

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 760**

51 Int. Cl.:

C07K 16/22 (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.08.2006 E 06801434 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.01.2015 EP 1915397**

54 Título: **Anticuerpos antagonistas contra GDF-8 y sus usos en el tratamiento de ELA y otros trastornos asociados con GDF-8**

30 Prioridad:

19.08.2005 US 709704 P

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

28.04.2015

73 Titular/es:

**WYETH LLC (50.0%)
235 East 42nd Street
New York, NY 10017, US y
THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF
PENNSYLVANIA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**WALSH, FRANK S.;
ZALESKA, MARGARET M.;
HOWLAND, DAVID S.;
HOLZBAUR-HOWLAND, ERIKA L.F.;
TCHISTIAKOVA, LIUDMILA;
KARIM, RIYEZ;
KELLEY, PAMELA;
TAN, XIANG-YANG;
KWAK, SEUNG POON;
WALLACE, KAREN;
WEBER, NICHOLAS y
PANGALOS, MENELAS N.**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 534 760 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 antagonistas contra GDF-8 y sus usos en el tratamiento de ELA y otros trastornos asociados con GDF-8

La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos N° 60/709.704, presentada el 19 de agosto de 2005.

5 **Antecedentes de la invención****Campo de la invención**

El campo técnico de la invención se refiere a antagonistas del factor 8 de crecimiento y diferenciación (GDF-8), en particular, anticuerpos contra GDF-8, por ejemplo, anticuerpos de ratón, humanos y humanizados y sus fragmentos, en particular los que inhiben la actividad de GDF-8 *in vitro* y/o *in vivo*. El campo se refiere adicionalmente al tratamiento, mejora, prevención, pronóstico, o control de trastornos asociados con GDF-8, por ejemplo, trastornos musculares, trastornos neuromusculares, trastornos degenerativos óseos, trastornos óseos metabólicos o inducidos, trastornos adiposos, trastornos del metabolismo de la glucosa o trastornos relacionados con la insulina, en particular esclerosis lateral amiotrófica ("ELA").

Técnica antecedente relacionada

15 El factor 8 de crecimiento y diferenciación (GDF-8), también denominado miostatina, es una proteína segregada y un miembro de la superfamilia del factor beta de crecimiento transformante (TGF- β) de factores de crecimiento relacionados estructuralmente. Los miembros de esta superfamilia poseen propiedades de regulación 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 GDF-8 humano se sintetiza como una proteína precursora del aminoácido 375
20 que forma un complejo homodimérico. Durante el procesamiento, el propéptido amino-terminal, conocido como "péptido asociado a latencia" (LAP), se escinde y puede permanecer unido de forma no covalente al homodímero, formando un complejo inactivo denominado el "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 follistatina y proteínas relacionadas con la misma también se unen a homodímeros GDF-8 maduros e inhiben la actividad biológica de GDF-8 (Gamer y col. (1999) *Dev. Biol.* 208: 222-32).

Un alineamiento de la secuencia de aminoácidos deducida de GDF-8 de diversas especies demuestra que GDF-8 está altamente conservado (McPherron y col. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94: 12457-61). Las secuencias de GDF-8 de ser humano, ratón, rata, cerdo y pollo son idénticas en un 100 % en la región C-terminal, mientras que el GDF-8 de babuino, bovino y ovino difiere simplemente en 3 aminoácidos en el extremo C. El alto grado de conservación de GDF-8 entre especies sugiere que GDF-8 tiene una función fisiológica esencial.

Se ha mostrado que GDF-8 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: 604-07; McCroskery, y col. (2003) *J. Cell. Biol.* 162: 1135-47). Se expresa de forma precoz en músculo esquelético en desarrollo y continúa expresándose en músculo esquelético en adultos, preferentemente en tipos de contracción rápida. Además, GDF-8 sobreexpresado en ratones adultos da como resultado una pérdida muscular significativa (Zimmers y col. (2002) *Science* 296: 1486-88). Además, se ha mostrado que las mutaciones naturales que inactiva en el gen de GDF-8 causan tanto hipertrofia como hiperplasia tanto en animales como en seres humanos (Lee y McPherron (1997) mencionado anteriormente). Por ejemplo, ratones transgénicos genosuprimidos de GDF-8 se caracterizan por una hipertrofia e hiperplasia notables 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). Aumentos similares en la masa del músculo esquelético son evidentes en mutaciones de GDF-8 naturales en ganado (Ashmore y col. (1974) *Growth* 38: 501-07; Swatland y col. (1994) *J. Anim. Sci.* 38: 752-57; McPherron y col., mencionado anteriormente; Kambadur y col. (1997) *Genome Res.* 7: 910-15). Además, diversos estudios indican que el aumento de la expresión de GDF-8 está asociado con debilidad muscular inducida por VIH (Gonzalez-Cadavid y col. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 14938-43). GDF-8 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).

Además de sus propiedades de regulación del crecimiento y morfogenéticas, se cree que GDF-8 participa en otros numerosos procesos fisiológicos, incluyendo homeostasis de la glucosa durante el desarrollo de la diabetes de tipo 2, tolerancia alterada a la glucosa, síndromes metabólicos (es decir, un síndrome tal como, por ejemplo, síndrome X, que implican la aparición simultánea de un grupo de afecciones de la salud, que pueden incluir resistencia a la insulina, obesidad abdominal, dislipidemia, hipertensión, inflamación crónica, un estado protrombótico, etc., que pone a una persona en alto riesgo de diabetes de tipo 2 y/o enfermedad cardíaca), resistencia a la insulina (por ejemplo, resistencia inducida por traumatismos, tales como quemaduras o desequilibrio de nitrógeno), y trastornos del tejido adiposo (por ejemplo, obesidad, dislipidemia, enfermedad de hígado graso no alcohólico, etc.) (Kim y col. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 281: 902-06).

Una serie de trastornos humanos y animales están asociados con tejido muscular funcionalmente alterado, por ejemplo, esclerosis lateral amiotrófica ("ELA"), distrofia muscular ("DM"; incluyendo distrofia muscular de Duchenne), atrofia muscular, atrofia de órganos, debilidad, enfermedad pulmonar obstructiva congestiva (EPOC), sarcopenia, caquexia, y síndromes de debilidad muscular causados por otras enfermedades y afecciones. En la actualidad, existen pocas terapias de confianza o eficaces para tratar estos trastornos. La patología de estas enfermedades indica el papel potencial de la señalización de GDF-8 como una diana en el tratamiento de estas enfermedades.

La ELA es una enfermedad euro degenerativa de inicio tardío y mortal caracterizada por regeneración del sistema nervioso central y atrofia muscular. Por lo general, la ELA comienza con anomalías en marcha y pérdida de destreza, y a continuación progresa a parálisis de extremidades y diafragma. Aunque la mayoría de los casos de ELA son esporádicos y son de etiología desconocida, se ha mostrado que un 5-10 % de los casos resultan de herencia dominante familiar (FALS). Aproximadamente un 10-20 % de los casos de FALS se atribuyen a mutaciones en el gen de superóxido dismutasa con Cu/Zn (SOD1) (revisado en Bruijn y col. (2004) *Ann. Rev. Neurosci.* 27: 723-49). SOD1 es una metalo-proteína heterodimérica que cataliza la reacción de superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno diatómico, y como la pérdida de SOD1 no da como resultado enfermedad de neuronas motoras (Reaume y col. (1996) *Nat. Genet.* 13: 43-47), se cree que induce la enfermedad por aumento tóxico de la función (revisado en Bruijn y col., mencionado anteriormente). Los mecanismos específicos de muerte de células neuronales inducida por SOD1 no son claras, y pueden implicar alteraciones en el transporte axonal, respuestas celulares a proteína mal plegada, disfunción mitocondrial, y excitotoxicidad (Bruijn y col., mencionado anteriormente).

La degeneración de las neuronas motoras observadas en la ELA se puede producir a través de múltiples mecanismos, que incluyen la alteración de la absorción o transporte de factores tróficos por las neuronas motoras (revisado en Holzbaur (2004) *Trends Cell Biol.* 14: 233-40). Por lo tanto, la ELA se podría tratar con terapias que rejuvenezcan una neurona en degeneración proporcionando un entorno óptimo de supervivencia. El entorno de un nervio incluye células no neuronales, tales como células gliales y musculares inervadas por las neuronas motoras. Este entorno proporciona factores tróficos y de crecimiento que endocita la neurona y se transportan a través de transporte axonal retrógrado al cuerpo celular (Chao (2003) *Neuron* 39: 1-2; Holzbaur, mencionado anteriormente).

Se han realizado modelos de FALS tanto en ratón como en rata mediante la sobreexpresión de SOD1 mutante (Howland y col. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 1604-09). Ratones transgénicos que sobreexpresan la forma G93A de SOD1 mutante presentan debilidad y atrofia muscular de los 90 a 100 días de edad, y por lo general mueren aproximadamente a los 130 días de edad (Gurney y col. (1994) *Science* 264: 1772-75). Sin embargo, la patología inducida por SODG93A subyacente, que incluye debilidad en la fuerza de agarre y pérdida de uniones neuromusculares, es significativa ya a los 50 días de edad (Frey y col. (2000) *J. Neurosci.* 20: 2534-42; Fisher y col. (2004) *Exp. Neuro.* 185: 232-40; Ligon y col. (2005) *NeuroReport* 16: 533-36; Wooley y col. (2005) *Muscle Nerve* 32: 43-50). Las ratas transgénicas que expresan la mutación SODG93A siguen un transcurso de tiempo de degeneración similar (Howland y col., mencionado anteriormente). El trabajo reciente ha sugerido que el desarrollo de patología no es autónomo celular, coherente con la hipótesis de que la degeneración de las neuronas motora observada en ELA se produce a través de múltiples mecanismos, que incluyen la alteración de absorción y transporte de factores tróficos por las neuronas motoras (véase anteriormente). Clement y colaboradores han usado ratones quiméricos para mostrar que las células no neuronales de tipo silvestre puede prolongar la supervivencia de las neuronas motoras que expresan SOD1 mutante (Clement y col. (2003) *Science* 302: 113-17). Estas observaciones han conducido a la investigación de terapias que podrían ralentizar la degeneración neuronal proporcionando un microentorno óptimo para la supervivencia. Por ejemplo, el tratamiento del ratón con SODG93A a través de inyección intramuscular directa de factores de crecimiento expresados de forma viral (incluyendo IGF-1, GDNF y VEGF) prolonga la supervivencia del animal (Kaspar y col. (2003) *Science* 301: 839-42; Azzouz y col. (2004) *Nature* 429: 413-17; Wang y col. (2002) *J. Neurosci.* 22: 6920-28). Además, la expresión específica del músculo de una isoforma específica de IGF-1 local (mIGF-1) estabiliza las uniones neuromusculares, aumentada supervivencia de las neuronas motoras y retrasa el comienzo y la progresión de la enfermedad en el modelo de ratón transgénico con SODG93A, lo que indica que los efectos directos en el músculo pueden influir en el comienzo de la progresión de la enfermedad en animales transgénicos con SOD1 (Dobrowolny y col. (2005) *J. Cell Biol.* 168: 193-99). También se han informado uniones entre hipermetabolismo muscular y vulnerabilidad de las neuronas motoras en ratones con ELA, lo que apoya la hipótesis de que defectos musculares pueden contribuir a la etiología de la enfermedad (Dupois y col. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101: 11159-64). Por lo tanto, el aumento del crecimiento muscular proporcionaría mayor soporte local para las neuronas motoras, y por lo tanto daría como resultado en beneficios terapéuticos.

La inhibición de la expresión de la miostatina conduce tanto a hipertrofia como a hiperplasia muscular (Lee y McPherron, mencionado anteriormente; McPherron y col., mencionado anteriormente). La miostatina regula de forma negativa la degeneración muscular después de lesión, y la falta de miostatina en ratones sin GDF-8 da como resultado regeneración muscular acelerada (McCroskery y col., (2005) *J. Cell. Sci.* 118: 3531-41). Los anticuerpos que neutralizan la miostatina aumentan el peso corporal, masa del músculo esquelético, y tamaño del músculo y resistencia en el músculo esquelético de ratones de tipo silvestre (Whittemore y col. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 300: 965-71) y el ratón *mdx*, un modelo de distrofia muscular (Bogdanovich y col. (2002) *Nature* 420: 418-21; Wagner y col. (2002) *Ann. Neurol.* 52: 832-36). Además, el anticuerpo de miostatina en estos ratones disminuyó el daño al diafragma, un músculo que también está dirigido durante la patogénesis de la ELA. Se ha realizado la hipótesis de que la acción de factores de crecimiento, tales como HGF, en el músculo se puede deber a la inhibición

de la expresión de la miostatina (McCroskery y col. (2005), mencionado anteriormente), ayudando de ese modo al desplazamiento del "pujar y tirar", o equilibrio, entre regeneración y degeneración en una dirección positiva. Por lo tanto, la inhibición de GDF-8 se presenta como una diana farmacológica potencial para el tratamiento de ELA, distrofia muscular (DM), y otros trastornos asociados con GDF-8, por ejemplo, trastornos neuromusculares para los que se desea a aumentar la masa muscular, resistencia, tamaño, etc. Con la disponibilidad de modelos animales (ratón y rata) de ELA, es posible someter a ensayo agentes terapéuticos en dos especies diferentes, aumentando de este modo la confianza de los efectos terapéuticos en seres humanos *in vivo*.

Además de trastornos neuromusculares en seres humanos, también existen afecciones relacionadas con el factor de crecimiento, asociadas con una pérdida de hueso, tales como osteoporosis y osteoartritis, que afectan predominantemente a las mujeres de mayor edad y/o postmenopáusicas. Además, enfermedades y trastornos óseos metabólicos incluyen masa ósea reducida debido a terapia crónica con glucocorticoides, insuficiencia de gónadas prematura, supresión de andrógenos, deficiencia de vitamina D, hiperparatiroidismo secundario, deficiencias nutricionales, y anorexia nerviosa. Aunque muchas terapias actuales para estas afecciones funcionan mediante la inhibición de la resorción ósea, una terapia que promueva la formación ósea sería un tratamiento alternativo útil. Dado que GDF-8 desempeña un papel en el desarrollo óseo así como en el desarrollo muscular, la regulación de GDF-8 también es una diana farmacológica excelente para el tratamiento de trastornos óseos degenerativos.

La solicitud de patente internacional publicada como documento WO 2004/037861 A2 describe anticuerpos humanos contra GDF-8 y su uso para el tratamiento de trastornos degenerativos de músculo o de hueso.

Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar compuestos y procedimientos de tratamiento que contribuyan a un aumento general de la masa muscular y/o resistencia y/o densidad ósea, etc., en particular en seres humanos, y en particular en los que padecen ELA y otras enfermedades debilitantes del músculo así como trastornos degenerativos óseos. La generación de anticuerpos de neutralización y otras moléculas pequeñas con mayor afinidad hacia GDF-8 es un enfoque farmacológico excelente para tratar estos trastornos.

Sumario de la invención

La invención es tal como se define en las reivindicaciones adjuntas a la presente. Los antagonistas de GDF-8 de la invención son anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos intactos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos), que en el presente documento se denominan "anticuerpos anti-GDF-8" o "anticuerpos GDF-8". En una realización, un anticuerpo anti-GDF-8 reduce, neutraliza, y/o antagoniza al menos una actividad asociada con GDF-8 (es decir, "actividad de GDF-8"). Por lo tanto, la presente invención proporciona composiciones que comprenden estos anticuerpos GDF-8 para su uso para tratar diversos trastornos óseos, musculares, de glucosa y adiposos asociados con la actividad de GDF-8. La presente divulgación desvela que antagonistas de GDF-8, por ejemplo, anticuerpos GDF-8, son agentes terapéuticos altamente eficaces cuando se usan para tratar animales que parecen ELA, y que la administración de tales anticuerpos reduce la debilitación de los músculos a los que se dirigen durante la patología de ELA, por ejemplo, diafragma, gastrocnemio, etc. Además, la presente divulgación desvela que estos antagonistas son altamente eficaces para aumentar la masa muscular y la resistencia de agarre en animales afectados con ELA. Como resultado, la divulgación enseña que los anticuerpos anti-GDF-8 de la invención son composiciones eficaces para tratar trastornos asociados con GDF-8, por ejemplo, ELA, trastornos de debilitamiento muscular u otros trastornos que resultan de la desregulación de GDF-8.

En el presente documento, en un aspecto se describe un procedimiento para tratar (por ejemplo, curar, suprimir, mejorar, o prevenir (por ejemplo, retrasar o prevenir el inicio, reparación o recaída de) un trastorno asociado con GDF-8 en un sujeto. El procedimiento incluye: administrar al sujeto un antagonista de GDF-8, por ejemplo, un anticuerpo anti-GDF-8, en una cantidad suficiente para tratar o prevenir el trastorno asociado con GDF-8. El antagonista de GDF-8, por ejemplo, el anticuerpo anti-GDF-8, se puede administrar al sujeto solo o en combinación con otras modalidades terapéuticas tal como se describe en el presente documento. El anticuerpo GDF-8 se puede administrar por vía terapéutica, por vía profiláctica, o por ambas. En una realización, el sujeto es un mamífero, por ejemplo, un ser humano que padece un trastorno asociado con GDF-8, que incluye, por ejemplo, trastornos óseos y musculares. Preferentemente, el sujeto es un ser humano. Más preferentemente, el sujeto es un ser humano que padece un trastorno asociado con GDF-8 tal como se describe en el presente documento.

En el presente documento se proporcionan procedimientos terapéuticos seguros y eficaces para el diagnóstico, pronóstico, control, identificación sistemática, tratamiento, mejora, y/o prevención de trastornos asociados con GDF-8, por ejemplo, trastornos musculares, trastornos neuromusculares, trastornos degenerativos de hueso, o trastornos óseos metabólicos o inducidos, trastornos adiposos, trastornos del metabolismo de la glucosa, o trastornos relacionados con la insulina que incluyen, pero no se limitan a, homeostasis de la glucosa, diabetes de tipo 2, tolerancia alterada a la glucosa, síndrome metabólico (es decir, un síndrome que implica la aparición simultánea de un grupo de afecciones en la salud, que pueden incluir resistencia a la insulina, obesidad abdominal, dislipidemia, hipertensión, inflamación crónica, un estado protrombótico, etc., que sitúa a una persona en un alto riesgo de diabetes de tipo 2 y/o enfermedad cardíaca), resistencia a la insulina (por ejemplo, resistencia inducida por traumatismos tales como quemaduras o desequilibrio de nitrógeno), trastornos del tejido adiposo (por ejemplo, obesidad, dislipidemia, enfermedad del hígado graso no alcohólico, etc.), debilitamiento muscular inducido por VIH, distrofia muscular (incluyendo distrofia muscular de Duchenne), esclerosis lateral amiotrófica ("ELA"), atrofia

- muscular, atrofia de órganos, debilidad, enfermedad pulmonar obstructiva congestiva, sarcopenia, caquexia, síndromes de debilitamiento muscular, osteoporosis, osteoartritis, enfermedades óseas metabólicas, y trastornos óseos metabólicos (incluyendo masa ósea reducida debido a terapia crónica con glucocorticoides, insuficiencia de gónadas prematura, supresión de andrógenos, deficiencia de vitamina D, hiperparatiroidismo secundario, deficiencias nutricionales, y anorexia nerviosa). También se proporcionan procedimientos terapéuticos seguros y eficaces para el diagnóstico, pronóstico, control, identificación sistemática, tratamiento, mejora, y/o prevención de un trastorno asociado con GDF-8, por ejemplo, un trastorno muscular en vertebrados, en particular en mamíferos, y más particularmente en seres humanos. El trastorno asociado con GDF-8 más preferente, por ejemplo, trastorno muscular, que se diagnostica, pronostica, controla, identifica sistemáticamente, trata, mejora, y/o previene es la ELA.
- 5
- 10 En el presente documento también se proporcionan procedimientos para inhibir la función de GDF-8 *in vivo* o *in vitro*. Estos procedimientos son útiles para tratar trastornos asociados con GDF-8, por ejemplo, trastornos degenerativos musculares y óseos, en particular trastornos musculares tales como ELA, y para aumentar la masa muscular y/o resistencia ósea y/o densidad. Los procedimientos también son útiles para aumentar la masa muscular y la densidad ósea en animales normales que incluyen, pero no se limitan a, seres humanos. Los procedimientos objeto se pueden usar *in vitro* (por ejemplo, en un sistema libre de células, en cultivo, etc.), *ex vivo*, o *in vivo*. Por ejemplo, células que expresan receptores de GDF-8 se pueden cultivar *in vitro* en medio de cultivo y poner en contacto, por ejemplo, con uno o más anticuerpos anti-GDF-8, por ejemplo, tal como se describe en el presente documento. Como alternativa, el procedimiento se puede realizar en células presentes dentro de un sujeto, por ejemplo, como parte de un protocolo *in vivo* (por ejemplo, terapéutico o profiláctico).
- 15
- 20 Por consiguiente, en un aspecto, la divulgación presenta un anticuerpo antagonista de GDF-8 que interactúa con, por ejemplo, se une a, y neutraliza y/o inhibe, GDF-8. En particular, la proteína GDF-8 unida por el anticuerpo GDF-8 es de mamífero, por ejemplo, GDF-8 de ser humano, oveja, primate no humano. En otra realización, la invención proporciona anticuerpos que se unen a GDF-8 con alta afinidad, por ejemplo, con una Kd de al menos 10^{-11} M o afinidad más elevada. La afinidad y la cinética de unión del anticuerpo anti-GDF-8 se pueden someter a ensayo usando varios procedimientos conocidos, por ejemplo, tecnología de biosensor (Biacore, Piscataway, NJ).
- 25
- En una realización, el anticuerpo anti-GDF-8 (por ejemplo, un anticuerpo intacto o un fragmento de anticuerpo (por ejemplo, un fragmento de Fab, F(ab')₂, Fv o un fragmento de Fv de una sola cadena)) es un anticuerpo monoclonal. El anticuerpo puede ser un anticuerpo humano, humanizado, quimérico, o un anticuerpo generado *in vitro*. El anticuerpo anti-GDF-8 de la invención es un anticuerpo humanizado.
- 30
- 35 Estos anticuerpos anti-GDF-8 se pueden usar para diagnosticar, pronosticar, controlar, identificar sistemáticamente, tratar, mejorar, y/o prevenir trastornos musculares, óseos, adiposos y relacionados con el metabolismo de la glucosa. En el presente documento un ejemplo no limitante de un anticuerpo anti-GDF-8 se denomina "RK35", e incluye anticuerpos tanto de ratón como modificados, por ejemplo, formas quiméricas o humanizadas. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos para la región variable de cadena pesada de RK35 de ratón son tal como se establece en el presente documento como SEC ID N°: 2 y SEC ID N°: 3, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos para la región variable de cadena pesada de RK35 humanizado se establecen en el presente documento como SEC ID N°: 6 y SEC ID N°: 7, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos para la región variable de cadena ligera de RK35 de ratón se establecen en el presente documento como SEC ID N°: 4 y SEC ID N°: 5, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos para la región variable de cadena ligera de RK35 humanizado se establecen en el presente documento como SEC ID N°: 8 y SEC ID N°: 9, respectivamente.
- 40
- 45 El anticuerpo de la invención es un anticuerpo humanizado para GDF-8. En una realización más preferente de la invención, el anticuerpo está formado por el dominio de VH que se establece en la SEC ID N°: 7 y el dominio de VL que se establece en la SEC ID N°: 9. En el presente documento también se describen realizaciones adicionales que comprenden uno o más dominios de VH o VL enumerados en la Tabla 1.
- Otras realizaciones de la presente divulgación comprenden un fragmento H3 de RK35, es decir, la secuencia que se establece como SEC ID N°: 12. En otra realización de la presente divulgación, un antagonista de GDF-8 comprende una, dos, o tres regiones que determinan la complementariedad (CDR) de una región variable de cadena pesada de un anticuerpo que se desvela en el presente documento con secuencias seleccionadas entre las SEC ID N°s: 10-12 y 20-22. En otra realización de la presente divulgación, un antagonista de la invención comprende una, dos, o tres CDR de una región variable de cadena ligera de un anticuerpo que se desvela en el presente documento con secuencias seleccionadas entre las SEC ID N°s: 13-15 y 23-25. En otra realización que se describe o se reivindica en el presente documento, el anticuerpo comprende una, dos, tres, cuatro, cinco, o seis CDR con secuencias seleccionadas entre las SEC ID N°s: 10-15 y 20-25.
- 50
- 55 Las cadenas pesadas y ligeras de un anticuerpo anti-GDF-8 pueden ser de longitud total (por ejemplo, un anticuerpo puede incluir al menos una, y preferentemente dos, cadenas pesadas completas, y al menos una, y preferentemente dos, cadenas ligeras completas) o pueden incluir un fragmento de unión a antígeno (por ejemplo, un fragmento de Fab, F(ab')₂, Fv o un fragmento de Fv de una sola cadena ("scFv")). La región constante de cadena pesada del anticuerpo se puede elegir adicionalmente entre, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD, e IgE, se puede elegir en particular entre, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4, más particularmente, IgG1 (por ejemplo,
- 60

- IgG1 humana). La región constante de cadena ligera del anticuerpo se puede elegir entre, por ejemplo, kappa o lambda, particularmente kappa (por ejemplo, kappa humana). En una realización, la región constante está alterada, por ejemplo, mutada, para modificar las propiedades del anticuerpo (por ejemplo, para aumentar o disminuir uno o más de: unión al receptor de Fc, glicosilación de anticuerpo, el número de restos de cisteína, función celular efectora, o función de complemento). Por ejemplo, la región constante de IgG1 humana se puede mutar a uno o más restos, por ejemplo, uno o más de los restos 117 y 120 de la SEC ID N°: 19. En una realización, el anticuerpo anti-GDF-8 comprende la región constante de IgG1 humana mostrada en la SEC ID N°: 19. En otra realización, el anticuerpo anti-GDF-8 comprende una secuencia kappa humana, por ejemplo, la secuencia mostrada como la SEC ID N°: 17.
- En el presente documento también se proporcionan anticuerpos GDF-8 como nuevos fragmentos de anticuerpo que se unen a GDF-8 y mantienen la capacidad de neutralizar o reducir la actividad de GDF-8. El fragmento de anticuerpo se puede seleccionar entre el grupo que consiste en un fragmento de dAb, un diacuerpo, un fragmento de Fd, un fragmento de Fab, un fragmento de F(ab')₂, un fragmento de scFV, y un fragmento de Fv. El fragmento de anticuerpo se puede codificar con un polinucleótido seleccionado entre las SEC ID N°s: 2, 4, 6 o 8. El fragmento de anticuerpo puede comprender una secuencia de aminoácidos seleccionada entre una secuencia de aminoácidos que se establece en las SEC ID N°s: 10-15 y 20-25. En el presente documento se proporcionan nuevos fragmentos de anticuerpo que difieren en la secuencia (por ejemplo, debido a la redundancia del código genético) de esas secuencias que se enumeran en la Tabla 1, aunque mantienen la capacidad de unirse a GDF-8 y neutralizar o reducir la actividad de GDF-8.
- El anticuerpo anti-GDF-8 puede comprender al menos una, dos, tres o cuatro regiones de unión a antígeno, por ejemplo, regiones variables, que tienen una secuencia de aminoácidos tal como se enumera en la Tabla 1 (SEC ID N°s: 3 o 7 para VH, y/o SEC ID N°s: 5 o 9 para VL), o una secuencia básicamente idéntica al mismo (por ejemplo, una secuencia idéntica al mismo en al menos aproximadamente un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 99 % o superior, o que difiere en no más de 1, 2, 5, 10 o 15 restos de aminoácidos de las SEC ID N°s: 3, 5, 7 o 9). El anticuerpo pueden incluir un dominio de VH y/o VL codificado por un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos tal como se enumera en la Tabla 1 (SEC ID N°s: 2 o 6 para VH, y/o SEC ID N°s: 4 o 8 para VL), o una secuencia básicamente idéntica al mismo (por ejemplo, una secuencia idéntica al mismo en aproximadamente un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 99 % o superior, o que difiere en no más de 3, 6, 15, 30 o 45 nucleótidos de las SEC ID N°s: 2, 4, 6, o 8). El anticuerpo puede comprender una, dos, o tres CDR de una región variable de cadena pesada que tiene secuencias de aminoácidos tal como se enumera en la Tabla 1 (SEC ID N°s: 10-12 y 20-22), o una secuencia básicamente homóloga al mismo (por ejemplo, una secuencia idéntica al mismo en al menos aproximadamente un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 99 % o superior, y/o que tiene una o más sustituciones, por ejemplo, sustituciones conservadas). Además, el anticuerpo puede comprender al menos una, dos, o tres CDR de una región variable de cadena ligera que tiene secuencias de aminoácidos tal como se enumera en la Tabla 1 (SEC ID N°s: 13-15 y 23-25), o una secuencia básicamente homóloga al mismo (por ejemplo, una secuencia idéntica al mismo en al menos aproximadamente un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 99 % o superior, y/o que tiene una o más sustituciones, por ejemplo, sustituciones conservadas). El anticuerpo también puede comprender una, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR de regiones variables de cadena pesada y ligera que tiene secuencias de aminoácidos tal como se enumera en la Tabla 1 (SEC ID N°s: 10-12 y 20-22 para las CDR de VH; y SEC ID N°s: 13-15 y 23-25 para las CDR de VL), o una secuencia básicamente homóloga al mismo (por ejemplo, una secuencia idéntica al mismo en al menos aproximadamente un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 99 % o superior, y/o que tiene una o más sustituciones, por ejemplo, sustituciones conservadas).
- El anticuerpo anti-GDF-8 que se describe o se reivindica en el presente documento puede comprender una región constante de IgG1 humana que tienen una secuencia de aminoácidos tal como se establece en la SEC ID N°: 19 o una secuencia básicamente homóloga al mismo (por ejemplo, una secuencia idéntica al mismo en al menos aproximadamente un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 99 % o superior, o que difiere en no más de 1, 2, 5, 10, 50, o 100 restos de aminoácidos de la SEC ID N°: 19). El anticuerpo anti-GDF-8 también puede comprender una cadena constante kappa humana, por ejemplo, una cadena constante kappa humana que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se establece en la SEC ID N°: 17 o una secuencia básicamente homóloga al mismo (por ejemplo, una secuencia idéntica al mismo en al menos aproximadamente un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 99 % o superior, o que difiere en no más de 1, 2, 5, 10, 20, o 50 restos de aminoácidos de la SEC ID N°: 17). Además, el anticuerpo puede comprender una región constante de IgG1 humana y una cadena constante kappa humana tal como se describe en el presente documento.
- En el presente documento también se describen y/o reivindican anticuerpos codificados por polinucleótidos que se establecen en la SEC ID N°: 2, 4, 6, o 8. En el presente documento se proporcionan anticuerpos codificados por secuencias de polinucleótidos que se hibridan en condiciones rigurosas con los polinucleótidos que se establecen en las SEC ID N°s: 2, 4, 6, o 8. En otra realización preferente, en el presente documento se proporcionan anticuerpos codificados por polinucleótidos, que difieren de las secuencias que se establecen en las SEC ID N°s: 2, 4, 6, o 8, pero debido a la degeneración del código genético, codifican una secuencia de aminoácidos que se establece en las SEC ID N°s: 3, 5, 7, 9, o 10-15.

