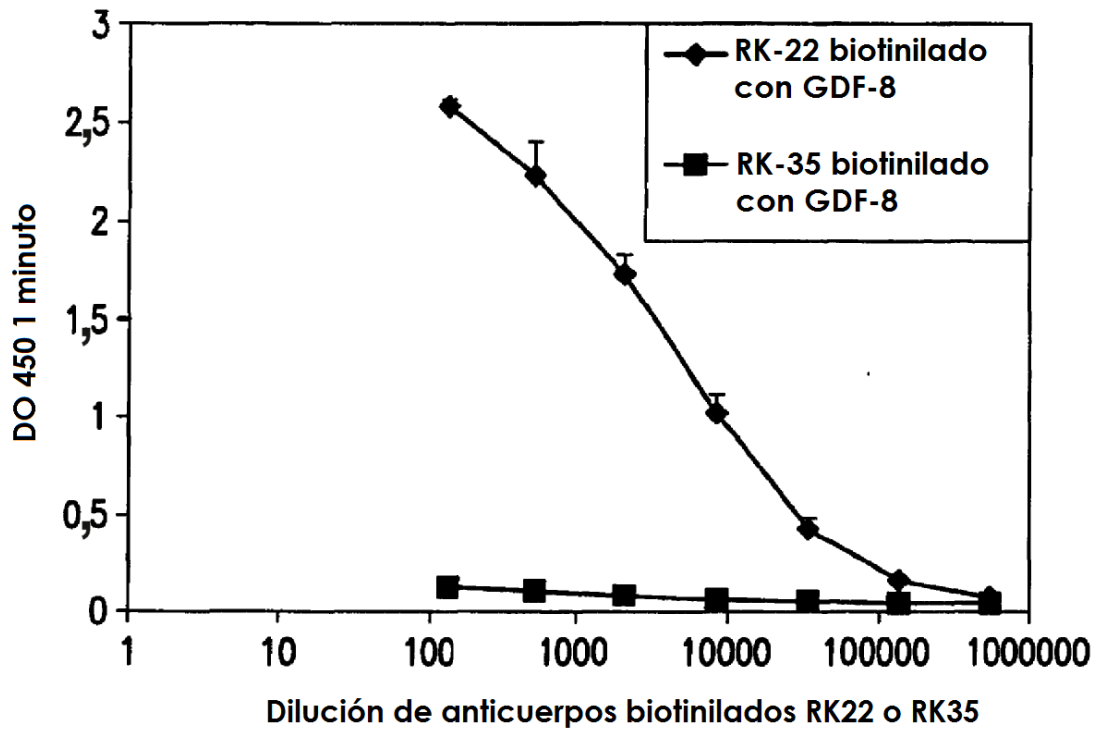


FIG.12

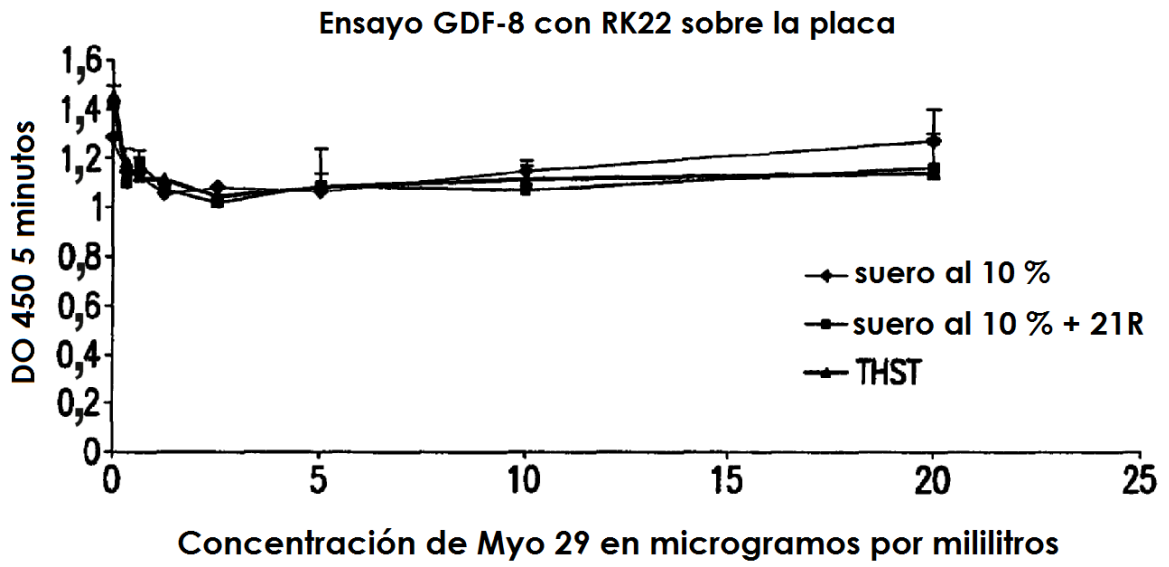


FIG.13A

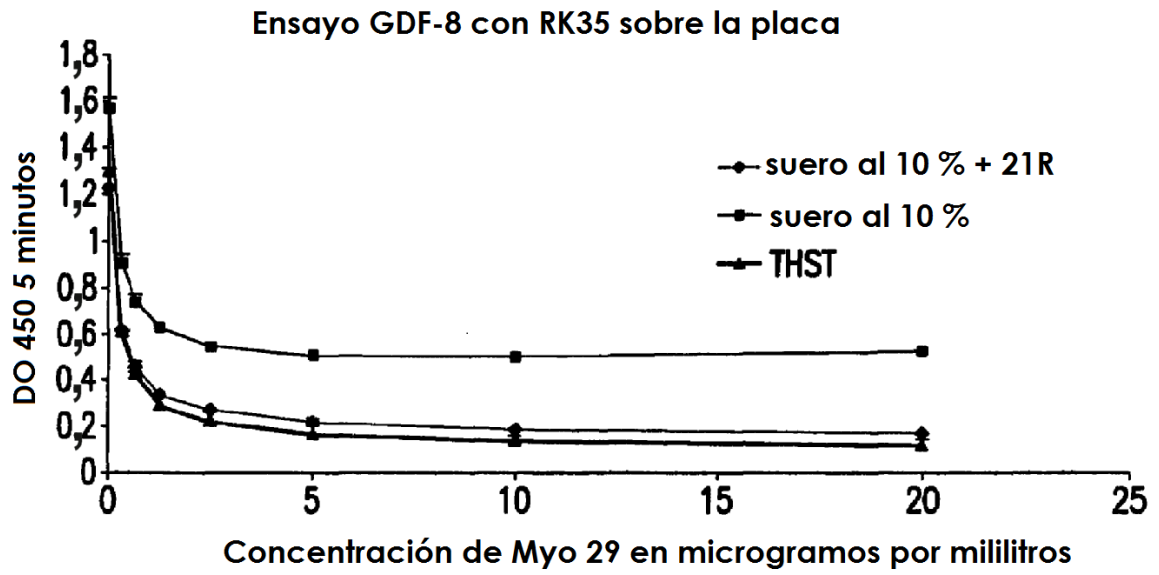


FIG. 13B

- ▨ Adición 0
- ▩ Adición 0 + 20 µg/ml de Myo29
- Adición de 100 pg/ml
- ▤ Adición de 100 + 20 µg/ml de Myo29
- ▧ Adición de 300 pg/ml
- ▥ Adición de 300 pg/ml + 20 µg/ml de Myo29
- ▦ Adición de 600 pg
- ▧ Adición de 600 pg/ml + 20 µg/ml de Myo29

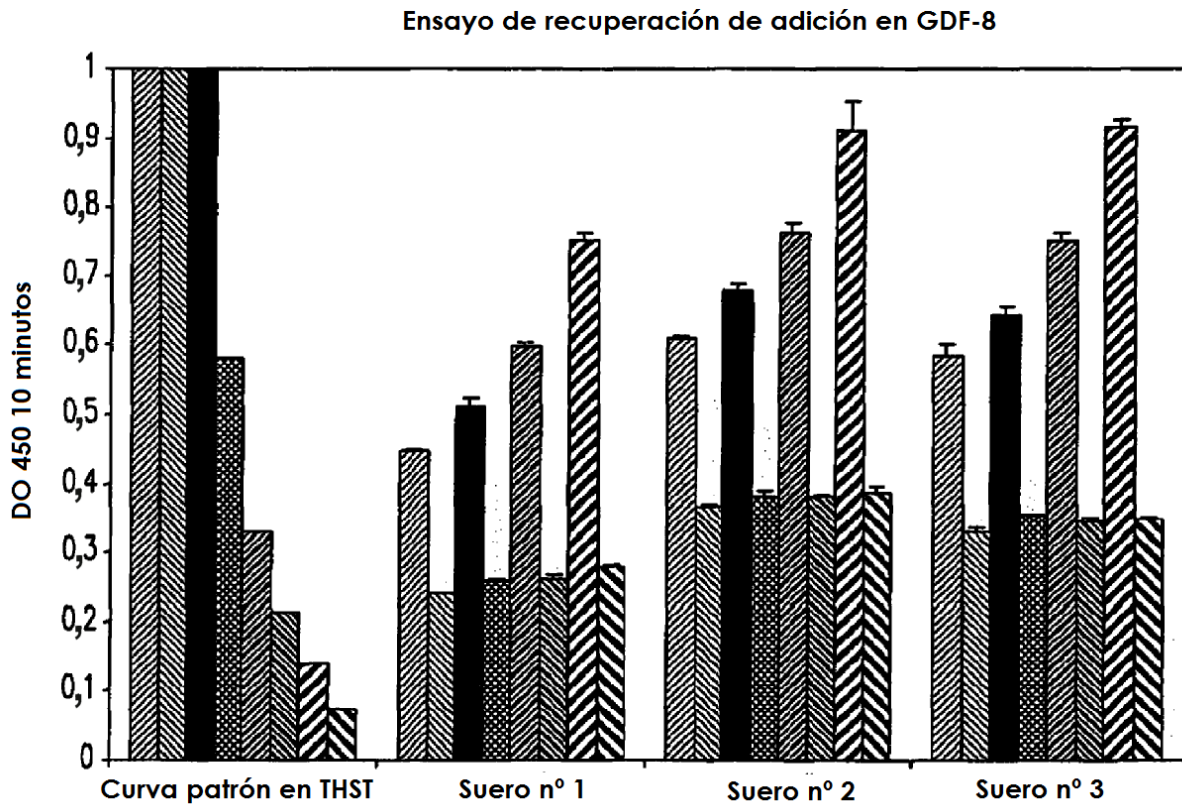


FIG.14A

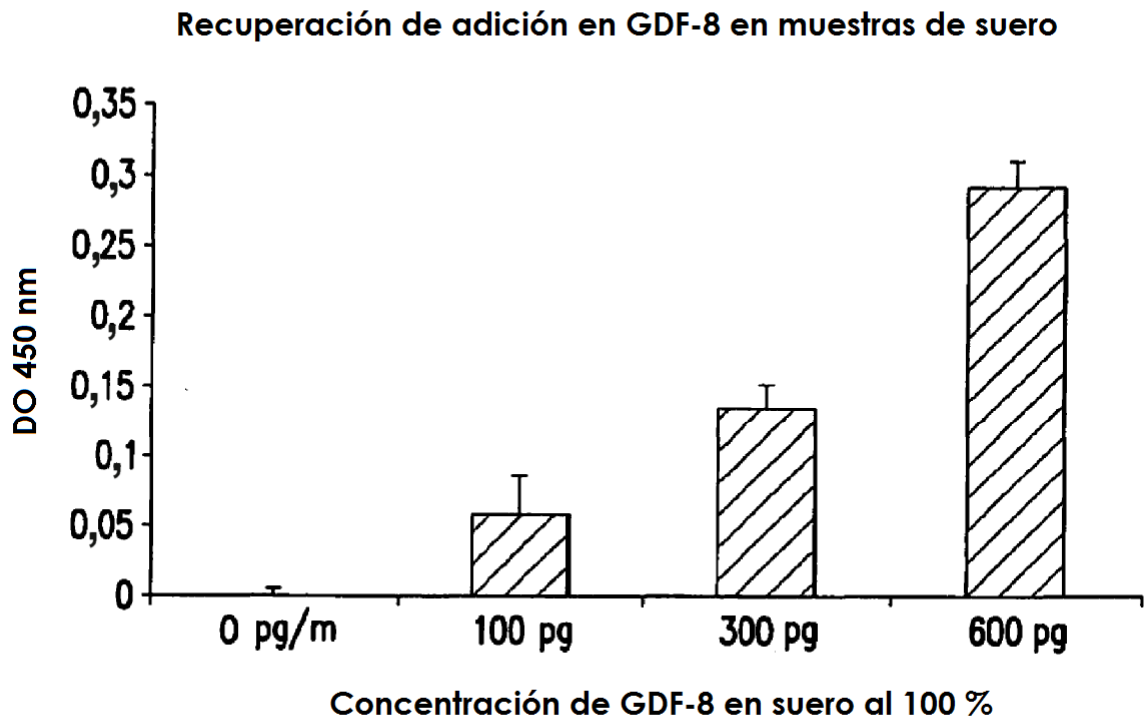


FIG. 14B

Curvas patrón con GDF-8 añadido en suero de ratón y de ser humano al 10 %

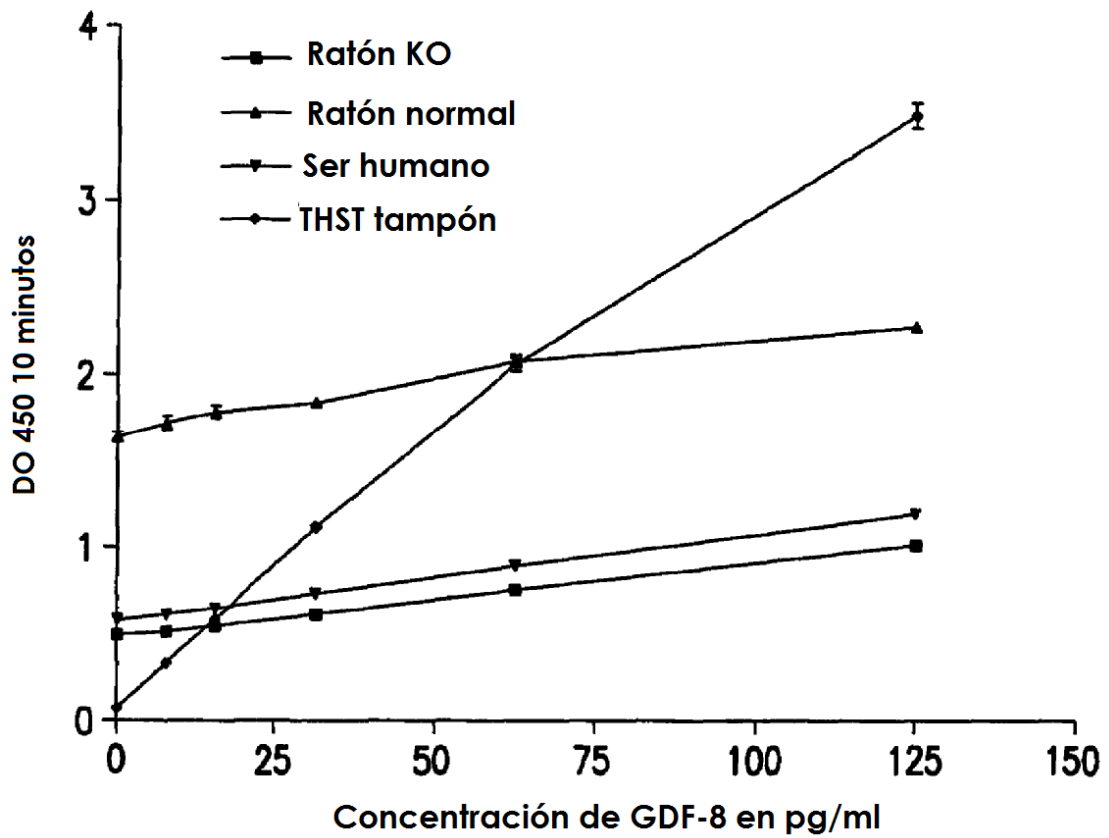


FIG.15

Valores observados frente a esperados
en muestras de suero añadidas en THST

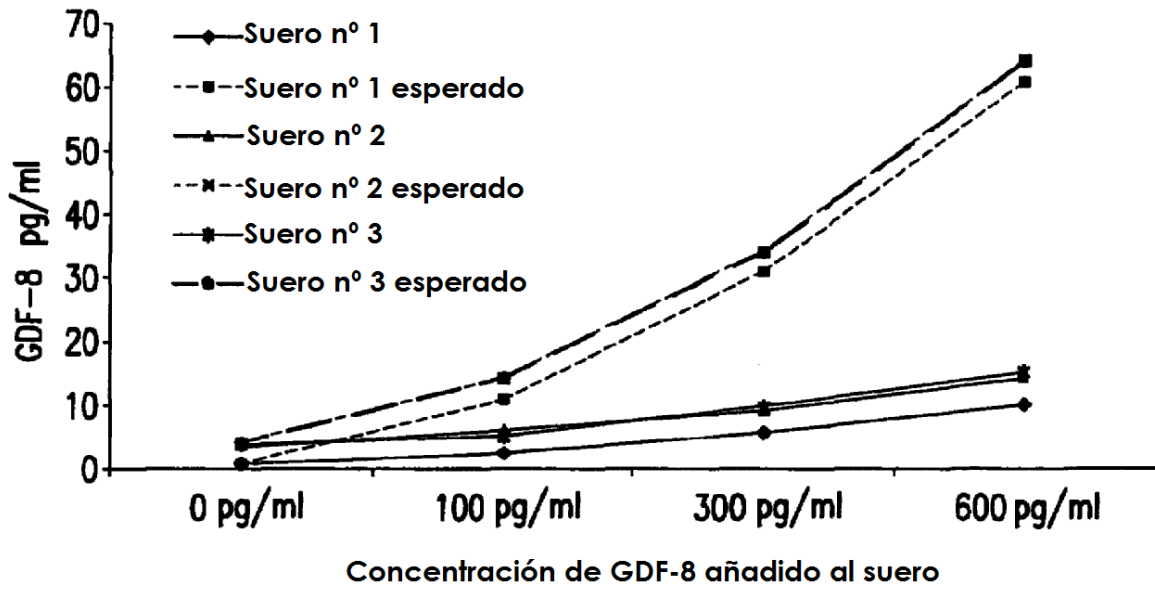


FIG.16

Efectos del calentamiento a 80 °C en ensayo GDF-8 con Myo-29

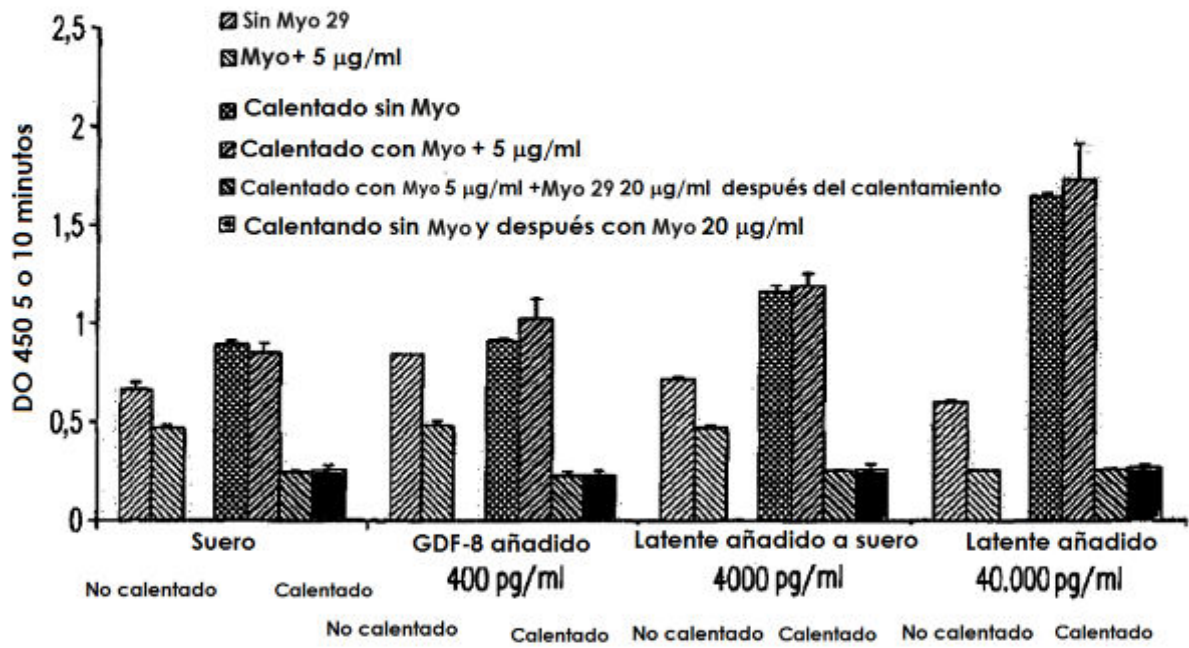


FIG.17