El antagonista de GDF-8, por ejemplo, un anticuerpo anti-GDF-8, se puede derivatizar o unir a otra molécula funcional, por ejemplo, otro péptido o proteína (por ejemplo, un fragmento de Fab). Por ejemplo, una proteína de fusión o un anticuerpo, o parte de unión a antígeno, se puede unir funcionalmente (por ejemplo, por acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otro modo) a una de otras entidades moleculares más, tales como un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico o uno multiespecífico), toxinas, radioisótopos, agentes citotóxicos o citostáticos, entre otros.

Un aspecto adicional de la invención proporciona como antagonistas de GDF-8 polinucleótidos purificados y aislados que codifican los anticuerpos anti-GDF-8 de la invención. En una realización, la invención proporciona polinucleótidos formados por una secuencia que codifica una VH (SEC ID N°: 3 o SEC ID N°: 7), VL (SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 9), y/o CDR (SEC ID N°s: 10-15 y 20-25) tal como se enumera en la Tabla 1. En el presente documento también se proporcionan polinucleótidos que se hibridan en condiciones rigurosas a ácidos nucleicos que codifican una VH, VL, o CDR (SEC ID N°s: 3, 5, 7, 9, 10-15, o 20-25) tal como se enumera en la Tabla 1. También se proporcionan ácidos nucleicos que comprenden las SEC ID N°s: 2, 4, 6, o 8 o fragmentos de las SEC ID N°s: 2, 4, 6, o 8. También se proporcionan polinucleótidos que se hibridan en condiciones rigurosas a las SEC ID N°s: 2, 4, 6 o 8. Otro aspecto de la invención proporciona células huésped y vectores que comprenden los polinucleótidos de la invención como antagonistas de GDF-8.

Los anticuerpos de la invención poseen una serie de propiedades útiles. En primer lugar, los anticuerpos son capaces de unirse a GDF-8 maduro con alta afinidad. En segundo lugar, los anticuerpos desvelados inhiben la actividad de GDF-8 *in vitro* e *in vivo*. En tercer lugar, los anticuerpos desvelados inhiben la actividad de GDF-8 asociada con la regulación negativa de la masa del músculo esquelético y densidad ósea. En cuarto lugar, los anticuerpos que se desvelan son un tratamiento eficaz para trastornos musculares, en particular ELA. Estos anticuerpos tienen muchos usos adicionales, que incluyen diagnóstico, pronóstico, control, identificación sistemática, tratamiento, mejora, y/o prevención de trastornos asociados con GDF-8, por ejemplo, trastornos musculares y/o asociados a hueso.

Otros aspectos de la invención proporcionan composiciones formadas por un anticuerpo anti-GDF-8 de la invención, y el uso de tales composiciones en la inhibición o neutralización de GDF-8 en animales, en particular en seres humanos u otros animales con trastornos musculares tales como ELA. Los anticuerpos de la invención también se pueden usar en un trastorno asociado con GDF-8, por ejemplo, en un trastorno en el que se desea aumentar el tejido muscular o la densidad ósea. Por ejemplo, los anticuerpos anti-GDF-8 se pueden usar en terapias y composiciones para reparar el músculo dañado, por ejemplo, miocardio, diafragma, etc. Los trastornos y enfermedades asociados con GDF-8 a modo de ejemplo tratados con los procedimientos y composiciones que se desvelan incluyen trastornos musculares y neuromusculares tales como distrofia muscular (incluyendo distrofia muscular de Duchenne); esclerosis lateral amiotrófica; atrofia muscular; atrofia de órganos; debilidad; síndrome del túnel; enfermedad pulmonar obstructiva congestiva (EPOC); sarcopenia, caquexia, y otros síndromes de debilitamiento muscular; trastornos del tejido adiposo (por ejemplo, obesidad); diabetes de tipo 2; tolerancia alterada a la glucosa; síndromes metabólicos (por ejemplo, síndrome X); resistencia a la insulina (incluyendo resistencia inducida por traumatismos, por ejemplo, quemaduras o desequilibrio de nitrógeno), y enfermedades degenerativas del hueso (por ejemplo, osteoartritis y osteoporosis). En una realización preferente, pero no limitante, de la invención, una composición que contiene un anticuerpo anti-GDF-8 es para buscar un procedimiento para tratar, de reducir, o mejorar la ELA.

En otro aspecto, la invención proporciona composiciones, por ejemplo, composiciones farmacéuticas, que incluyen un vehículo farmacéuticamente aceptable y al menos un anticuerpo anti-GDF-8 que se reivindica en el presente documento. En una realización, las composiciones, por ejemplo, composiciones farmacéuticas, comprende una combinación de dos o más de los anticuerpos anti-GDF-8 mencionados anteriormente. Además, dentro del ámbito de la invención se encuentran combinaciones del anticuerpo anti-GDF-8 con un agente terapéutico, por ejemplo, inhibidores del factor de crecimiento, inmunosupresores, agentes antiinflamatorios (por ejemplo, agentes antiinflamatorios sistémicos), inhibidores metabólicos, inhibidores enzimáticos, y/o agentes citotóxicos o citostáticos.

En otra realización más, el anticuerpo anti-GDF-8, o una composición farmacéutica del mismo, se administra solo o en terapia de combinación, es decir, combinado con otros agentes, por ejemplo, agentes terapéuticos, que son útiles para el tratamiento de trastornos asociados con GDF-8.

Además del uso en el tratamiento de diversas enfermedades o trastornos, se pueden usar anticuerpos anti-GDF-8 como herramientas de diagnóstico para detectar de forma cuantitativa o cualitativa proteína o fragmentos de proteína GDF-8 en una muestra biológica. La presencia o cantidad de proteína GDF-8 detectadas se puede correlacionar con una o más de las aplicaciones médicas que se enumeran en el presente documento. Por lo tanto, en el presente documento se proporcionan procedimientos para diagnosticar, pronosticar, controlar, y/o identificar sistemáticamente trastornos asociados con GDF-8.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento para detectar la presencia de GDF-8 en una muestra *in vitro* (por ejemplo, una muestra biológica, tal como suero, plasma, tejido, biopsia). El procedimiento objeto se puede usar para diagnosticar un trastorno asociado con GDF-8, por ejemplo, un trastorno óseo, muscular, adiposo o asociado con el metabolismo de la glucosa. El procedimiento incluye: (i) poner en contacto la muestra o

una muestra de control con un anticuerpo anti-GDF-8 tal como se describe en el presente documento; y (ii) detectar la formación de un complejo entre el anticuerpo anti-GDF-8, y la muestra o la muestra de control, en la que un cambio básicamente significativo en la formación del complejo en la muestra con respecto a la muestra de control es indicativo de la presencia de GDF-8 en la muestra.

- 5 En otro aspecto más, la presente divulgación proporciona un procedimiento para detectar la presencia de GDF-8 *in vivo* en un sujeto (por ejemplo, formación de imágenes *in vivo* en un sujeto). El procedimiento objeto se puede usar para diagnosticar un trastorno asociado con GDF-8, por ejemplo, ELA. El procedimiento incluye: (i) administrar un anticuerpo anti-GDF-8 tal como se describe en el presente documento a un sujeto o un sujeto de control en condiciones que permitan la unión del anticuerpo a GDF-8; y (ii) detectar la formación de un complejo entre el anticuerpo y GDF-8, en el que una diferencia básicamente significativa en la formación del complejo en el sujeto con respecto al sujeto de control proporciona una indicación relacionada con la presencia de GDF-8.

10 Otras realizaciones de la divulgación proporcionan un procedimiento para diagnosticar o detectar si un paciente está padeciendo un trastorno asociado con GDF-8 (por ejemplo, trastorno muscular, trastorno neuromuscular, trastorno degenerativo óseo, trastorno óseo metabólico o inducido, trastorno adiposo, trastorno del metabolismo de la glucosa, o trastorno relacionado con la insulina) que comprende las etapas de: (a) obtener una muestra de un paciente de interés; (b) poner en contacto la muestra con un anticuerpo anti-GDF-8 tal como se describe en el presente documento; (c) determinar el nivel de GDF-8 presente en la muestra del paciente; y (d) comparar el nivel de GDF-8 en la muestra del paciente con el nivel de GDF-8 en una muestra de control, en el que un aumento básico, disminución, o similitud en el nivel de GDF-8 en la muestra del paciente en comparación con el nivel de GDF-8 en la muestra de control indica si el paciente está padeciendo un trastorno asociado con GDF-8.

15 Otra realización adicional de la divulgación es un procedimiento para diagnosticar o detectar si un paciente está padeciendo un trastorno asociado con GDF-8 que se describe en el presente documento comprende las etapas de: (a) obtener una primera muestra tomada del paciente de interés; (b) poner en contacto la primera muestra con un anticuerpo anti-GDF-8 tal como se describe en el presente documento; (c) determinar el nivel de un GDF-8 en la primera muestra; (d) obtener una segunda muestra de un individuo afectado con el trastorno asociado con GDF-8; (e) poner en contacto la segunda muestra con un anticuerpo anti-GDF-8 tal como se describe en el presente documento; (f) determinar el nivel de GDF-8 en la segunda muestra; y (g) comparar los niveles de GDF-8 en la primera y segunda muestras, en el que un aumento básico, disminución, o similitud en el nivel de la primera muestra en comparación con la segunda muestra indica si el paciente está padeciendo un trastorno asociado con GDF-8 causado (en parte o en su totalidad) por la sobreexpresión de GDF-8. Por ejemplo, un aumento en el nivel de GDF-8 en la primera muestra en comparación con la segunda muestra puede indicar que el paciente está padeciendo el trastorno asociado con GDF-8. Por el contrario, una disminución o similitud en el nivel de GDF-8 en la primera muestra en comparación con la segunda muestra puede indicar que el paciente no está padeciendo el trastorno asociado con GDF-8.

25 Los anticuerpos de la invención también son útiles en procedimientos para pronosticar la probabilidad de que un paciente desarrolle un trastorno asociado con GDF-8, por ejemplo, un trastorno muscular, trastorno neuromuscular, trastorno degenerativo óseo, trastorno óseo metabólico o inducido, trastorno adiposo, trastorno del metabolismo de la glucosa, o trastorno relacionado con la insulina. En una realización preferente, pero no limitante, de la divulgación, el procedimiento comprende las etapas de: (a) obtener una primera muestra del paciente de interés; (b) poner en contacto la primera muestra con un anticuerpo anti-GDF-8 tal como se describe en el presente documento; (c) determinar el nivel de GDF-8 en la primera muestra; (d) obtener una segunda muestra de un individuo no afectado con el trastorno asociado con GDF-8; (e) poner en contacto la segunda muestra con un anticuerpo anti-GDF-8 tal como se describe en el presente documento; (f) determinar el nivel de GDF-8 en la segunda muestra; y (g) comparar los niveles de GDF-8 en la primera y segunda muestras, en el que un aumento, disminución, o similitud en el nivel de GDF-8 en la primera muestra en comparación con la segunda muestra indica la probabilidad de que el paciente desarrolle el trastorno asociado con GDF-8. Por ejemplo, para un trastorno asociado con GDF-8 causado (en parte o en su totalidad) por la sobreexpresión de GDF-8, es probable que el paciente desarrolle el trastorno asociado con GDF-8 si la primera muestra presenta un aumento del nivel de GDF-8 en comparación con la segunda muestra. Por el contrario, para un trastorno asociado con GDF-8 causado (en parte o en su totalidad) por la sobreexpresión de GDF-8, es improbable que el paciente desarrolle el trastorno asociado con GDF-8 si la primera muestra tiene un nivel disminuido o similar de GDF-8 en comparación con la segunda muestra.