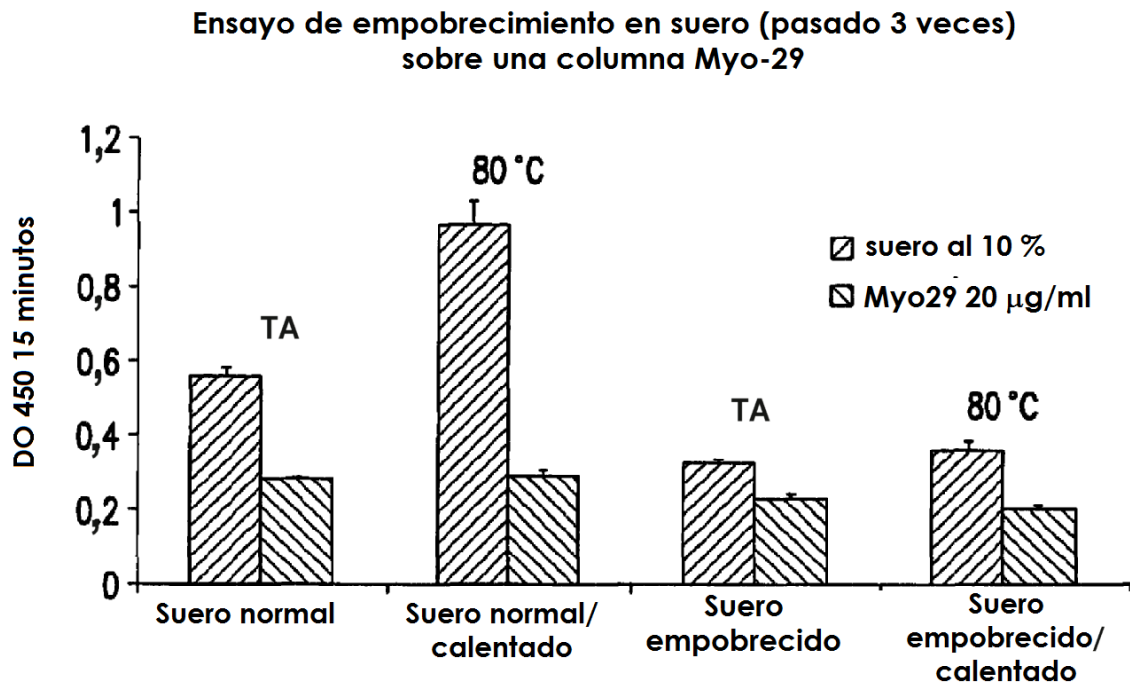


FIG.18

Recorrido de curvas patrón en suero calentado/empobrecido en GDF-8 y GDF-8 latente

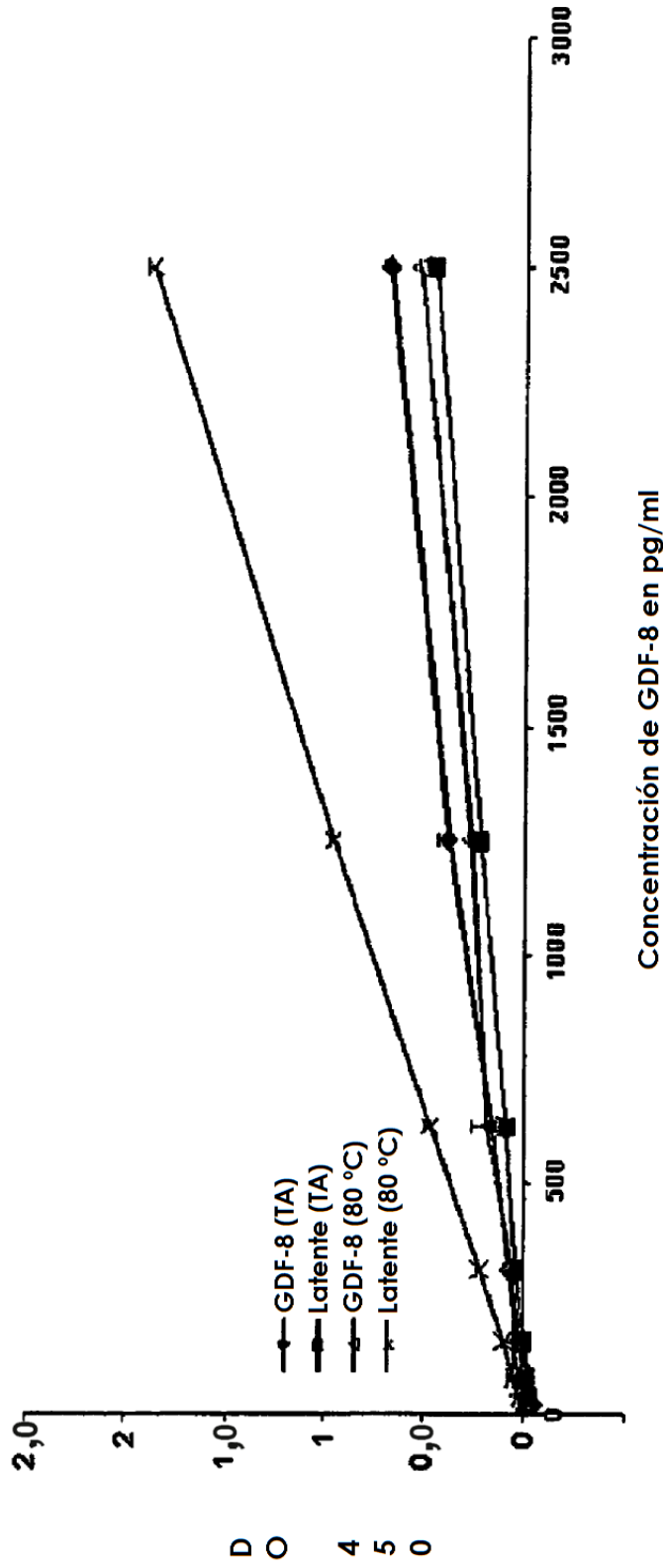


Figura 19

Ajuste de curva por regresión
No lineal

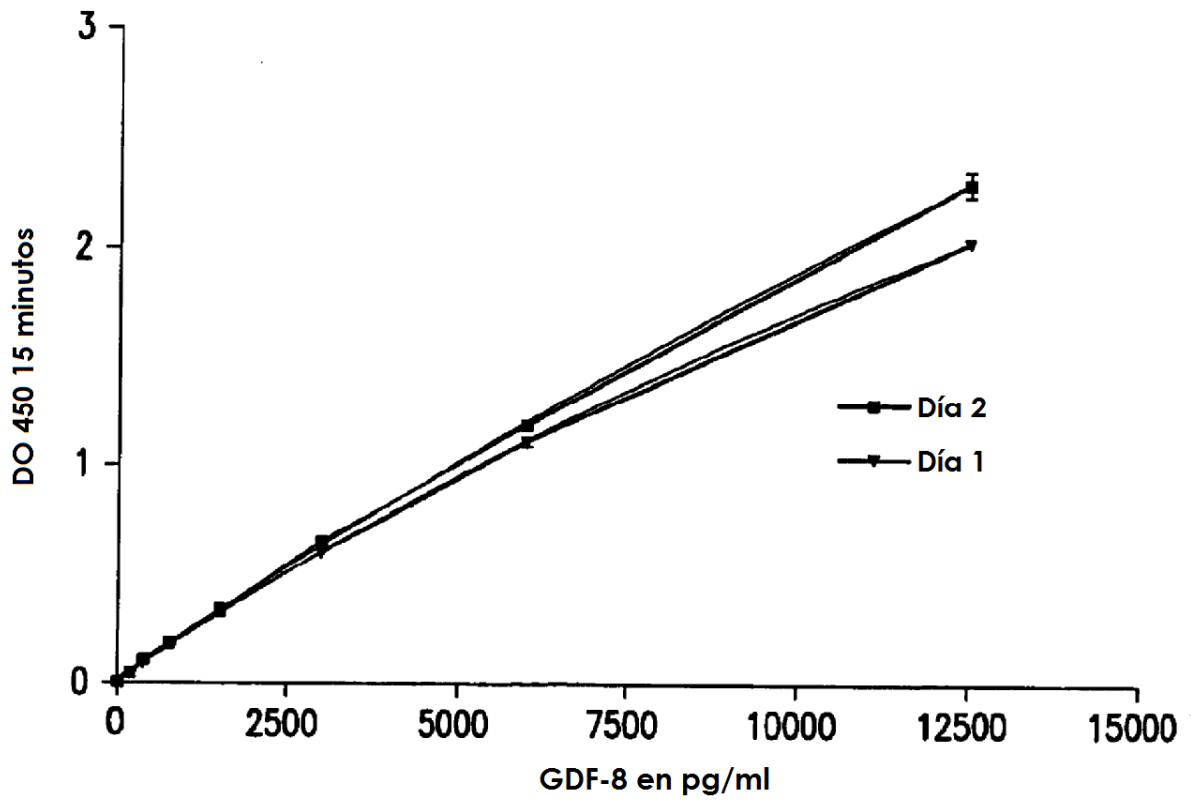


FIG.20

Análisis de GDF-8 con nueve muestras de suero normal

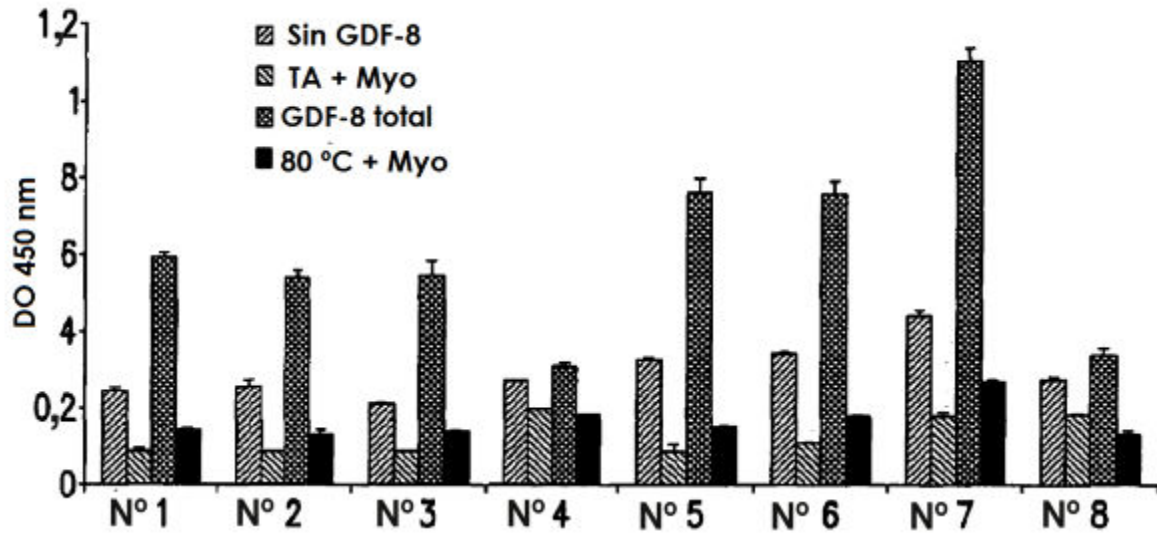


FIG.21

GDF-8 libre y total de ocho muestras de suero normal:
ensayo realizado en dos días distintos

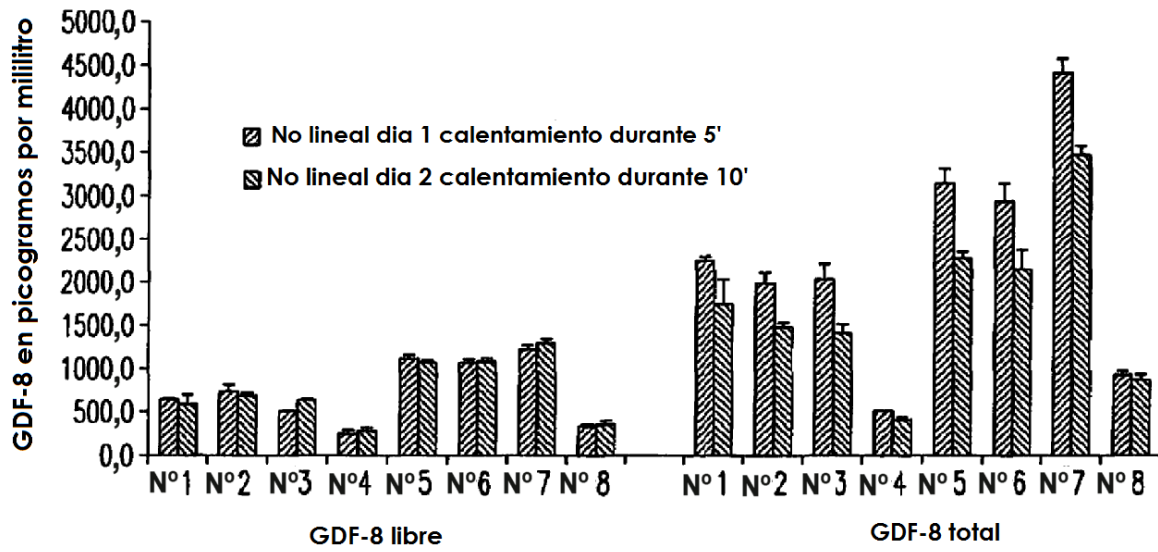


FIG.22

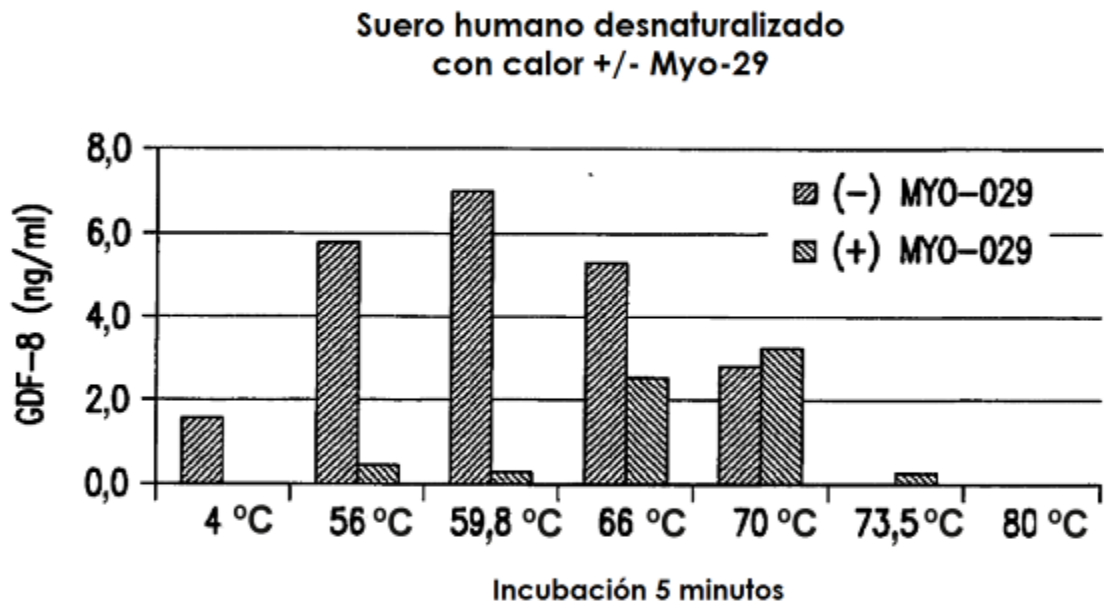


FIG.23

Detección del dímero de GDF-8 en presencia de MYO-29

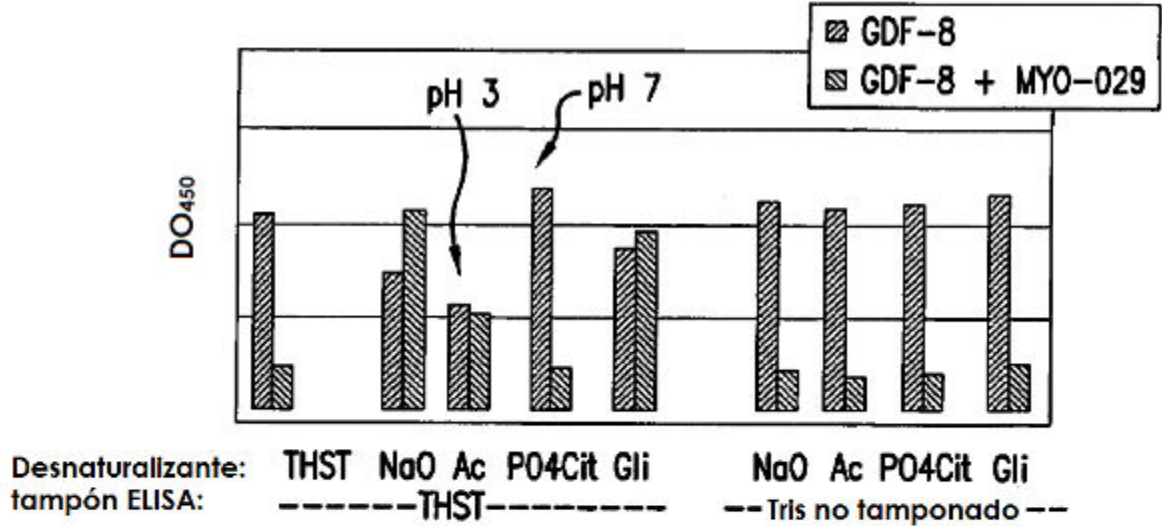


FIG.24A

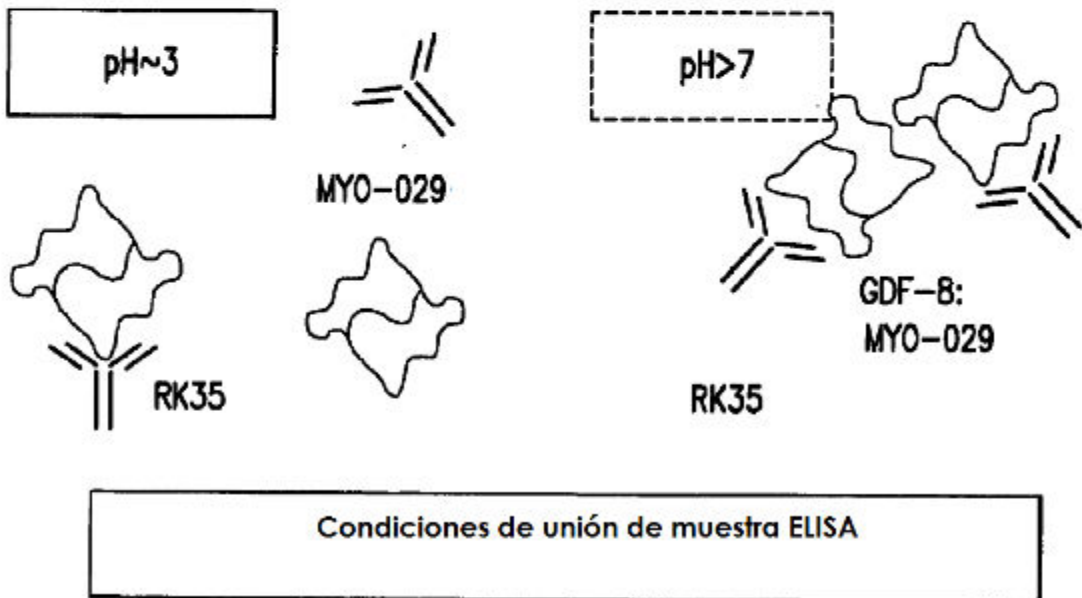


FIG.24B

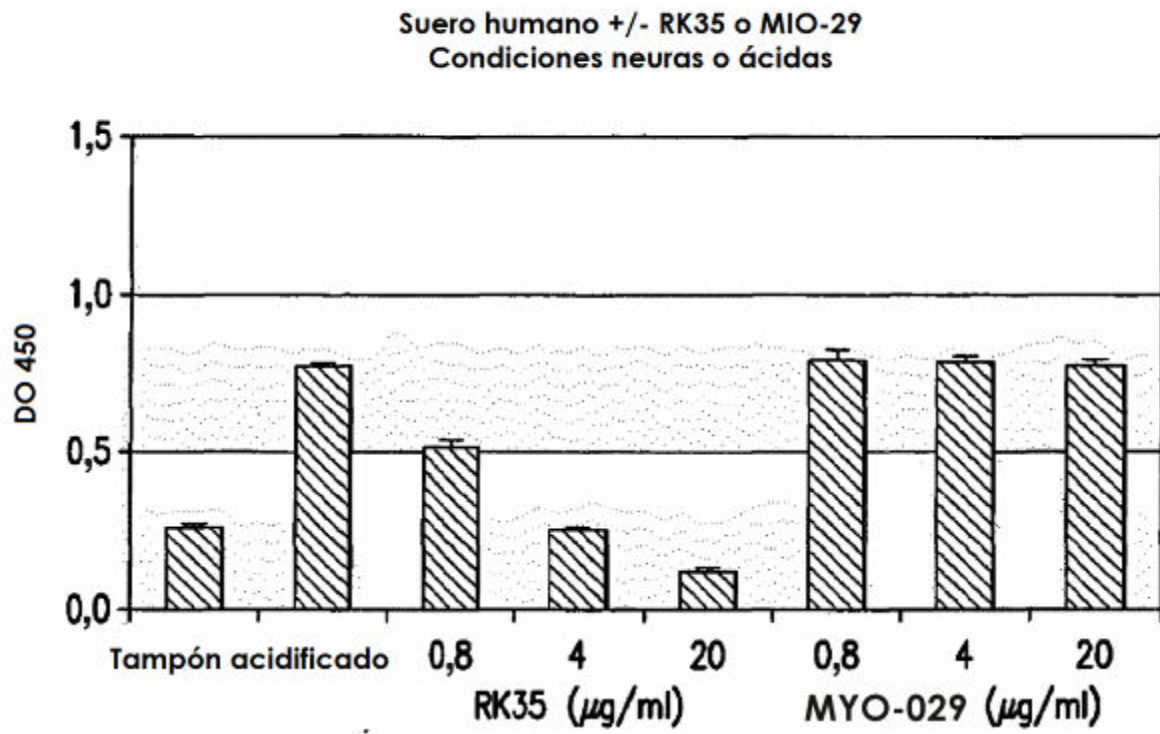


FIG.25

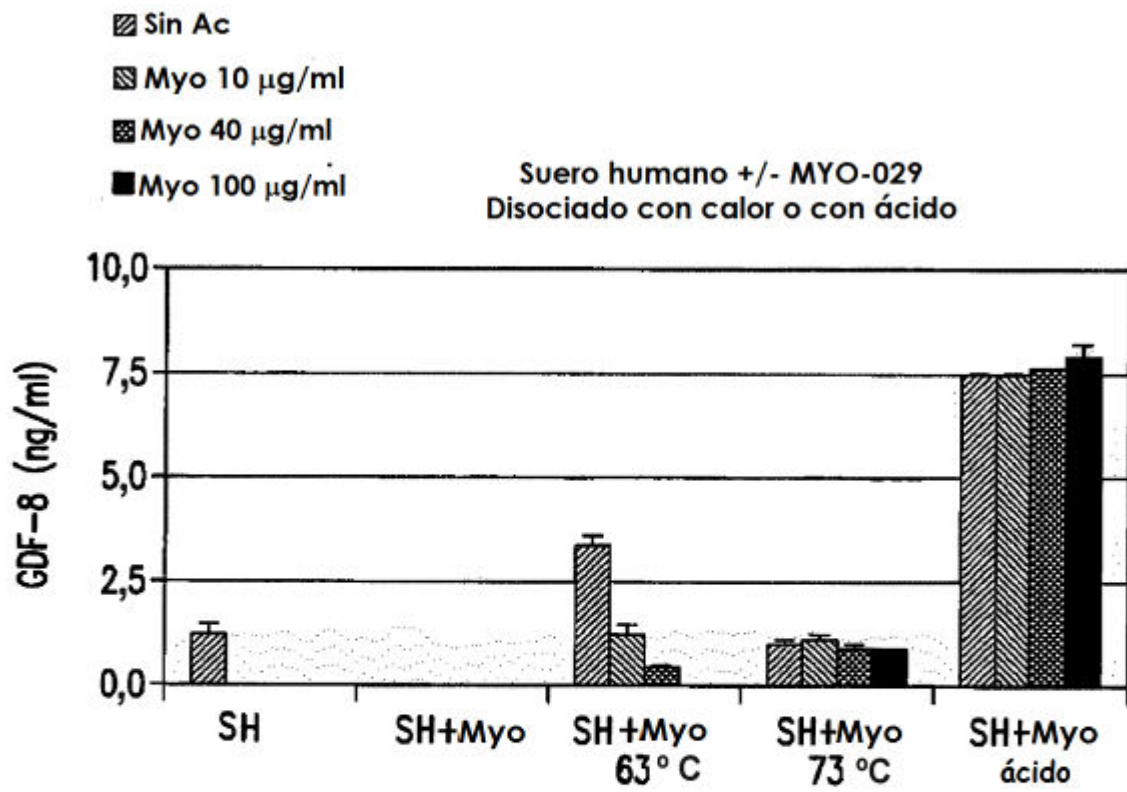


FIG.26

Niveles de GDF-8 en suero
de animales de tipo silvestre y KO

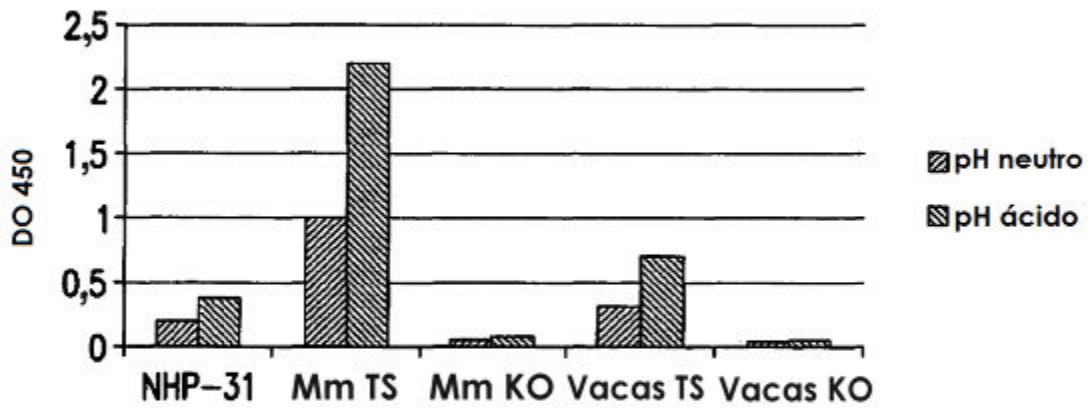


FIG.27

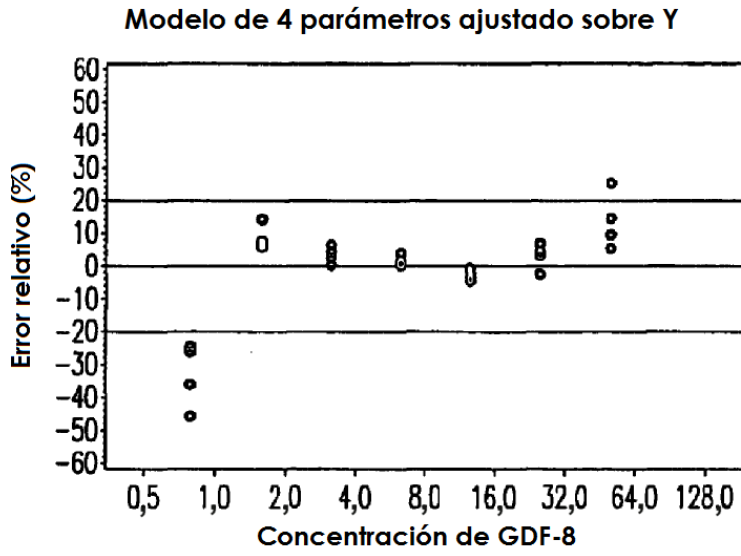


FIG.28A