35 Los anticuerpos de la invención también son útiles en procedimientos para controlar la gravedad de un trastorno asociado con GDF-8, por ejemplo, trastorno muscular, trastorno neuromuscular, trastorno degenerativo óseo, trastorno óseo metabólico o inducido, trastorno adiposo, trastorno del metabolismo de la glucosa, o trastorno relacionado con la insulina. En una realización preferente, pero no limitante, de la divulgación, el procedimiento comprende las etapas de: (a) obtener una primera muestra tomada de un paciente de interés en un primer punto temporal; (b) poner en contacto la primera muestra con un anticuerpo anti-GDF-8 tal como se describe en el presente documento; (c) determinar el nivel de GDF-8 en la primera muestra; (d) obtener una segunda muestra tomada del paciente en un segundo punto temporal; (e) poner en contacto la segunda muestra con un anticuerpo anti-GDF-8 tal como se describe en el presente documento; (f) determinar el nivel de GDF-8 en la segunda muestra; y (g) comparar los niveles de GDF-8 en la primera y segunda muestras, en el que un aumento, disminución, o similitud en el nivel de GDF-8 en la segunda muestra indica si ha cambiado la gravedad del trastorno asociado con

GDF-8. En una realización de la divulgación, un procedimiento para el control de la invención se usa para controlar la ELA, y una disminución en el nivel de GDF-8 en la segunda muestra indica que la gravedad de la ELA ha disminuido.

5 Un procedimiento adicional para controlar un trastorno tal como se describe en el presente documento comprende las etapas de: (a) obtener una primera muestra del paciente de interés; (b) poner en contacto la primera muestra con un anticuerpo anti-GDF-8 tal como se describe en el presente documento; (c) determinar el nivel de GDF-8 en la primera muestra; (d) obtener una segunda muestra de un individuo no afectado con a trastorno muscular, trastorno neuromuscular, trastorno degenerativo óseo, trastorno óseo metabólico o inducido, trastorno adiposo, trastorno del metabolismo de la glucosa, o trastorno relacionado con la insulina; (e) poner en contacto la segunda muestra con un anticuerpo anti-GDF-8 tal como se describe en el presente documento; (f) determinar el nivel de GDF-8 en la segunda muestra; y (g) comparar los niveles de GDF-8 en la primera y segunda muestras, en el que un aumento, disminución, o similitud en el nivel de GDF-8 en la primera muestra en comparación con la segunda muestra indica la gravedad del trastorno de GDF-8 en ese punto. En una realización de la divulgación, un procedimiento para el control de la invención se usa para controlar ELA, y una disminución o similitud en el nivel de GDF-8 en la primera muestra en comparación con la segunda muestra indica que la ELA tiene una gravedad baja.

Preferentemente, el anticuerpo se marca directa o indirectamente con una sustancia detectable para facilitar la detección del anticuerpo unido o no unido. Las sustancias detectables adecuadas incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes y materiales radiactivos.

20 En el presente documento también se desvelan procedimientos para administrar o dirigir un antagonista de la invención, por ejemplo, un anticuerpo, a una célula que expresa GDF-8 *in vivo*.

En el presente documento también se describen kits que comprenden los antagonistas de GDF-8, por ejemplo, los anticuerpos anti-GDF-8, de la invención para usos terapéuticos y diagnósticos.

25 Los objetos adicionales de la invención se establecerán en la siguiente descripción. Diversos objetos, aspectos, y ventajas de la invención se observarán y conseguirán por medio de los elementos y combinaciones señalados en particular en las reivindicaciones.

Debe apreciarse que tanto la descripción general anterior y la siguiente descripción detallada son solamente a modo de ejemplo y explicación, and no son restrictivas de la invención tal como se reivindica.

Breve descripción de las figuras

30 FIG. 1. Caracterización del anticuerpo anti-GDF-8 de RK35. A. Unión directa del anticuerpo RK35 a GDF-8, tal como se mide con un ensayo de ELISA con GDF-8 biotinilado. Se determinó que la afinidad de unión del anticuerpo RK35 (círculos) hacia GDF-8 era 4 nM. La IgG de control no muestra unión apreciable (cuadrados). B. Efecto del anticuerpo RK35 en la unión de GDF-8 a su receptor de alta afinidad. En un ELISA de competición usando el receptor de GDF-8 de afinidad elevada, se usó ActRIIB para medir la actividad inhibidora de GDF-8 de RK35. La unión de GDF-8 biotinilado a la proteína ActRIIB quimérica humana inmovilizada fusionada con la región constante de IgG humana (Fc) se evaluó en ausencia (diamantes) o presencia de diversas concentraciones de mAb de RK35, ActRIIB soluble o IgG de control. Como controles positivo y negativo se usaron receptor de ActRIIB-Fc soluble (cuadrados) e IgG de ratón irrelevante (triángulos), respectivamente. RK35 (círculos) bloqueó la unión de GDF-8 biotinilado a ActRIIB inmovilizado con una $CI_{50} \sim 2,5$ nM. C. Inhibición de la destrucción de señal inducida por GDF-8. Células de rhabdomyosarcoma que expresan gen de fusión de promotor de TGF- β -luciferasa se trataron con 10 ng/ml de GDF-8 en ausencia (cuadrados) o presencia (círculos) de concentraciones variables de anticuerpo RK35. RK35 redujo la inducción de GDF-8 de la actividad de luciferasa de una manera de respuesta a la dosis, con una CI_{50} de 0,2 nM. La señal de fondo (diamantes) se midió sin GDF-8 añadido.

45 **FIG. 2.** La inhibición de miostatina conduce a un aumento del peso corporal y un aumento de la masa muscular tanto en ratones como en ratas SODG93A. **A.** Pesos corporales de ratones SODG93A transgénicos tratados con RK35 (cuadrados) (n = 11) y tratados con PBS (diamantes) (n = 11) y ratones de control de la camada tratados con PBS (tipo silvestre) (triángulos) (n = 9). **B.** Pesos corporales de ratas SODG93A transgénicas macho (círculos) y hembra (triángulos) tratadas con RK35 y macho (cuadrados) y hembra (diamantes) tratados con PBS (n = 10 por grupo). **C.** Masa muscular de SODG93A tratados con RK35 y tratados con PBS y ratones de control de la camada tratados con PBS (n = 9-12) durante el estadio inicial de la enfermedad. Los pesos en húmedo se determinaron para los músculos gastrocnemio (gastroc), tibial craneal (tibial), cuádriceps (cuad) y diafragma (diafragma) de ratones de tipo silvestre de 88 días de edad tratados con PBS (barras de color negro), ratones SODG93A tratados con PBS (barras de color blanco), y ratones SODG93A tratados con RK35 (barras de color gris). **D.** Masa muscular de ratas SODG93A, tratadas con PBS (barras de color blanco) o RK35 (barras de color gris), en el estadio inicial de la enfermedad (~95 días) (n = 7 por grupo). **E.** Masa muscular de ratones de tipo silvestre tratados con PBS (barras de color negro), ratones SODG93A tratados con PBS (barras de color blanco), y ratones SODG93A tratados con RK35 (barras de color gris) en el estadio tardío de la enfermedad (~134 días). **F.** Masa muscular de ratas SODG93A, tratadas con PBS (barras de color blanco) o RK35 (barras de color gris) en el estadio tardío de la enfermedad (~128 días). Los asteriscos (*) indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los grupos indicados.

FIG. 3. La inhibición de la miostatina aumenta la resistencia muscular en ratones y ratas SODG93A. **A.** Resistencia de la tensión de agarre en ratones de tipo silvestre tratados con PBS (triángulos), y ratones SODG93A tratados con cualquiera de PBS (diamantes) o RK35 (cuadrados) como una función de la edad. La resistencia de agarre de las extremidades posteriores se expresa como compresión en kilogramos (kg). **B.** Resistencia de agarre de las extremidades delanteras en ratones de tipo silvestre tratados con PBS (triángulos), y ratones SODG93A tratados con cualquiera de PBS (diamantes) o RK35 (cuadrados) como una función de la edad. **C.** Resistencia de agarre de las extremidades delanteras en ratas de tipo silvestre tratadas con PBS (WT + PBS), o ratas SODG93A tratadas con PBS (SOD + PBS) o RK35 (SOD + RK35). Para ratas, se tomaron medidas durante un intervalo de 4 semanas correspondiente a una fase inicial de la enfermedad, entre 95-110 días de edad. La resistencia de agarre de las extremidades delanteras se expresa como tensión en kilogramos (kg). Los asteriscos (*) indican una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,0001$) entre los grupos indicados.

FIG. 4. Efectos de la inhibición de la miostatina en la estructura muscular y función en roedores SODG93A. La tinción con hematoxilina y eosina del músculo gastrocnemio medio de ratones a los 88 días indica atrofia significativa en **(B)** ratones SODG93A tratados con PBS, en comparación con cualquiera de **(A)** ratones SODG93A de tipo silvestre o **(C)** tratados con RK35. La tinción con hematoxilina y eosina del músculo gastrocnemio medio de ratones SODG93A tanto **(E)** tratados con PBS como **(F)** tratados con RK35 en el estadio terminal indica tanto atrofia muscular significativa como núcleos colocados centralmente (puntas de flecha) en comparación con **(D)** gastrocnemio de ratón de tipo silvestre. Tinción con hematoxilina y eosina de diafragma de **(G)** ratones de tipo silvestre tratados con PBS y ratones SODG93A **(H)** tratados con PBS o **(I)** tratados con RK35, respectivamente, en el estadio terminal. Los ejemplos de miofibras atroficas se marcan ("a"). El asterisco en el panel H representa división de fibras. Las barras mostradas indican 50 μm en escala en los paneles A-F y 25 μm en los paneles G-I. Panel **J:** Patrón de interferencia de EMG que muestra estallidos de inspiración, registrados de los músculos del diafragma de ratas de tipo silvestre tratadas con PBS (WT + PBS) o ratas SODG93A tratadas con PBS (SOD + PBS) o RK35 (SOD + RK35). Panel **K:** Tasas de pico de estallido de EMG (en Hz) de los músculos del diafragma de ratas de tipo silvestre ($n = 4$), y de ratas SODG93A tratadas con vehículo (PBS, $n = 9$) o RK35 ($n = 8$). Los asteriscos (*) indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los grupos indicados.

FIG. 5. El tratamiento con RK35 muestra la disminución del diámetro de la fibra muscular en músculo gastrocnemio a través de enfermedad en estadio inicial en ratones SODG93A, y en diafragma a través de enfermedad en el estadio terminal. Los diámetros de las fibras se midieron por morfometría en el músculo gastrocnemio de ratones SODG93A tratados con PBS **(A)** y tratados con RK35 **(B)** y ratones de tipo silvestre tratados con PBS **(C)** a 88 días. Las medidas eran equitativamente diferentes por ANOVA ($p < 0,0001$); las comparaciones por pares mediante ensayo posterior de comparación múltiple de Tukey también eran significativas ($p < 0,001$). Hacia el estadio terminal, no se observaron diferencias significativas en la distribución de las fibras en el músculo gastrocnemio de ratones SODG93A tratados con PBS y tratados con RK35 (no se muestran los datos). **D.** Análisis de diámetros de fibras de músculo del diafragma de ratones SODG93A tratados con PBS y tratados con RK35 en estadio terminal en comparación con ratones de control de tipo silvestre emparejados por edad. El músculo del diafragma de ratones SODG93A tratados con RK35 muestra una distribución del diámetro de la fibra intermedia entre ratones SODG93A tratados con PBS y ratones de control de tipo silvestre en el estadio terminal. Las medias eran significativamente diferentes por ANOVA ($p < 0,0001$); las comparaciones por pares mediante ensayo posterior de comparación múltiple de Tukey también eran significativas ($p < 0,01$). Se analizaron tres músculos por grupo; se tomaron medidas lineales del diámetro máximo del eje menor de al menos doscientas fibras, usando software Axiovision de Zeiss. Los diámetros de las fibras se combinaron en intervalos de 20 μm , y se generaron histogramas de frecuencia para cada grupo muscular.

FIG. 6. Efecto del tratamiento anti-miostatina en pérdida de neuronas motoras en el asta ventral de la médula espinal. Se muestran análisis estereológicos de neuronas motoras grandes (área superior a 300 μm^2) de las regiones L3-5 del asta ventral de ratones SODG93A tratados con cualquiera de PBS (SOD + PBS) o RK35 (SOD + RK35) en el estadio inicial **(A)** y el estadio terminal **(C)** de la enfermedad en comparación con ratones de tipo silvestre emparejados por edad (WT + PBS). El tratamiento con RK35 mostró una tendencia hacia la inversión de la pérdida de neuronas motoras ($p = 0,08$) en el estadio inicial de la enfermedad **(A)**. Se realizaron recuentos individuales de neuronas motoras sanas grandes con nucleolos visibles en secciones de L3-5 teñidas con NISSL de ratones SODG93A tratados con cualquiera de PBS o RK35 en **(B)** el estadio inicial y **(D)** el estadio terminal de la enfermedad en comparación con ratones de tipo silvestre emparejados por edad. Para cada sección, se hizo recuento de ambas astas ventrales (total de 20 astas ventrales por animal) y los datos se representan como número medio de neuronas motoras grandes por asta ventral. Los asteriscos (*) indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,001$) entre los grupos indicados. Las imágenes representativas de secciones de asta ventral teñidas con NISSL (aumento de 20x) se muestran para **(E y H)** ratones de tipo silvestre tratados con PBS, **(F y I)** ratones SODG93A tratados con PBS, y **(G y J)** ratones SODG93A tratados con RK35 se analizaron en el estadio inicial (88 días) **(E-G)** y en el estado terminal de la enfermedad (134 días; **H-J**). La barra representa una escala de 200 μm .

FIG. 7. Formación de mapas de epítomos de GDF-8 para el anticuerpo RK35. Los sitios de unión en GDF-8 para RK35 se identificaron usando solapamiento de 13 aminoácidos de péptidos de GDF-8 humano. Los sitios de contacto de RK35 con GDF-8 se presentan en negrita.

FIG. 8. Alineación de las regiones variables de cadena ligera y de cadena pesada de RK35 (VL y VH, respectivamente) con los armazones de línea germinal humana DPK9 y DP-47, respectivamente. Los aminoácidos de las cadenas variables de RK35 murino (MRK35) que se cambian en las regiones de RK35 humanizado (HuRK35) se indican con un asterisco (*) y se presentan en negrita; las regiones que determinan la complementariedad de RK35 se presentan en la tabla y subrayadas.