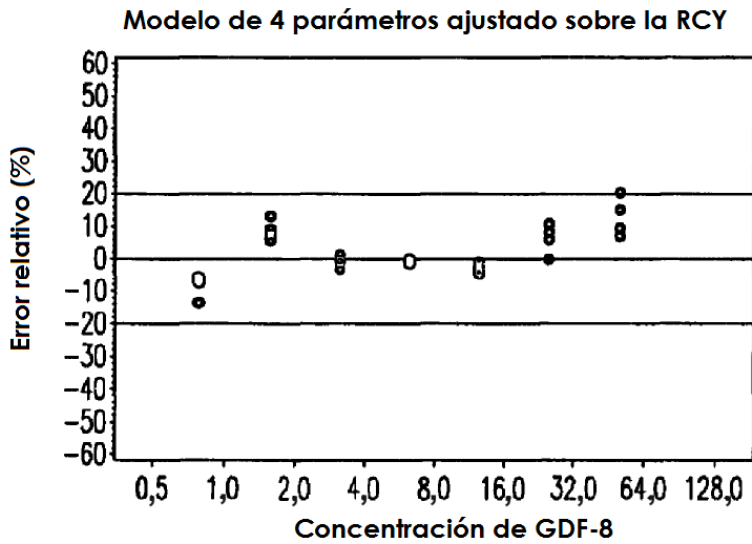


FIG.28B

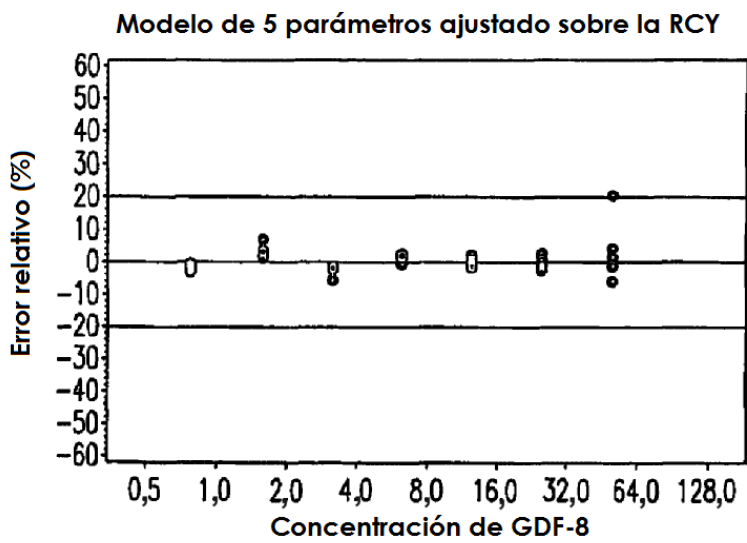


FIG.28C

Niveles de miostatina en suero en animales normales y sin miostatina

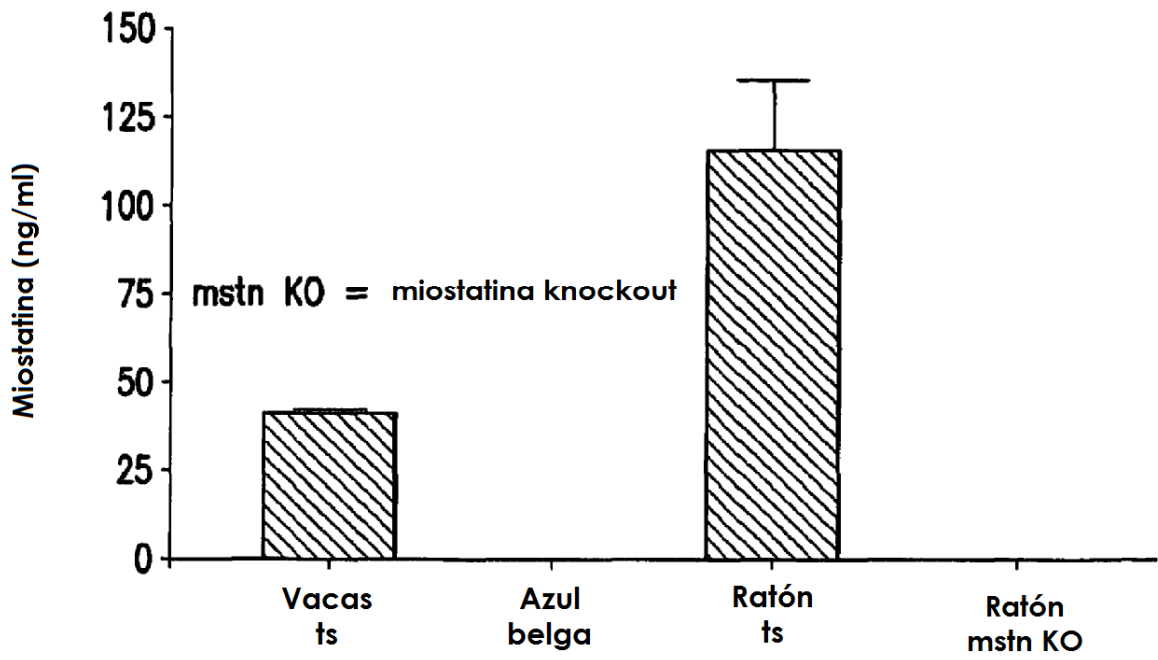
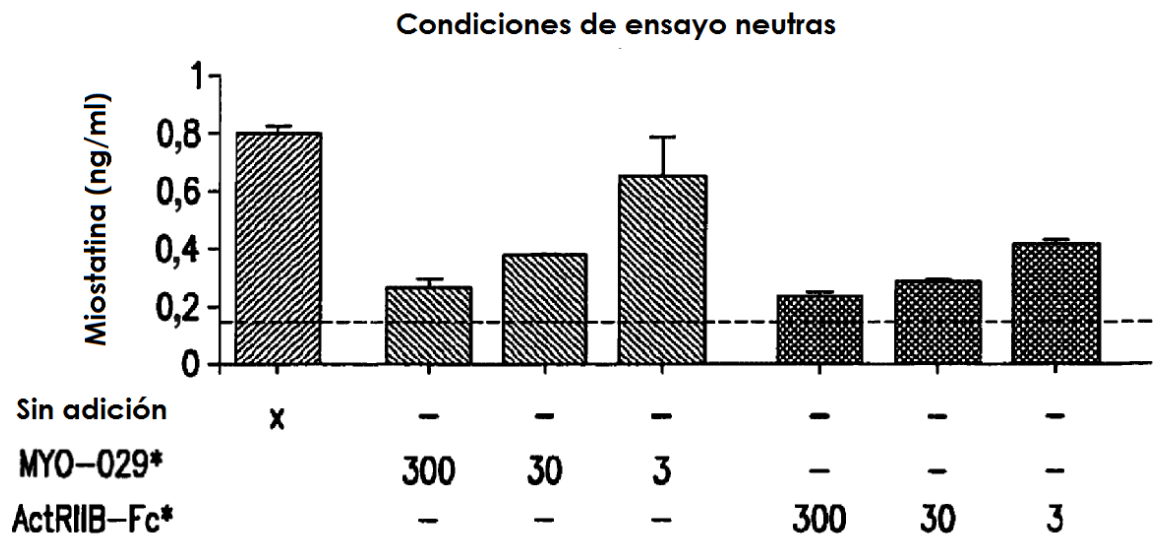


FIG.29A

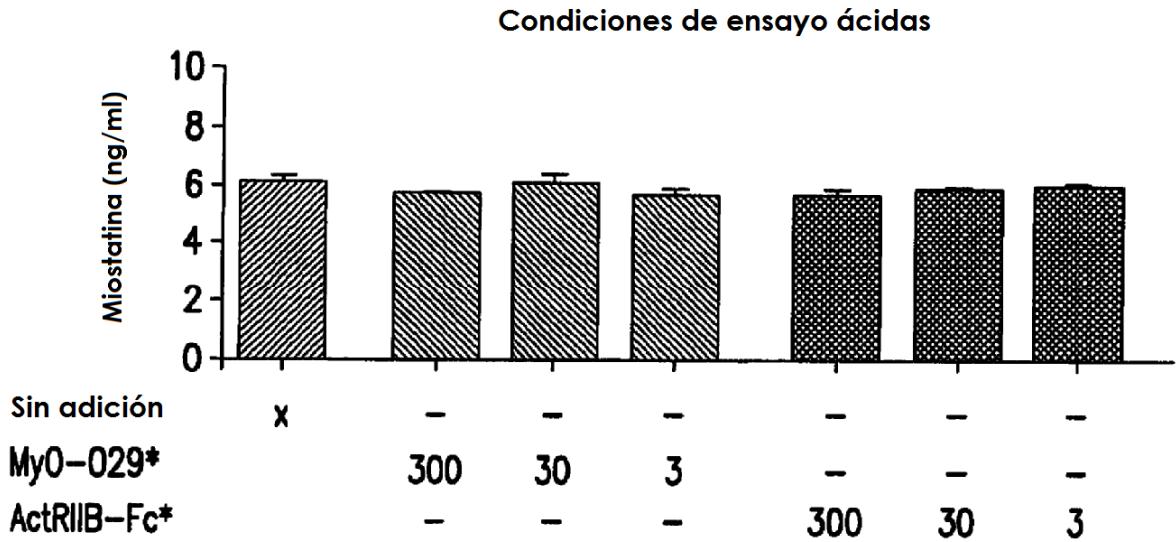
Niveles de miostatina en suero ensayados
 en presencia de proteínas de unión a miostatina a pH neutro



* Concentración final ($\mu\text{g/ml}$)

FIG.29B

Niveles de miostatina en suero ensayados en presencia de proteínas de unión a miostatina a pH bajo



* Concentración final (µg/ml)

FIG.29C

Gráficas de cajas y bigotes de niveles de miostatina en suero en hombres jóvenes y de edad avanzada

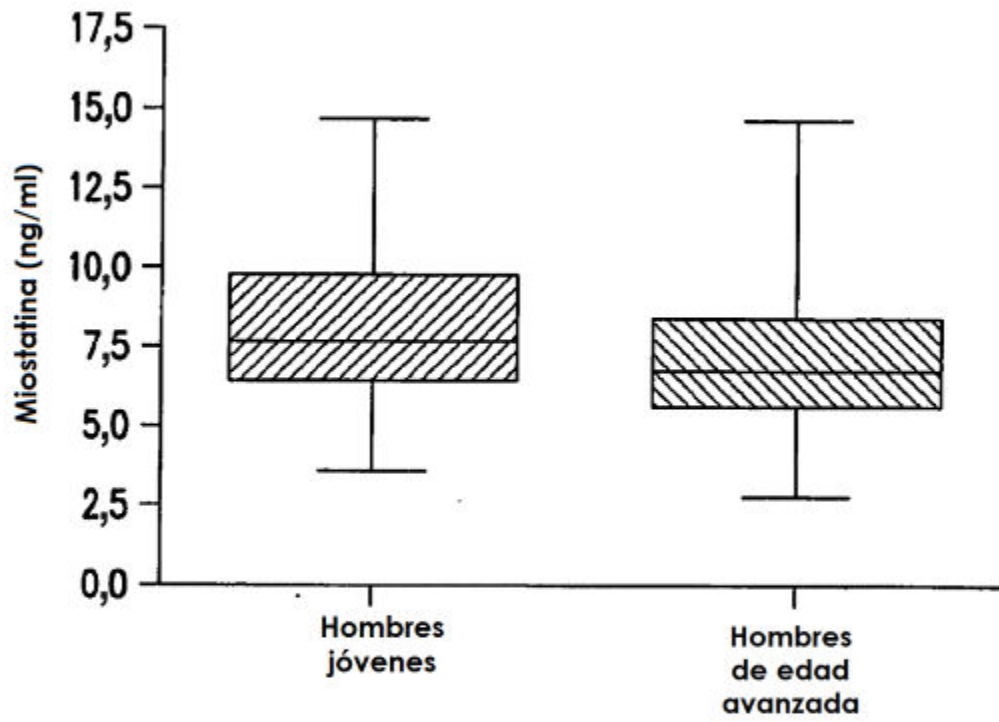


FIG.30A

Gráfica de regresión que muestra la correlación de los niveles de miostatina basales con masa corporal magra en hombres jóvenes

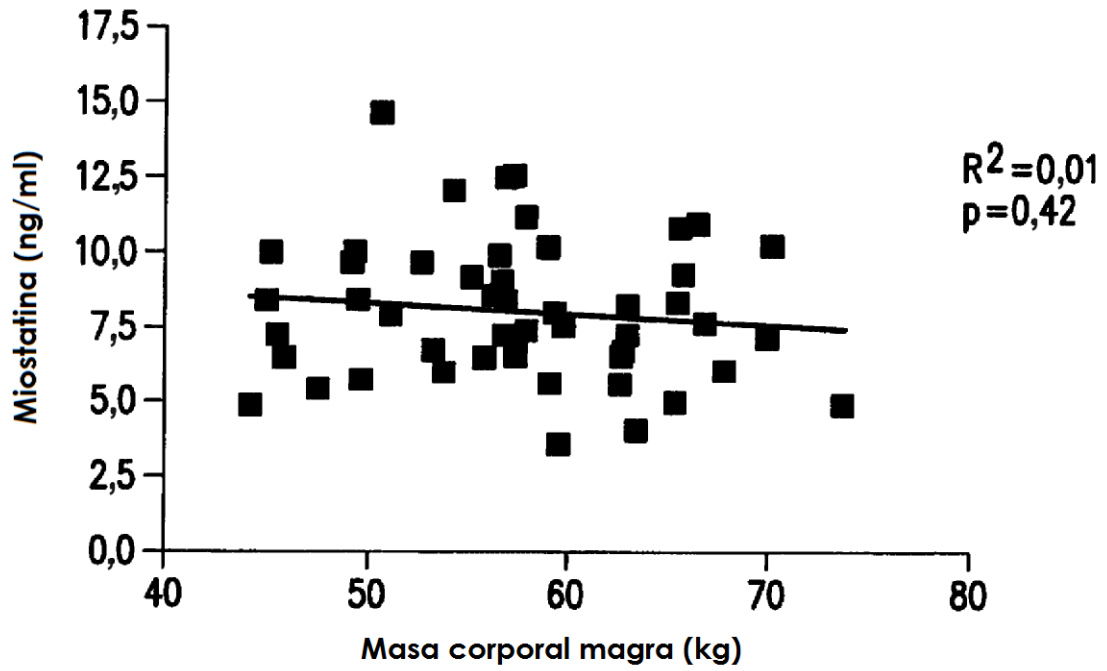


FIG.30B

Gráfica de regresión que muestra la correlación de los niveles de miostatina basales con masa corporal magra en hombres de edad avanzada