Descripción detallada de la invención

I. Definiciones

"Anticuerpo", como se usa en el presente documento, se refiere a una inmunoglobulina o una parte de la misma, e incluye cualquier polipéptido que comprende un sitio de unión a antígeno independientemente de la fuente, especies de origen, procedimiento de producción, y características. Para los fines de la presente invención, también incluye, a menos que se indique de otro modo, fragmentos de anticuerpo tales como Fab, F(ab')₂, Fv, scFv, Fd, dAb, diacuerpos, y otros fragmentos de anticuerpo que mantienen la función de unión a antígeno. Se pueden preparar anticuerpos, por ejemplo, a través de técnicas tradicionales de hibridoma, procedimientos de ADN recombinante, o técnicas de presentación de fagos usando bibliotecas de anticuerpos. Para otras diversas técnicas de producción de anticuerpos, véase *Antibodies: A Laboratory Manual*, eds. Harlow y col., Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.

La expresión "dominio de unión a antígeno" se refiere a la parte de una molécula de anticuerpo que comprende el área que se une de forma específica o que es complementaria con una parte o todo un antígeno. Cuando un antígeno es grande, un anticuerpo solamente se puede unir a una parte en particular del antígeno. El "epítipo" o "determinante antigénico" es una parte de una molécula de antígeno que es responsable de interacciones con el dominio de unión a antígeno de un anticuerpo. Se puede proporcionar un dominio de unión a antígeno con uno o más dominios variables de anticuerpo (por ejemplo, un denominado fragmento de anticuerpo de Fd que consiste en un dominio de VH). Un dominio de unión a antígeno puede comprender una región variable de cadena ligera del anticuerpo (VL) y una región variable de cadena pesada del anticuerpo (VH).

El término "GDF-8" se refiere a un factor 8 de crecimiento y diferenciación específico, pero no a otros factores que se relacionan estructural o funcionalmente con GDF-8, por ejemplo, BMP-11 y otros factores que pertenecen a la superfamilia de TGF- β . El término se refiere a la forma precursora sin procesar de longitud completa de GDF-8 así como a las formas madura y propéptido que resultan de la escisión después de la traducción. El término también se refiere a cualquier fragmento y variante de GDF-8 que mantiene al menos alguna de las actividades biológicas asociadas con el GDF-8 maduro, tal como se analiza en el presente documento, incluyendo secuencias que se han modificado. La secuencia de aminoácidos del GDF-8 humano maduro se proporciona en la SEC ID N°: 1. La presente invención se refiere a GDF-8 de todas las especies de vertebrados, que incluyen, pero no se limitan a, ser humano, bovino, pollo, ratón, rata, porcino, ovino, pavo, babuino, y pescado (para información de secuencias, véase, por ejemplo, McPherron y col., mencionado anteriormente).

La expresión "actividad de GDF-8" se refiere a una o más actividades fisiológicamente reguladoras del crecimiento o morfogénicas asociadas con la proteína GDF-8 activa. Por ejemplo, GDF-8 activo es un regulador negativo de la masa del músculo esquelético. El GDF-8 activo también puede modular la producción de enzimas específicas del músculo (por ejemplo, creatina quinasa), estimular la proliferación de mioblastos, y modular la diferenciación de preadipocitos en adipocitos. En los Ejemplos se exponen procedimientos a modo de ejemplo para medir la actividad de GDF-8 *in vivo* e *in vitro*.

La expresión "antagonista de GDF-8" o "inhibidor de GDF-8" incluye cualquier agente capaz de inhibir la actividad, expresión, procesamiento, o secreción de GDF-8. Tales inhibidores incluyen macromoléculas y moléculas pequeñas, por ejemplo, proteínas, anticuerpos, péptidos, peptidomiméticos, ARNsi, ribozimas, oligonucleótidos antisentido, ARN bicatenario, y otras moléculas pequeñas, que inhiben GDF-8. Un antagonista de GDF-8 incluye, además de los anticuerpos que se proporcionan en el presente documento, un anticuerpo que inhibe de forma eficaz GDF-8, incluyendo anticuerpos con especificidad elevada para unirse a GDF-8 (por ejemplo, anticuerpos con una afinidad baja hacia otros miembros de la superfamilia de TGF- β (por ejemplo, BMP-11)). En los procedimientos para diagnosticar, pronosticar, controlar, tratar, mejorar, y prevenir de la invención se contemplan variantes, que incluyen variantes humanizadas, de estos anticuerpos. Se dice que tales inhibidores "inhiben", "disminuyen", o "reducen" la actividad biológica de GDF-8.

Los términos "neutralizar", "que neutraliza", y sus similares se refieren a una reducción o derogación drástica de la actividad de GDF-8 con respecto a la actividad de GDF-8 en ausencia del mismo inhibidor. Por ejemplo, se puede decir que una reducción de la actividad en un 75-100 % "neutraliza" la actividad de GDF-8.

El término "tratamiento" se usa de forma indistinta en el presente documento con la expresión "procedimiento terapéutico" y se refiere tanto a tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas/ preventivas. Los individuos con necesidad de tratamiento pueden incluir individuos que ya padecen un trastorno médico en particular así como los que pueden adquirir el trastorno en última instancia (es decir, los que necesitan medidas preventivas).

El término "aislado" se refiere a una molécula que se separa básicamente de su entorno natural. Por ejemplo, una proteína aislada es una que se separa básicamente de la fuente celular o tisular de la que se deriva.

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

La expresión "dosis eficaz", "dosis terapéuticamente eficaz", "cantidad eficaz", o similares se refiere a la cantidad de del compuesto que dar como resultado la mejora de los síntomas en un paciente o un resultado biológico deseado (por ejemplo, aumento de la masa del músculo esquelético y/o densidad ósea). Tal cantidad sería suficiente para reducir la actividad de GDF-8 asociará con la regulación negativa de la masa del músculo esquelético y la densidad ósea o con la homeostasis de la glucosa y metabolismo adiposo. La cantidad eficaz se puede determinar tal como se describe en el presente documento.

Un "trastorno asociado con la actividad de GDF-8", "trastorno asociado con GDF-8", "trastorno asociado con GDF-8" o similares se refiere a trastornos que pueden ser causados, totalmente buen parte, por la desregulación (por ejemplo, aumento o disminución de forma anómala) de GDF-8 (y/o actividad de GDF-8), y/o trastornos que se pueden tratar, mejorar, prevenir, diagnosticar, pronosticar, o controlar mediante la regulación y/o control de GDF-8 (y/o actividad de GDF-8). Trastornos asociados con GDF-8 incluyen trastornos musculares, trastornos neuromusculares, trastornos degenerativos óseos, trastornos óseos metabólicos o inducidos, trastornos adiposos, trastornos del metabolismo de la glucosa o trastornos relacionados con la insulina. Un trastorno asociado con GDF-8 de la invención preferente es la esclerosis lateral amiotrófica (ELA).

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 lo tanto, a menudo se consideran moléculas pequeñas los compuestos que tienen menos de mil daltons (por ejemplo, Voet y Voet, Biochemistry, 2ª ed., ed. N. Rose, Wiley and Sons, Nueva York, 14 (1995)). Por ejemplo, Davis y col. ((2005) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 5981-86) usan la expresión molécula pequeña para indicar folatos, metotrexato, y neuropéptidos, mientras que Halpin y Harbury ((2004) PLoS Biology 2: 1022-30) usan la expresión para indicar productos genéticos de molécula pequeña, por ejemplo, ADN, ARN y péptidos. Ejemplos de moléculas pequeñas naturales incluyen, pero no se limitan a, colesterolos, neurotransmisores, y ARNsi; las moléculas pequeñas sintetizadas incluyen, pero no se limitan a, diversos agentes químicos enumerados en numerosas bases de datos de moléculas pequeñas disponibles en el mercado, por ejemplo, FCD (Base de datos de Fine Chemicals), SMID (Bases de datos de Interacción de Moléculas Pequeñas), ChEBI (Entidades Químicas de Interés Biológico), y CSD (Base de datos de Estructuras de Cambridge) (véase, por ejemplo, Alfaro y col. (2005) Nuc. Acids Res. Database Issue 33: D416-24).

II. Anticuerpos Contra GDF-8 y Fragmentos de Anticuerpo

A. Anticuerpo de Ratón y Humanizado RK35

La presente divulgación proporciona nuevos anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos intactos y fragmentos de anticuerpos) que se unen de forma eficaz a GDF-8. Una realización ilustrativa no limitante de tal anticuerpo se denomina RK35. Esta realización a modo de ejemplo se proporciona en forma de anticuerpos de ratón y humanizados, y fragmentos de anticuerpos de los mismos.

El anticuerpo a modo de ejemplo de la divulgación, denominado en el presente documento "RK35", posee características únicas y beneficiosas. En primer lugar, este anticuerpo y fragmentos de anticuerpos son capaces de unirse a GDF-8 maduro con afinidad elevada. En segundo lugar, el anticuerpo y fragmentos de anticuerpos de la invención inhiben la actividad de GDF-8 *in vitro* e *in vivo* tal como se demuestra, por ejemplo, mediante la inhibición de la unión de ActRIIB y ensayos de gen indicador. En tercer lugar, el anticuerpo y fragmentos de anticuerpos desvelados son útiles para tratar síntomas asociados con un trastorno asociado con GDF-8, por ejemplo, trastornos musculares, en particular ELA, tal como se demuestra, por ejemplo, mediante el aumento de la masa muscular en ratones SOD mutantes tratados.

En una realización a modo de ejemplo, los antagonistas de GDF-8 son anticuerpos que se unen de forma eficaz a GDF-8 e inhiben una o más actividades asociadas con GDF-8. Un experto habitual en la materia reconocerá que los anticuerpos de la invención se pueden usar para detectar, medir, e inhibir proteínas GDF derivadas de diversas especies, por ejemplo, las que se describen en la presente memoria descriptiva. El porcentaje de identidad se determina mediante algoritmos convencionales de alineación tales como, por ejemplo, Herramienta de Búsqueda de Alineaciones Locales Básicas (BLAST) que se describe 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, el anticuerpo y fragmentos de anticuerpos de la invención se pueden usar con cualquier proteína que mantenga actividad biológica básica de GDF-8 y comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos aproximadamente un 70 %, un 80 %, un 90 %, un 95 %, o superior a cualquier secuencia de al menos 100, 80, 60, 40, 20, o 15 aminoácidos contiguos de la forma madura de GDF-8 que se expone en la SEC ID

Nº: 1.

B. Dominios Variables de Anticuerpos

Los anticuerpos intactos, también conocidos como inmunoglobulinas, por lo general son proteínas glicosiladas tetraméricas formadas por dos cadenas ligeras (L) de aproximadamente 25 kDa cada una, y dos cadenas pesadas (H) de aproximadamente 50 kDa cada una. Existen dos tipos de cadenas ligeras, denominadas lambda y kappa, en anticuerpos. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de las cadenas pesadas, las inmunoglobulinas asignan a cinco clases principales: A, D, E, G, y M, y varias de éstas se pueden dividir adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, e IgA₂. Cada cadena ligera está formada por un dominio (VL) variable (V) N-terminal y un dominio (CL) constante (C). Cada cadena pesada está formada por un dominio (VH) V N-terminal, 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 de marco conservado (FR1, FR2, FR3, y FR4), que forman un armazón para tres regiones de secuencias hipervariables (regiones que determinan la complementariedad, CDR). Las CDR contienen la mayor parte de los restos responsables de interacciones del anticuerpo con el antígeno. Las CDR se denominan CDR1, CDR2, y CDR3. Por consiguiente, los componentes de CDR en la cadena pesada se denominan H1, H2, y H3, mientras que los componentes de CDR en la cadena ligera se denominan L1, L2, y L3. La CDR3 es la mayor fuente de diversidad molecular dentro del sitio de unión al anticuerpo. H3, por ejemplo, puede ser tan corto como dos restos de aminoácidos o con más de 26 aminoácidos. Las estructuras subunitarias y las configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas en la técnica. Para una revisión de la estructura de anticuerpos, véase *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, eds. Harlow y col., 1988. Un experto en la materia reconocerá que cada estructura subunitaria, por ejemplo, una estructura de CH, VH, CL, VL, CDR, y/o FR, comprende fragmentos activos. Por ejemplo, los fragmentos activos pueden consistir en la parte de la subunidad de VH, VL, o CDR que se une al antígeno, es decir, el fragmento de unión a antígeno, o la parte de la subunidad de CH que se une y/o activa un receptor y/o complemento de Fc.

Los ejemplos no limitantes de fragmentos de unión incluyen dentro de la expresión "fragmento de anticuerpo" usada en el presente documento incluyen: (i) un fragmento de Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios de VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento de F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende los fragmentos de Fab unidos mediante un puente disulfuro a la región bisagra; (iii) un fragmento de Fd que consiste en los dominios de VH y CH1; (iv) un fragmento de Fv que consiste en los dominios de VL y VH de una sola rama de un anticuerpo, (v) un fragmento de dAb, que consiste en un dominio VH; y (vi) una CDR aislada. Además, aunque los dos dominios del fragmento de Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, se pueden unir de forma recombinante mediante un engarce sintético, creando una sola cadena de proteína en la que las regiones de VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocida como cadena de Fv individual (scFv)). El engarce usado más habitualmente es un péptido de (Gly₄Ser)₃ de 15 restos, pero también se conocen otros engarces en la técnica. También se pretende que anticuerpos de una sola cadena estén incluidos dentro del término "anticuerpo" o "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo. Estos anticuerpos se tienen usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia, y los fragmentos se identifican sistemáticamente para utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos.

Se crea diversidad de anticuerpos mediante genes de línea germinal múltiple que codifican regiones variables y la diversidad de sucesos somáticos. Los sucesos somáticos incluyen recombinación de segmentos de genes variables con segmentos de genes de diversidad (D) y unión (J) para preparar una región de VH completa, y la recombinación de segmentos de genes variantes y de unión para preparar una región de VL completa. El procedimiento de recombinación por sí mismo es impreciso, dando como resultado la pérdida o adición de aminoácidos en las uniones V(D)J. Estos mecanismos de diversidad se producen en el linfocito B en desarrollo antes de la exposición al antígeno. Después de estimulación antigénica, los genes de anticuerpo expresados en linfocitos B experimentan mutación somática. En base al número estimado de segmentos de genes de línea germinal, la recombinación aleatoria de estos segmentos, y el emparejamiento aleatorio de VH-VL, se pueden producir hasta $1,6 \times 10^7$ anticuerpos diferentes (*Fundamental Immunology*, 3^a ed. (1993), ed. Paul, Raven Press, Nueva York, NY). Cuando se tienen en cuenta otros procedimientos que contribuyan a la diversidad de anticuerpos (tal como mutación somática), se cree que se pueden generar más de 1×10^{10} anticuerpos diferentes (*Immunoglobulin Genes*, 2^a ed. (1995), eds. Jonio y col., Academic Press, San Diego, CA). Debido a los muchos procedimientos implicados en la generación de diversidad de anticuerpos, es improbable que anticuerpos monoclonales derivados de forma independiente con la misma especificidad de antígeno tengan secuencias de aminoácidos idénticas.