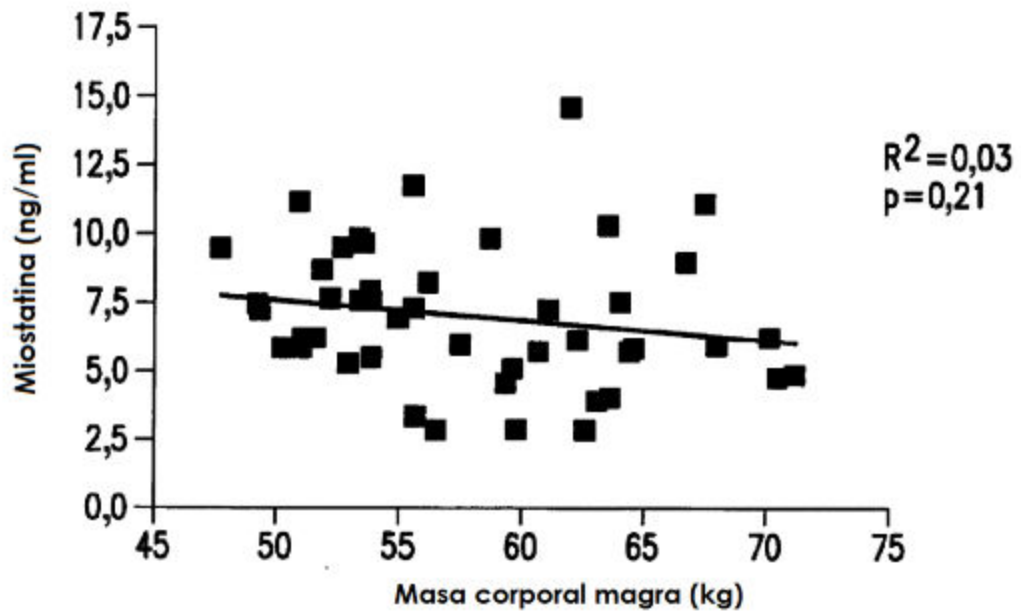


FIG.30C

Cambios de niveles de miostatina en hombres jóvenes en respuesta a la administración de dosis graduadas de testosterona

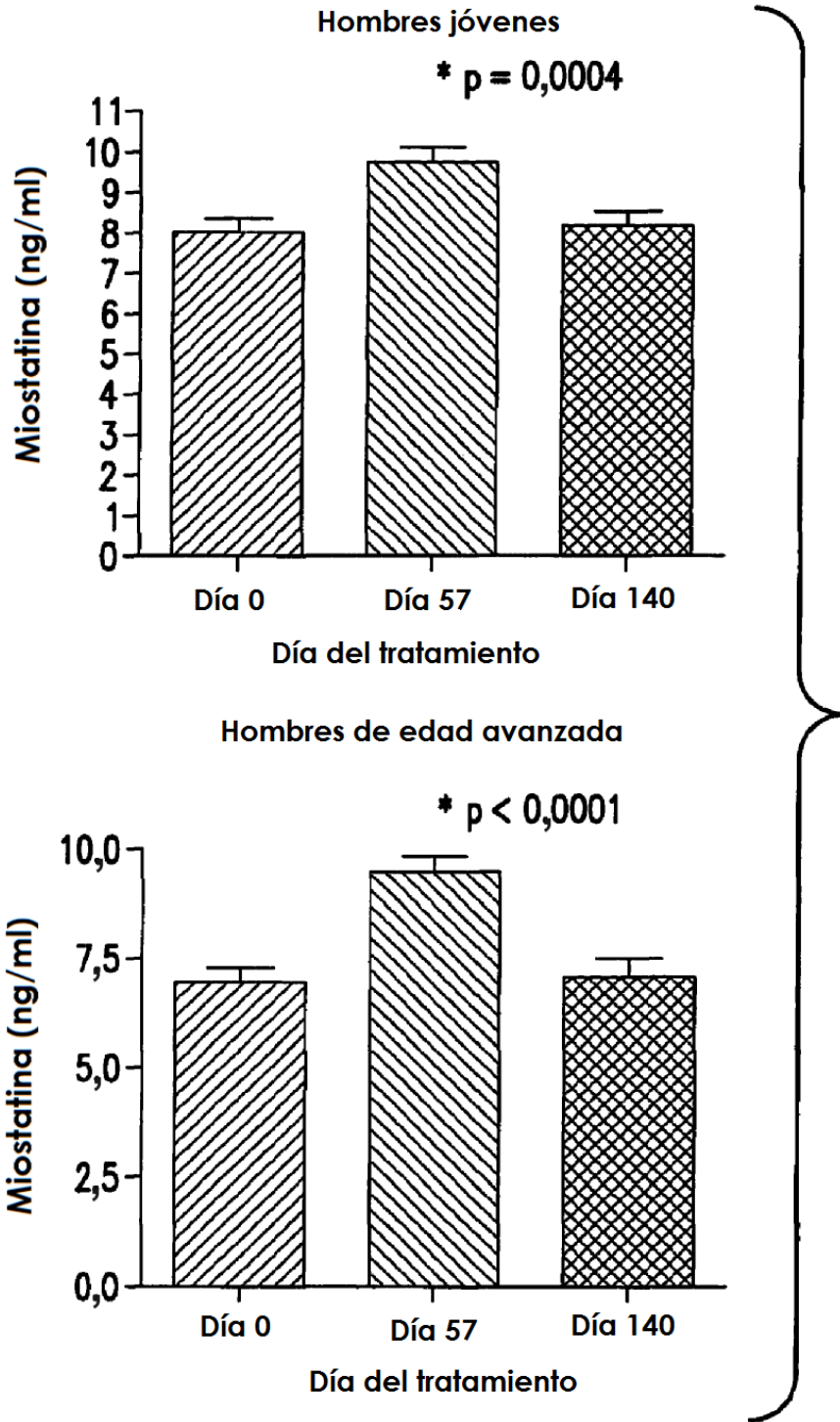


FIG.31A

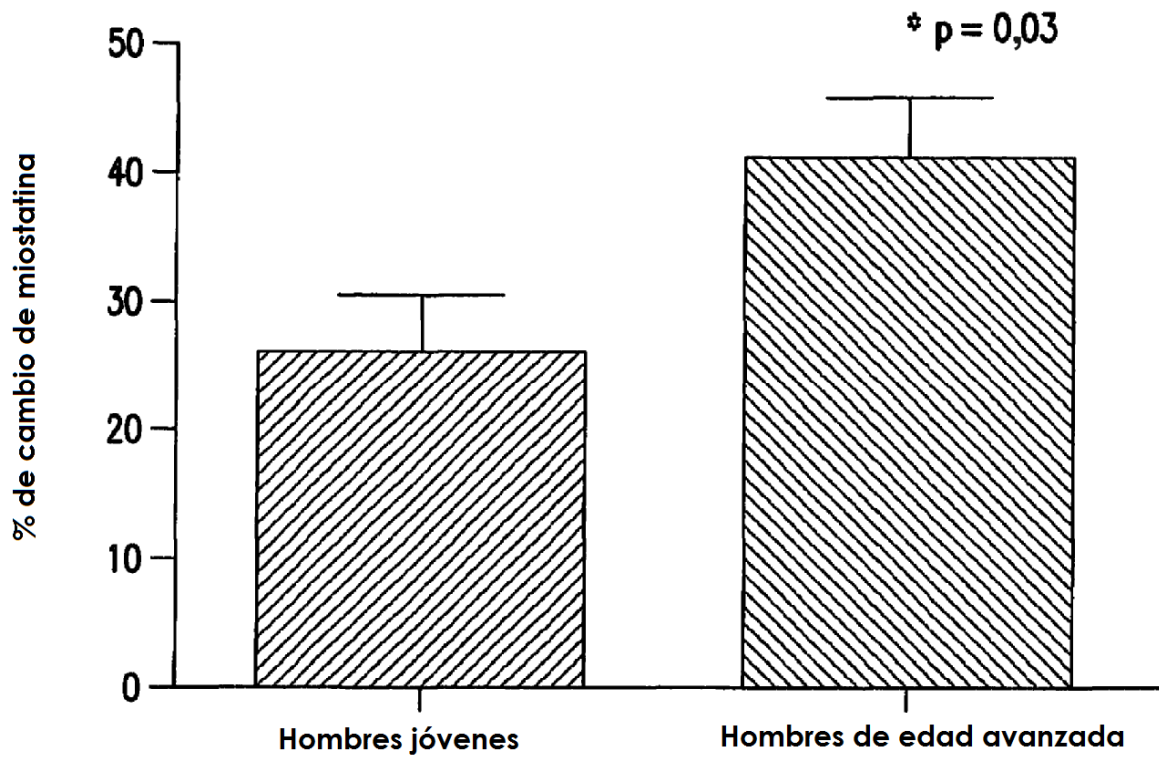


FIG.31B

Gráficas de regresión que muestran la correlación del cambio de los niveles de miostatina desde el inicio al día 56 y cambios de las concentraciones de testosterona y masa corporal magra en hombres jóvenes y de edad avanzadas