Por lo tanto, en el presente documento se describen y/o se reivindican nuevos anticuerpos que se unen a GDF-8. Los fragmentos de anticuerpos, por ejemplo, estructuras que contienen una CDR, por lo general serán una secuencia de cadena pesada o ligera del anticuerpo, o un fragmento activo de la misma, en la que la CDR se coloca en una posición que corresponde a la CDR de VH y VL de origen natural. Las estructuras y posiciones de los dominios variables de inmunoglobulina, por ejemplo, las CDR, se pueden definir usando esquemas de numeración bien conocidos, por ejemplo, el esquema de numeración de Kabat, el esquema de numeración de Chotia, una combinación de Kabat y Chotia (AbM), etc. (véase, por ejemplo, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Departamento de Salud y Servicios Humanos de Estados Unidos (1991), eds. Kabat y col.; Al-Lazikani y col. (1997) *J. Mol. Biol.* 273: 927-48).

Por lo tanto, la presente divulgación también proporciona nuevas CDR. La estructura para llevar una CDR por lo general será un polipéptido, por ejemplo, una secuencia de cadena pesada o ligera del anticuerpo o una porción básica de la misma, en la que la CDR está colocada en una posición que corresponde a la CDR de regiones VH y VL de origen natural. Las estructuras y posiciones de dominios variables de inmunoglobulinas se pueden determinar tal como se describe, por ejemplo, en Kabat y col., mencionado anteriormente y Al-Lazikani y col., mencionado anteriormente.

Las moléculas de anticuerpos (incluyendo fragmentos de anticuerpos) de la presente divulgación, es decir, moléculas de anticuerpos que antagonizan GDF-8, incluyen, pero no se limitan a, anticuerpo RK35 monoclonal de murino y sus variantes, específicamente la variante humanizada. Los antagonistas de GDF-8 de la invención incluyen, además de RK35, otros anticuerpos que se unen de forma eficaz a GDF-8, incluyendo anticuerpos con especificidad elevada para la unión a GDF-8 (por ejemplo, anticuerpos con una afinidad más baja para otros miembros de la superfamilia de TGF- β (por ejemplo, BMP-11)). En los procedimientos para diagnosticar, pronosticar, controlar, tratar, mejorar, y prevenir de la invención se contemplan variantes, incluyendo variantes humanizadas, de estos anticuerpos. Estas moléculas de anticuerpos deben ser útiles en la prevención o tratamiento de un trastorno asociado con GDF-8, por ejemplo, patologías relacionadas con los huesos, músculo, adiposas y del metabolismo de la glucosa. Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena ligera RK35 de murino y humanizado se establecen en las SEC ID N^{os}: 5 y 9, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada de RK35 murino y humanizado se establecen en las SEC ID N^{os}: 3 y 7, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las tres regiones que determinan la complementariedad (CDR) en las cadenas ligeras variables de RK35 murino y humanizado se establecen en las SEC ID N^{os}: 13, 14, 15, 23, 24, y 25. Las secuencias de aminoácidos de las tres CDR en las cadenas pesadas variables de RK35 murino y humanizado se establecen en las SEC ID N^{os}: 10, 11, 12, 20, 21, y 22.

Como se ha descrito anteriormente, las CDR contienen la mayor parte de los restos responsables de interacciones con un antígeno, y están contenidas dentro de los dominios de VH y VL, es decir, la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera, respectivamente. En consecuencia, con la condición de que un anticuerpo comprenda al menos una CDR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las secuencias de aminoácidos que se establecen en las SEC ID N^{os}: 10-15 y 20-25, o un fragmento de anticuerpo activo del mismo, es un anticuerpo de la presente divulgación, es decir, uno que se une a GDF-8 e interfiere con la señalización de GDF-8. Por lo tanto, una realización de la divulgación incluye polipéptidos, por ejemplo, anticuerpos, que contienen una o más CDR que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las secuencias de aminoácidos que se establecen en las SEC ID N^{os}: 10-15 y 20-25, o un fragmento activo de las mismas. En consecuencia, un experto en la materia reconocerá que los anticuerpos de la invención incluyen un anticuerpo en el que las CDR de la cadena de VL son las que se establecen en las SEC ID N^{os}: 13-15 y 23-25, o las CDR de la cadena de VH son las que se establecen en las SEC ID N^{os}: 10-12 y 20-22.

Un fragmento de unión a antígeno puede ser un fragmento de Fv, que consiste en dominios de VH y VL. Por lo tanto, un fragmento de Fv de RK35 puede constituir un anticuerpo, con la condición de que se una a GDF-8 e interfiera con la señalización de GDF-8. Un experto en la materia reconocerá que cualquier fragmento de anticuerpo que contiene un fragmento de Fv, por ejemplo, de RK35, también puede ser un anticuerpo de la divulgación. Además, cualquier fragmento de Fv, fragmento de scFv, fragmento de Fab, o fragmento de F(ab')₂, que contiene una o más CDR que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las secuencias de aminoácidos que se establecen en las SEC ID N^{os}: 10-15 y 20-25, también puede ser un anticuerpo de la divulgación.

Tales moléculas de anticuerpos se pueden producir con procedimientos bien conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, se pueden producir anticuerpos monoclonales con generación de hibridomas de acuerdo con procedimientos conocidos. A continuación, los hibridomas formados de esta manera se identifican sistemáticamente usando procedimientos convencionales, tales como ensayo de inmunoabsorción unido a enzimas (ELISA) y análisis de Biacore, para identificar uno o más hibridomas que producen un anticuerpo que se unía GDF-8, interfiere con la señalización de GDF-8, y neutraliza o inhibe una o más actividades asociadas con GDF-8. Como el inmunógeno se puede usar GDF-8 recombinante, GDF-8 de origen natural, cualquier variante de los mismos, y fragmentos de péptidos antigénicos de GDF-8. Un fragmento de péptido antigénico de GDF-8 comprende al menos siete restos de aminoácidos continuos e incluye un epítipo de modo que un anticuerpo generado contra el péptido forma un complejo con GDF-8. Preferentemente, el péptido antigénico comprende al menos 10 restos de aminoácidos, más preferentemente al menos 15 restos de aminoácidos, incluso más preferentemente al menos 20 restos de aminoácidos, y lo más preferentemente al menos 30 restos de aminoácidos. Además, es preferente que el fragmento de péptido antigénico de GDF-8 comprenda el sitio de unión al receptor de GDF-8.

Se pueden producir sueros y anticuerpos policlonales de la invención por inmunización de un sujeto adecuado con GDF-8, sus variantes, y/o partes del mismo. El título de anticuerpo en el sujeto inmunizado se puede controlar en el tiempo con técnicas convencionales, tales como un ELISA, o mediante el uso de GDF-8 inmovilizado otras proteínas marcadoras (por ejemplo, FLAG). Si se desea, las moléculas de anticuerpo de la presente invención se pueden aislar del sujeto o unos medios de cultivo y purificar adicionalmente mediante técnicas bien conocidas, tales como cromatografía de proteína A, para obtener una fracción de IgG.

Ciertas realizaciones de la divulgación comprenden el dominio de VH y/o VL del fragmento de Fv de RK35. Se

pueden producir fragmentos de anticuerpos de la presente divulgación, por ejemplo, fragmentos de Fab, F(ab')₂, Fd, y dAb, por escisión de los anticuerpos de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, se pueden generar fragmentos de Fab y F(ab')₂ inmunológicamente activos por tratamiento de los anticuerpos con una enzima tal como papaína y pepsina.

- 5 Las realizaciones adicionales de la divulgación comprenden una o más CDR de cualquiera de los dominios de VH y VL, tal como se establece en las SEC ID N^os: 10-15 y 20-25. Una realización comprende un fragmento de H3 del dominio de VH de RK35 tal como se establece en la SEC ID N^o: 12.

Las secuencias de ADN y de aminoácidos (AA) de dominios de VH y VL, y las CDR de los anticuerpos que se desvelan por la presente se enumeran tal como se enumeran en la Tabla 1. Por conveniencia, las posiciones aproximadas de cada CDR dentro de los dominios de VH y VL se enumeran en la Tabla 2.

10

Tabla 1: Secuencias de ADN y Aminoácidos de VH, VL, CH, CL y CDR en RK35

RATÓN	sec. de ADN de VH	SEC ID N ^o : 2
	sec. de AA de VH	SEC ID N ^o : 3
	sec. de ADN de VL	SEC ID N ^o : 4
	sec. de AA de VL	SEC ID N ^o : 5
HUMANIZADO	sec. de ADN de VH	SEC ID N ^o : 6
	sec. de AA de VH	SEC ID N ^o : 7
	sec. de ADN de VL	SEC ID N ^o : 8
	sec. de AA de VL	SEC ID N ^o : 9
CDR EN BASE A DEFINICIONES DE KABAT O AbM (ital)	secuencia de AA de H1	SEC ID N ^o : 10 o SEC ID N ^o : 20
	secuencia de AA de H2	SEC ID N ^o : 11 o SEC ID N ^o : 21
	secuencia de AA de H3	SEC ID N ^o : 12 o SEC ID N ^o : 22
	secuencia de AA de L1	SEC ID N ^o : 13 o SEC ID N ^o : 23
	secuencia de AA de L2	SEC ID N ^o : 14 o SEC ID N ^o : 24
	secuencia de AA de L3	SEC ID N ^o : 15 o SEC ID N ^o : 25
	sec. de ADN de CL	SEC ID N ^o : 16
	sec. de AA de CL	SEC ID N ^o : 17
	sec. de ADN de CH	SEC ID N ^o : 18
	sec. de AA de CH	SEC ID N ^o : 19

Tabla 2: Posición aproximada de CDR de acuerdo con definiciones de Kabat (no ital.) o AbM (ital.) dentro de regiones variables de anticuerpos de ratón y humanizados de RK35

CDR	SEC ID N ^o : 3 de RK35	SEC ID N ^o : 7 de RK35
H1	31-35 o 26-35	31-35 o 26-35
H2	50-66 o 50-59	50-66 o 50-59
H3	99-105 o 99-105	99-105 o 99-105
	SEC ID N ^o : 5	SEC ID N ^o : 9
L1	24-34 o 24-34	24-34 o 24-34
L2	50-56 o 50-56	50-56 o 50-56
L3	89-95 o 89-95	89-95 o 89-95

15

Los anticuerpos anti-GDF-8 pueden comprender adicionalmente regiones constantes de un anticuerpo o partes del mismo. Por ejemplo, un dominio de VL de la invención puede estar unido en su extremo C-terminal a un dominio constante de cadena ligera del anticuerpo, por ejemplo, una cadena C_{κ} o C_{λ} humana, preferentemente una cadena C_{λ} . De forma análoga, un fragmento de unión a antígeno en base a un dominio de VH puede estar unido en su extremo C-terminal a toda o una 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 isotipos, en particular IgG₁ e IgG₄. En realizaciones a modo de ejemplo, los anticuerpos comprenden fragmentos C-terminales de cadenas pesadas y ligeras de IgG_{1 λ} humana. En las SEC ID N^o: 16 y SEC ID N^o: 17, respectivamente, se establecen secuencias de ADN y de aminoácidos preferentes para el fragmento constante C-terminal de la cadena λ ligera. En las SEC ID N^o: 18 y SEC ID N^o: 19, respectivamente, se establecen secuencias de ADN y de aminoácidos preferentes para el fragmento constante C-terminal de la cadena pesada de IgG₁. Se entiende que, debido a la degeneración del código genético, las secuencias de ADN que se enumeran en la Tabla 1 son simplemente representativas de los ácidos nucleicos que codifican las secuencias de aminoácidos, péptidos, y anticuerpos de interés, y no se pretende que sean limitantes.

Determinadas realizaciones de la divulgación comprenden el dominio de VH y/o VL del fragmento de Fv de RK35. Realizaciones adicionales comprenden una o más regiones que determinan la complementariedad (CDR) de cualquiera de estos dominios de VH y VL. Una realización comprende un fragmento H3 del dominio de VH de RK35. Los dominios de VH y VL de la invención, en determinadas realizaciones, son de línea germinal, es decir, las regiones de marco conservado (FR) de estos dominios se cambian usando técnicas convencionales de biología molecular para emparejar las secuencias de aminoácidos consenso de productos genéticos de línea germinal humana. Esto también se conoce como anticuerpo humanizado o de línea germinal. En otras realizaciones, las secuencias de marco conservado permanecen separadas de la línea germinal. Se pueden producir anticuerpos humanizados usando ratones transgénicos que son incapaces de expresar genes de cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina endógena, pero son capaces de expresar genes humanos de cadena pesada y ligera.

C. Anticuerpos Modificados y Sus Fragmentos

Un aspecto adicional de la invención proporciona procedimientos para obtener un dominio de unión a antígeno de anticuerpo dirigido contra GDF-8. El experto en la materia observará que los anticuerpos que se describen o se reivindican en el presente documento no están limitados a las secuencias específicas de VH y VL tal como se enumera en la Tabla 1 sino que también incluyen variantes de estas secuencias que mantienen la capacidad de unión a antígeno. Tales variantes se pueden derivar de las secuencias proporcionadas usando técnicas conocidas en la técnica. Se pueden preparar sustituciones, supresiones, o adiciones de aminoácidos en cualquiera de las FR o en las CDR. Aunque normalmente se diseñan cambios en las regiones de marco conservado para mejorar la estabilidad y reducir la inmunogenicidad del anticuerpo, normalmente se diseñan cambios en las CDR para aumentar la afinidad del anticuerpo hacia su diana. Tales cambios que aumentan la afinidad por lo general se determina de forma empírica alterando la CDR y sometiendo al ensayo el anticuerpo. Tales alteraciones se pueden preparar de acuerdo con los procedimientos que se describen en, por ejemplo, *Antibody Engineering*, 2^a. ed., Borrebaeck, ed., Oxford University Press, 1995.