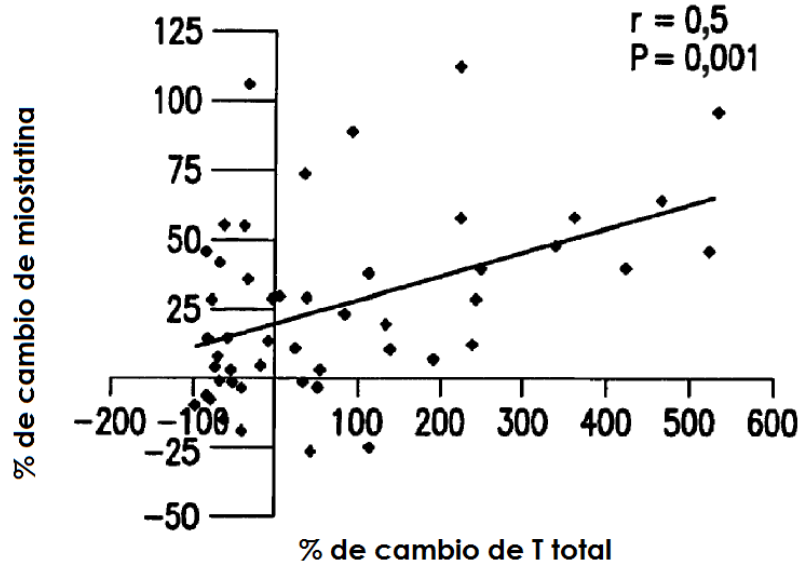


FIG.32A

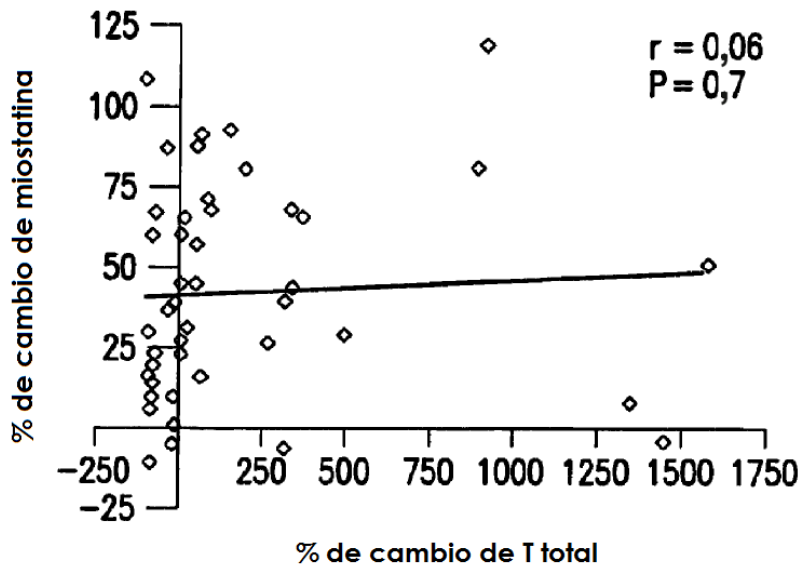


FIG.32B

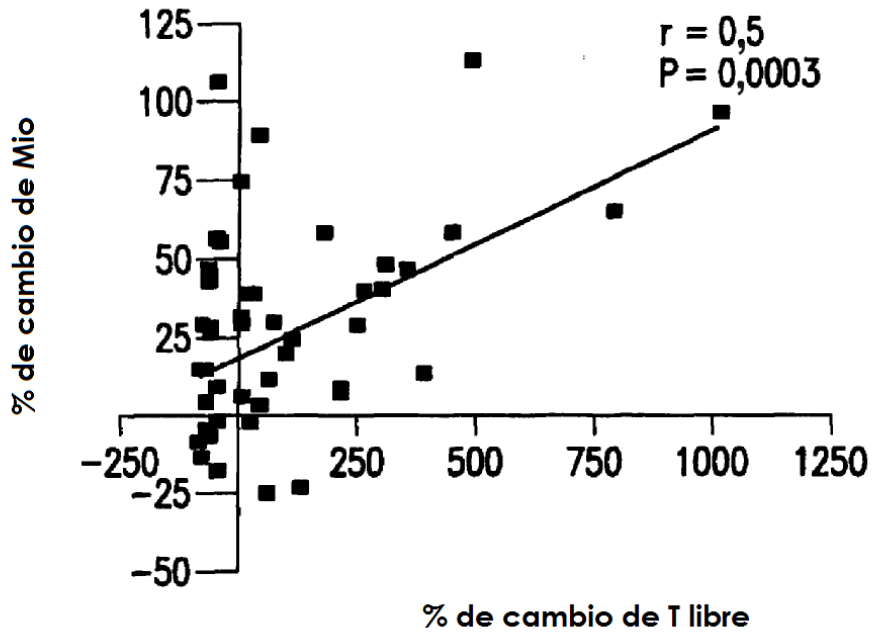


FIG.32C

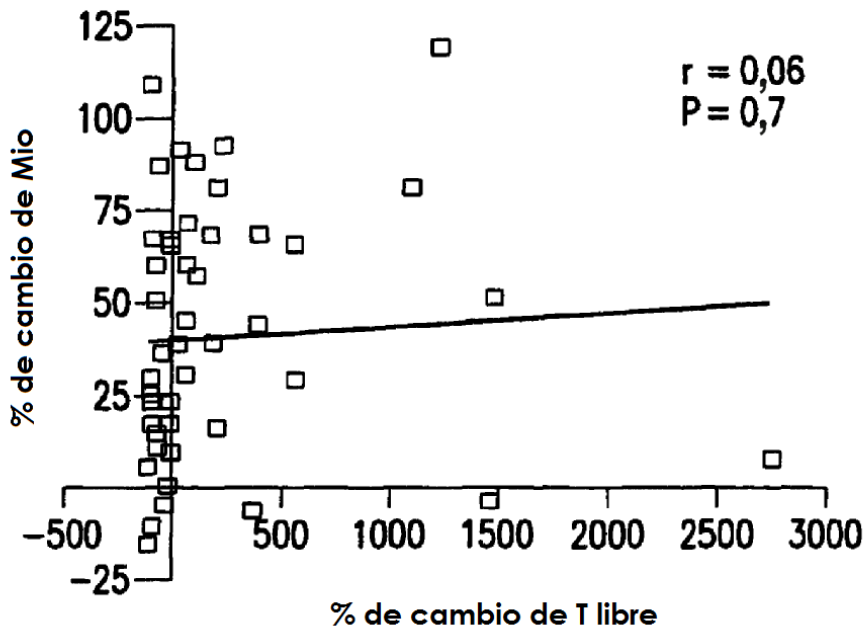


FIG.32D

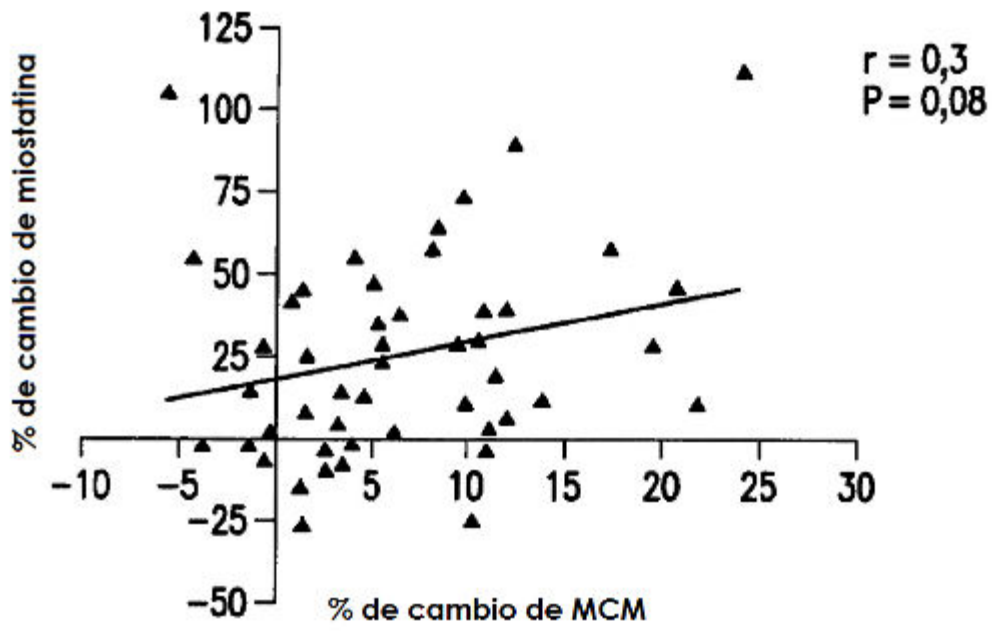


FIG.32E

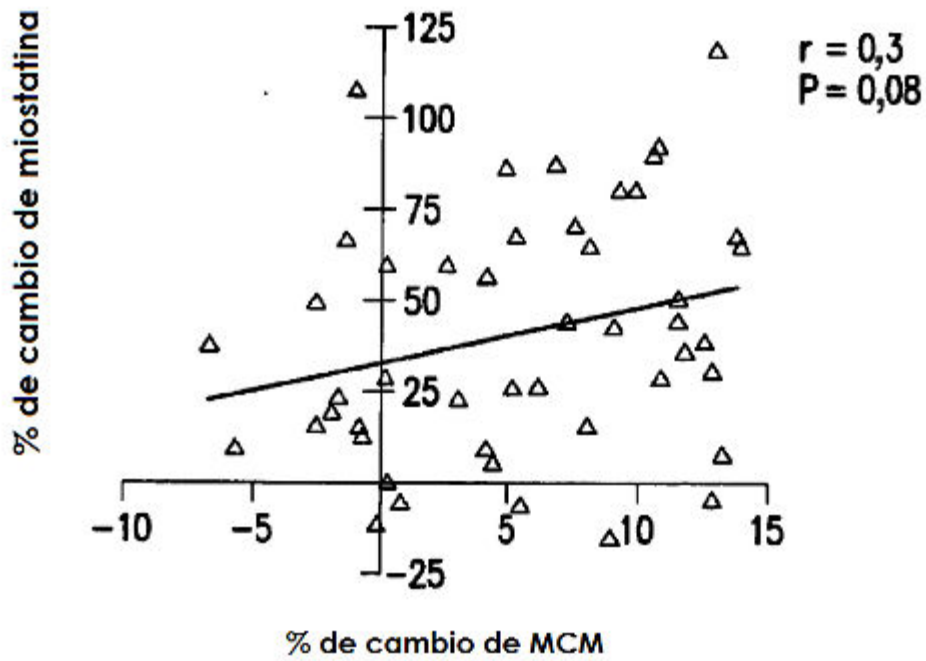


FIG.32F

Gráficas de cajas y bigotes de niveles de miostatina en mujeres con menstruación, menopausia quirúrgica y de edad avanzada

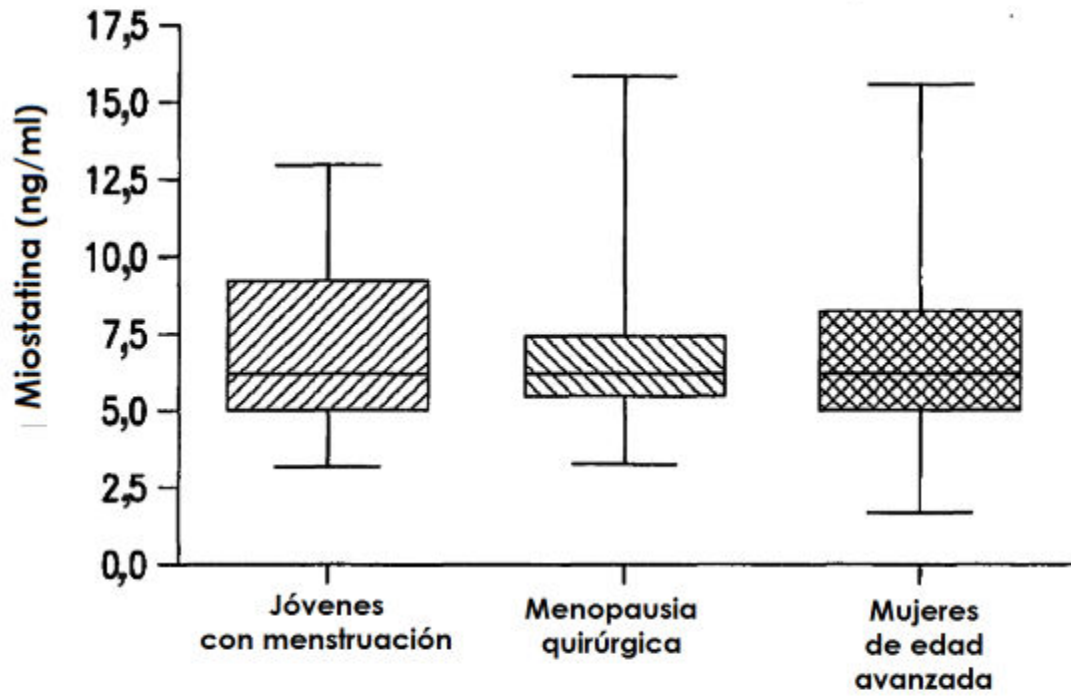


FIG.33