Por lo tanto, los anticuerpos de la invención también incluyen los que se unen a GDF-8, interfieren con la señalización de GDF-8, y tienen mutaciones en las regiones constantes de las cadenas pesada y ligera. En ocasiones es deseable mutar e inactivar determinados fragmentos de la región constante. Por ejemplo, en ocasiones son deseables mutaciones en la región constante pesada para producir anticuerpos con unión reducida al receptor y/o complemento de Fc (FcR); tales mutaciones o bien conoce en la técnica. Un experto en la materia también reconocerá que la determinación de qué fragmentos activos de las subunidades CL y CH son necesarios dependerá de la aplicación a la que se aplica un anticuerpo de la invención. Por ejemplo, los fragmentos activos de las subunidades CL y CH que están implicados con su enlace covalente entre sí será importante para la generación de un anticuerpo intacto.

El procedimiento para preparar un dominio de VH que es una variante de secuencia de aminoácidos de un dominio de VH establecido en el presente documento comprenden etapa de adición, supresión, sustitución o inserción de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos del dominio de VH que se desvela por la presente, opcionalmente por combinación del dominio de VH proporcionado de este modo con uno o más dominios de VL, y sometiendo a ensayo el dominio de VH o combinación o combinaciones de VH/VL para la unión a GDF-8, y (preferentemente) sometiendo a ensayo la capacidad de tal dominio de unión a antígeno para modular una o más actividades asociadas con GDF-8. El dominio de VL puede tener una secuencia de aminoácidos que es básicamente tal como se establece en el presente documento. Se puede usar un procedimiento análogo en el que una o más variantes de secuencias de un dominio de VL que se desvelan el presente documento se combinan con uno o más dominios de VH.

Un aspecto adicional de la divulgación proporciona un procedimiento para preparar un fragmento de unión a antígeno que interactúa con GDF-8. El procedimiento comprende:

- (a) proporcionar un repertorio de partida de ácidos nucleicos que codifican un dominio de VH que además incluye una CDR, por ejemplo, CDR3, a sustituir o un dominio de VH que carece de una región que codifica una CDR, por ejemplo, CDR3;

(b) combinar el repertorio con un ácido nucleico dador que codifica una CDR dadora que comprende un fragmento activo de la SEC ID N°: 2 o 6, por ejemplo, un ácido nucleico dador que codifica la secuencia de aminoácidos que se establece en la SEC ID N°: 3 o 7, de modo que el ácido nucleico dador se inserta en la región de CDR, por ejemplo, CDR3, en el repertorio con el fin de proporcionar un repertorio de producto de

ácidos nucleicos que codifican un dominio de VH;

(c) expresar los ácidos nucleicos del repertorio de producto;

(d) seleccionar un fragmento de unión a antígeno que interactúa con GDF-8; y

(e) recuperar el fragmento de unión a antígeno o ácido nucleico seleccionado que lo codifica.

De nuevo, se podría usar un procedimiento análogo en el que una CDR3 de VL (por ejemplo, L3) de la invención se combina con un repertorio de ácidos nucleicos que codifican un dominio de VL, el cual o bien incluye una CDR a sustituir o carece de una región que codifique la CDR.

Una secuencia de codificación de una CDR de la divulgación (por ejemplo, CDR3) se puede introducir 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 para producir repertorios de dominios variables de anticuerpo en los que se usan cebadores consenso dirigidos o adyacentes al extremo en la posición 5' del área del dominio variable en conjunto con cebadores consenso para la tercera región de marco conservado de genes de VH humanos para proporcionar un repertorio de dominios variables de VH que carecen de una CDR3. El repertorio se puede combinar con una CDR3 de un anticuerpo en particular. Usando técnicas análogas, las secuencias derivadas de CDR3 de la presente divulgación se pueden barajar con repertorios de dominios de VH o VL que carecen de una CDR3, y los dominios completos de VH o VL barajados se combina con un dominio de VL o VH similar para proporcionar fragmentos de unión a antígeno. A continuación, el repertorio se puede presentar en un sistema huésped adecuado, tal como sistema de presentación de fagos, por ejemplo, del documento WO 92/01047, de modo que se pueden seleccionar fragmentos adecuados de unión a antígeno.

También se desvelan técnicas análogas de barajado o de combinación en Stemmer (1994) *Nature* 370: 389-91, que describe una técnica con relación a un gen de β -lactamasa y además observa que el enfoque se puede usar para la generación de anticuerpos.

Una alternativa adicional es generar nuevas regiones de VH o VL que portan una secuencia derivada de CDR de la invención usando mutagénesis aleatoria de uno o más genes seleccionados de VH y/o VL para generar mutaciones dentro de todo el dominio variable. Tal técnica se describe en Gram y col. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89: 3576-80 mediante el uso de PCR propensa a error.

Otro procedimiento que se puede usar para generar nuevos anticuerpos o fragmentos de los mismos es dirigir mutagénesis a las CDR de genes de VH o VL. Tales técnicas se desvelan en Barbas y col. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 3809-13 y Schier y col. (1996) *J. Mol. Biol.* 263: 551-67.

De forma análoga, una, dos, o las tres CDR, se pueden injertar en un repertorio de dominios de VH o VL que a continuación se identifican sistemáticamente para un asociado de unión o fragmentos de unión para GDF-8.

Una parte básica de un dominio variable de inmunoglobulina comprenderá al menos las CDR y, opcionalmente, sus regiones de marco conservado de intervención de los fragmentos de anticuerpos tal como se establece en el presente documento. La parte también incluirá al menos un 50 % de cualquiera o ambas de FR1 y FR4, siendo un 50 % el 50 % C-terminal de FR1 y el 50 % N-terminal de FR4. Pueden ser restos adicionales en el extremo N-terminal o C-terminal de la parte básica del dominio variable los que no se asocian normalmente con regiones de dominio variable de origen natural. Por ejemplo, la construcción de fragmentos de anticuerpos de la presente divulgación preparada mediante técnicas de ADN recombinante puede dar como resultado la introducción de restos N- o C-terminales codificados mediante engarces introducidos para facilitar la clonación u otras etapas de manipulación. Otras etapas de manipulación incluyen la introducción de encajes para unir dominios variables de la divulgación secuencias de proteínas adicionales que incluyen cadenas pesadas de inmunoglobulinas, otros dominios variables (por ejemplo, en la producción de diacuerpos) o marcas de proteína tal como se analiza con más detalles a continuación.

Aunque las realizaciones ilustradas en los Ejemplos comprenden un par de "emparejamiento" de dominios de VH y VL, la divulgación también incluye fragmentos de unión que contienen un solo dominio variable, por ejemplo, un fragmento de dAb, derivado de cualquiera de las secuencias de dominio de VH o VL, especialmente dominios de VH. En el caso de cualquiera de los dominios de unión de una sola cadena, estos dominios se pueden usar para identificar sistemáticamente dominios de complementariedad capaces de formar un dominio de unión a antígeno de dos dominios capaz de unirse a GDF-8. Esto se puede conseguir mediante procedimientos de identificación sistemática de presentación de fagos usando el denominado doble enfoque combinatorio jerárquico tal como se desvela, por ejemplo, en el documento WO 92/01047. En esta técnica, se usa una colonia individual que contiene cualquiera de un clon de cadena H o L para infectar una biblioteca completa de clones que codifican la otra cadena (L o H) y el dominio de unión a antígeno de dos cadenas resultante se selecciona de acuerdo con técnicas de presentación de fagos, tales como las que se describen en esa referencia. Esta técnica también se desvela en Marks y col., mencionado anteriormente.

Los anticuerpos se pueden conjugar mediante procedimientos químicos con radionucleidos, fármacos, macromoléculas, otros agentes, y se pueden preparar como proteínas de fusión que comprenden una o más CDR de la divulgación.

5 Una proteína de fusión a anticuerpo contiene un par VH-VL en el que una de estas cadenas (normalmente VH) y otra proteína se sintetizan como una sola cadena de polipéptido. Estos tipos de productos difieren de los anticuerpos en que por lo general tienen un elemento funcional adicional – el resto activo de una molécula pequeña o la característica estructural molecular principal de la macromolécula conjugada o fusionada.

10 Además de los cambios en la secuencia de aminoácidos que se han resaltado anteriormente, los anticuerpos se pueden glicosilar, pegar, o unir a albúmina o un polímero no proteico. Por ejemplo, se pueden unir anticuerpos anti-GDF-8 a una de una diversidad de polímeros no proteicos, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol, o polioxialquilenos. Los anticuerpos se pueden modificar de forma química, por ejemplo, para aumentar su vida media en circulación mediante conjugación covalente a un polímero. En la técnica se conocen polímeros o modo de ejemplo, y procedimientos para unirlos a péptidos.

15 En otras realizaciones, el anticuerpo se puede modificar para que tenga un patrón de glicosilación alterado (es decir, con respecto al patrón de glicosilación original o nativo). Como se usa en el presente documento, "alterado" se refiera que tiene uno o más restos de hidratos de carbono suprimidos, y/o que tiene uno o más sitios de glicosilación añadidos al anticuerpo original. La adición de sitios de glicosilación a un anticuerpo anti-GDF-8 se consigue mediante procedimientos bien conocidos de alteración de la secuencia de aminoácidos para que contenga secuencias consenso de sitio de glicosilación. Otro medio para aumentar el número de restos de hidratos de carbono en los anticuerpos es mediante acoplamiento químico o enzimático de glicósidos a los restos de aminoácidos del anticuerpo. La retirada de cualquier resto de hidrato de carbono presente en los anticuerpos se puede conseguir por vía química o por vía enzimática tal como se conoce en la técnica.

20 Los anticuerpos de la invención también se pueden marcar con una marca detectable o funcional tal como ¹³¹I o ⁹⁹Tc, que se puede unir a los anticuerpos de la invención usando química convencional conocida en la técnica. Las marcas también incluyen marcas enzimáticas tales como peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina. Las marcas incluyen adicionalmente restos químicos tales como biotina, que se pueden detectar a través de la unión a un resto detectable similar específico, por ejemplo, avidina marcada.

25 Dentro del ámbito de la divulgación se incluyen anticuerpos, en los que las secuencias de CDR difieren solo insustancialmente de las enumeradas en la Tabla 1. Diferencias insustanciales incluyen cambios menores en aminoácidos, por ejemplo, sustituciones de uno o dos de los cinco aminoácidos en la secuencia de una CDR. Por lo general, un aminoácido está sustituido con un aminoácido relacionado que tiene características similares de carga, hidrofobia, o estereoquímicas. Tales sustituciones estarían dentro de las experiencias habituales de un experto en la materia. Las regiones de marco conservado estructurales (FR) se pueden modificar más básicamente que las CDR sin afectar de forma adversa a las propiedades de unión de un anticuerpo. Los cambios en las FR incluyen, pero no se limitan a, humanización de un marco conservador derivado no humano o sometiendo ingeniería determinar los restos de marco conservado que son importantes para el contacto del antígeno o para la estabilización del sitio de unión, por ejemplo, cambiando la clase o subclase de la región 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 de la que se deriva la región constante. Los anticuerpos pueden tener mutaciones en la región CH2 de la cadena pesada que reducen o alteran funciones efectoras, por ejemplo, unión al receptor de Fc y activación de complementos. Por ejemplo, los anticuerpos pueden tener mutaciones tales como las que se describen en las Patentes de Estados Unidos N° 5.624.821 y N° 5.648.260. En la cadena pesada de IgG₁ o IgG₂, por ejemplo, tales mutaciones se pueden preparar en los restos de los aminoácidos 117 y 120 de la SEC ID N°: 19, que representan la parte Fc de la IgG₁ (estos restos corresponden a los aminoácidos 234 y 237 en las secuencias de longitud completa de IgG₁ o IgG₂). Los anticuerpos también pueden tener mutaciones que estabilizan en 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.

30 Los polipéptidos y anticuerpos de la presente divulgación también incluyen proteínas que son estructuralmente diferentes de los polipéptidos y anticuerpos que se desvelan, por ejemplo, que tienen una alteración de la secuencia pero básicamente las mismas propiedades bioquímicas que los polipéptidos y anticuerpos que se desvelan, por ejemplo, tienen cambio solamente en aminoácidos funcionalmente no esenciales. Tales moléculas incluyen variantes alélicas de origen natural y variantes sometidas a ingeniería de forma deliberada que contienen alteraciones, sustituciones, reemplazos, inserciones, o supresiones. Los expertos una materia conocen bien técnicas para tales alteraciones, sustituciones, reemplazos, inserciones, o supresiones.

35 Los anticuerpos de la divulgación se pueden producir adicionalmente usando animales no humanos transgénicos que se modifican con el fin de producir anticuerpos totalmente humanos en lugar de los anticuerpos endógenos del animal como respuesta a la estimulación por un antígeno. Véase, por ejemplo, la publicación PCT del documento WO 94/02602. Los genes endógenos que codifican las cadenas de inmunoglobulina pesada y ligera en el huésped no humano se han incapacitado, y se insertan sitios activos que codifican inmunoglobulinas de cadena pesada y

ligera humanas en el genoma del huésped. Los genes humanos se incorporan, por ejemplo, usando cromosomas artificiales de levadura que contienen los segmentos de ADN humanos requeridos. A continuación, se obtiene un animal que proporciona todas las modificaciones deseadas como progenie mediante cruce de animales transgénicos intermedios que contienen menos del complemento total de las modificaciones. Una realización de tal animal o humano es un ratón, y se denomina XENOMOUSE™ tal como se desvela en las publicaciones PCT del documento WO 96/33735 y el documento WO 96/34096. Este animal produce linfocitos B que segregan inmunoglobulinas totalmente humanas. Los anticuerpos se pueden obtener directamente del animal después de la inmunización con un inmunógeno de interés, por ejemplo, como una preparación de un anticuerpo policlonal, o como alternativa a partir de linfocitos B inmortalizados derivados del animal, tales como hibridomas que producen anticuerpos monoclonales. Además, los genes que codifican las inmunoglobulinas con regiones variables humanas se pueden recuperar y expresar para obtener los anticuerpos directamente, o se pueden modificar adicionalmente para obtener análogos de anticuerpos tales como, por ejemplo, moléculas de Fv de una sola cadena.

En consecuencia, el término anticuerpo tal como se usa en el presente documento incluye anticuerpos intactos, fragmentos de anticuerpos, por ejemplo, fragmentos de Fab, F(ab')₂ Fd, dAb y scFv, y anticuerpos y fragmentos intactos cualquiera de los que se ha mutado en sus regiones constantes y/o variables (por ejemplo, mutaciones para producir anticuerpos quiméricos, parcialmente humanizados, o totalmente humanizados, así como para producir anticuerpos con un rasgo deseado, por ejemplo, aumento de la unión a GDF-8 y/o reducción de la unión FcR).

Otras moléculas de unión a proteínas también se pueden usar para modular la actividad de GDF-8. Tales moléculas de unión a proteínas incluyen fármacos inmunofarmacéuticos modulares pequeños (SMIP™) (Trubion Pharmaceuticals, Seattle, WA). Los SMIP son polipéptidos de una sola cadena formados por un dominio de unión para una estructura similar tal como un antígeno, un contrarreceptor o similar, un polipéptido de región bisagra que tiene uno o ningún resto de cisteína, y dominios CH2 y CH3 de inmunoglobulina (véase también www.trubion.com). Los SMIP y sus usos y aplicaciones se desvelan, por ejemplo, en las Sols. de Patente Publicadas de Estados Unidos N° 2003/0118592, N° 2003/0133939, N° 2004/0058445, N° 2005/0136049, N° 2005/0175614, N° 2005/0180970, N° 2005/0186216, N° 2005/0202012, N° 2005/0202023, N° 2005/0202028, N° 2005/0202534, y N° 2005/0238646, y miembros relacionados de la familia de patentes de los mismos.

La capacidad de unión de un anticuerpo de la invención se puede medir con los siguientes procedimientos: análisis de Biacore, ensayo de inmunoabsorción unida a enzimas (ELISA), cristalografía de rayos X, análisis de secuencias y mutagénesis de exploración tal como se describe en los Ejemplos que siguen a continuación, y otros procedimientos que son bien conocidos en la técnica. La capacidad de un anticuerpo de la invención para neutralizar y/o inhibir una o más actividades asociadas con GDF-8 se puede medir mediante la siguiente lista no limitante de procedimientos: ensayos para medir la proliferación de una línea celular dependiente de GDF-8; ensayos para medir la expresión de polipéptidos mediados por GDF-8; ensayos para medir la actividad de moléculas de señalización cadena abajo; ensayos para someter a ensayo la eficacia de un anticuerpo de la invención para prevenir trastornos musculares en un modelo animal relevante; ensayos como se describen en los Ejemplos que siguen a continuación; y otros ensayos que se conocen bien en la técnica.

Un aspecto adicional de la divulgación proporciona un procedimiento para seleccionar anticuerpos capaces de unirse a GDF-8 y neutralizar y/o inhibir una o más actividades asociadas con GDF-8. el procedimiento comprende:

- a) poner en contacto una pluralidad de anticuerpos con GDF-8;
- b) elegir anticuerpos que se unan a GDF-8;
- c) someter a ensayo la capacidad de anticuerpos elegidos para evitar que GDF-8 se una al receptor de GDF-8; y
- d) seleccionar anticuerpos capaces de evitar que GDF-8 se una a su receptor.

Los anticuerpos anti-GDF-8 de la invención también son útiles para aislar, purificar, y/o detectar GDF-8 en sobrenadantes, lisados celulares, o en una superficie celular. Los anticuerpos que se desvelan en la presente invención se pueden usar como forma de diagnóstico para controlar los niveles de proteína GDF-8 como parte de un procedimiento de ensayo clínico. Además, los anticuerpos de la invención se puede usar en tratamientos que requieren la neutralización y/o inhibición de una o más actividades asociadas con GDF-8, por ejemplo, tratamientos para ELA y otras patologías relacionadas con el músculo. La presente invención también proporciona nuevos polinucleótidos y polipéptidos aislados y purificados relacionados con nuevos anticuerpos dirigidos contra GDF-8 humano. Los genes, polinucleótidos, proteínas, y polipéptidos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos de murino y humanizados para GDF-8 (por ejemplo, RK35) y variantes de los mismos.

D. Ácidos Nucleicos, Clonación, y Sistemas de Expresión

La presente invención también proporciona ácidos nucleicos aislados y purificados que codifican anticuerpos de la presente invención. Los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención pueden comprender ADN o ARN y pueden ser tan total o parcialmente sintéticos. Las referencias a secuencias de nucleótidos tal como se establece en el presente documento incluyen moléculas de ADN con las secuencias o equivalentes genómicos especificados, así como moléculas de ARN con las secuencias especificadas en las que U se sustituye por T, a menos que el contexto lo requiera de otro modo.

Por ejemplo, la divulgación proporciona polinucleótidos purificados y aislados que codifican la región variable de un anticuerpo murino para GDF-8 que modula una o más actividades asociadas con GDF-8 (por ejemplo, neutraliza la bioactividad de GDF-8) (RK35), y una versión humanizada de RK35. Las secuencias de ADN preferentes de la invención incluyen secuencias de ADN genómicas, de ADNc, y sintetizadas químicamente.

5 Las secuencias de nucleótidos de la divulgación incluyen las que codifican las regiones variables de cadena ligera de RK35 de ratón establecidas en la SEC ID N°: 4, que incluyen las que codifican una secuencia directora que precede a la secuencia de la región variable de cadena ligera, por ejemplo, la secuencia de nucleótidos que se establece en la SEC ID N°: 30 (los nucleótidos 1-60 corresponden a la secuencia directora, y los nucleótidos 61-381 corresponden a la SEC ID N°: 4). Las secuencias de nucleótidos de la divulgación también incluyen las que codifican la región variable de cadena pesada de RK35 establecida en la SEC ID N°: 2, incluyendo las que codifican una secuencia directora que precede a la región variable de cadena pesada, por ejemplo, la secuencia de nucleótidos establecida en la SEC ID N°: 28 (los nucleótidos 1-57 corresponden a la secuencia directora, y los nucleótidos 58-405 corresponden a la SEC ID N°: 2). Las secuencias de nucleótidos de la invención también incluyen secuencias humanizadas de las regiones variables de cadena pesada y ligera, tales como las que se establecen en las SEC ID N°s: 6 y 8, respectivamente. Los polinucleótidos de la presente divulgación también incluyen polinucleótidos que se hibridan en condiciones rigurosas a las secuencias de ácidos nucleicos establecidas en las SEC ID N°s: 2, 4, 6, y 8, y complementos de los mismos, y/o codifican polipéptidos que mantienen actividad biológica básica (es decir, fragmentos activos) en las regiones variables. Los polinucleótidos de la presente divulgación también incluyen partes continuas de las secuencias establecidas en las SEC ID N°s: 2, 4, 6, y 8, que comprenden al menos 15 nucleótidos consecutivos.

La secuencia de aminoácidos de las cadenas ligeras variables de RK35 de ratón se establece en la SEC ID N°: 5. Un ejemplo de una secuencia de aminoácidos del dominio de cadena ligera variable de RK35 de ratón precedida por una secuencia directora se establece como la SEC ID N°: 31. La secuencia de aminoácidos de las cadenas pesadas variables de RK35 se establecen en la SEC ID N°: 3. Un ejemplo de una secuencia de aminoácidos del dominio de cadena pesada variable de RK35 de ratón precedida por una secuencia directora se establece como la SEC ID N°: 29. Las secuencias de aminoácidos de cadenas pesadas y ligeras variables humanizadas se establecen en las SEC ID N°s: 7 y 9, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las CDR contenidas dentro de las cadenas pesadas de RK35 de ratón se establecen en las SEC ID N°s: 10-12 y 20-22. Las secuencias de aminoácidos de las CDR contenidas dentro de las cadenas ligeras de RK35 de ratón se establecen en las SEC ID N°s: 13-15 y 23-25. Los polipéptidos de la presente divulgación también incluyen partes continuas de cualquiera de las secuencias que se establecen básicamente en las SEC ID N°s: 3, 5, 7, 9, 10-15, y 20-25 que comprenden al menos 5 aminoácidos consecutivos. Un polipéptido preferente de la presente divulgación incluye cualquier parte continua de una secuencia que se establece básicamente en las SEC ID N°s: 3, 5, 7, 9, y 10-15 que mantienen actividad biológica básica de un anticuerpo de la divulgación. Además de los polinucleótidos que se han descrito anteriormente, la presente invención también incluye polinucleótidos que codifican las secuencias de aminoácidos que se establecen básicamente en las SEC ID N°s: 7, 9, y 10-15 o una parte continua de los mismos, y que difieren de los polinucleótidos que se han descrito anteriormente solamente debido a la degeneración bien conocida del código genético.

Los polinucleótidos aislados de la presente invención se pueden usar como sondas y cebadores de hibridación para identificar y aislar ácidos nucleicos que tiene secuencias idénticas o similares a las que codifican los polinucleótidos desvelados. Los polinucleótidos aislados de esta forma se pueden usar, por ejemplo, para producir anticuerpos contra GDF-8 u otros miembros de la familia de TGF-β o para identificar células que expresan tales 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 materia.

Se pueden realizar reacciones de hibridación en condiciones de diferentes rigurosidades. La rigurosidad de una reacción de hibridación incluye la dificultad con la que se hibridarán entre sí cualquiera de dos moléculas de ácidos nucleicos. Preferentemente, cada polinucleótido de hibridación se hibrida con su polinucleótido correspondiente en condiciones de rigurosidad reducida, más preferentemente condiciones rigurosas, y lo más preferentemente condiciones altamente rigurosas. Ejemplos de condiciones de rigurosidad se muestran en la Tabla 3 que sigue a continuación: las condiciones altamente rigurosas son las que that son al menos tan rigurosas como, por ejemplo, las condiciones A-F; las condiciones rigurosas son menos tan rigurosas como, por ejemplo, las condiciones G-L; y las condiciones de rigurosidad reducida sólo al menos tan rigurosas como, por ejemplo, las condiciones M-R.

55

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; 1X SSC - o -42 °C; 1X SSC, formamida	65 °C; 0,3X SSC

ES 2 534 760 T3

			al 50 %	
--	--	--	---------	--

(continuación)

Condición	Híbrido	Longitud del Híbrido (pb) ¹	Temperatura de Hibridación y Tampón ²	Temperatura de Lavado y Tampón ²
B	ADN:ADN	< 50	T _B *; 1X SSC	T _B *; 1X SSC
C	ADN:ARN	> 50	67 °C; 1X SSC - o -45 °C; 1X SSC, formamida al 50 %	67 °C; 0,3X SSC
D	ADN:ARN	< 50	T _D *; 1X SSC	T _D *; 1X SSC
E	ARN:ARN	> 50	70 °C; 1X SSC - o -50 °C; 1X SSC, formamida al 50 %	70 °C; 0,3X SSC
F	ARN:ARN	< 50	T _F *; 1X SSC	T _F *; 1X SSC
G	ADN:ADN	> 50	65 °C; 4X SSC - o -42 °C; 4X SSC, formamida al 50 %	65 °C; 1X SSC
H	ADN:ADN	< 50	T _H *; 4X SSC	T _H *; 4X SSC
I	ADN:ARN	> 50	67 °C; 4X SSC - o -45 °C; 4X SSC, formamida al 50 %	67 °C; 1X SSC
J	ADN:ARN	< 50	T _J *; 4XSSC	T _J *; 4XSSC
K	ARN:ARN	> 50	70 °C; 4X SSC - o -50 °C; 4X SSC, formamida al 50 %	67 °C; 1X SSC
L	ARN:ARN	< 50	T _L *; 2X SSC	T _L *; 2X SSC
M	ADN:ADN	> 50	50 °C; 4X SSC - o -40 °C; 6X SSC, formamida al 50 %	50 °C; 2X SSC
N	ADN:ADN	< 50	T _N *; 6X SSC	T _N *; 6X SSC
O	ADN:ARN	> 50	55 °C; 4X SSC - o -42 °C; 6X SSC, formamida al 50 %	55 °C; 2X SSC
P	ADN:ARN	< 50	T _P *; 6X SSC	T _P *; 6X SSC
Q	ARN:ARN	> 50	60 °C; 4X SSC - o -45 °C; 6X SSC, formamida al 50 %	60 °C; 2X SSC
R	ARN:ARN	< 50	T _R *; 4X SSC	T _R *; 4X SSC

¹La longitud del híbrido es la que se anticipa para la región por regiones hibridadas de los polinucleótidos de hibridación. Cuando se hibrida un polinucleótido a un polinucleótido diana de secuencia desconocida, se supone que la longitud del híbrido es la del polinucleótido de hibridación. Cuando se hibridan polinucleótidos de secuencia conocida, la longitud del híbrido se puede determinar por alineación de las secuencias de los polinucleótidos e identificando la región o regiones de complementariedad de secuencias óptima.

²SSPE (1xSSPE es NaCl 0,15 M, NaH₂PO₄ 10 mM, y EDTA 1,25 mM, pH 7,4) se puede sustituir por SSC (1xSSC es NaCl 0,15 M y citrato sódico 15 mM) en los hampones de hibridación y lavado; los lavados se realizan durante 15 minutos después de completar la hibridación. T_B* - T_R*: La temperatura de hibridación para híbridos que se anticipa que tienen menos de 50 pares de bases de longitud debería ser de 5-10 °C inferior a la temperatura de fusión (T_f) del híbrido, en la que la T_f se determina de acuerdo con las siguientes ecuaciones. Para híbridos con una longitud de menos de 18 pares de bases, T_f(°C) = 2(N° de bases A + T) + 4(N° de bases G + C). Para híbridos con una longitud entre 18 y 49 pares de bases, T_f(°C) = 81,5 + 16,6(log₁₀Na⁺) + 0,41 (% de G + C) - (600/N), en la que N es el número de bases en el híbrido, y Na⁺ es la concentración de iones sodio en el tampón de hibridación (Na⁺ para 1X SSC = 0,165 M). Ejemplos adicionales de condiciones de rigurosidad para hibridación de polinucleótidos se proporcionan en Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Capítulos 9 y 11, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989), y Ausubel y col., eds., Current Protocols in Molecular Biology, Secciones 2.10 & 6.3-6.4, John Wiley & Sons, Inc. (1995), que se incorporan en el presente documento por referencia.

Los polinucleótidos aislados de la presente invención se pueden usar como sondas y cebadores de hibridación para identificar y aislar ADN que tienen secuencias que codifican variantes alélicas de los polinucleótidos que se desvelan. Las variantes alélicas son formas alternativas de origen natural de los polinucleótidos que se desvelan que

codifican polipéptidos que son idénticos o que tienen similitud significativa con los polipéptidos codificados por los nucleótidos que se desvelan. Preferentemente, las variantes alélicas tienen al menos una identidad de secuencia de un 90 % (más preferentemente, una identidad de al menos un 95 %; lo más preferentemente, una identidad de al menos un 99 %) con los polinucleótidos desvelados.

- 5 Los polinucleótidos aislados de la presente invención también se prevén usar como sondas y cebadores de hibridación para identificar y aislar ADN que tienen secuencias que codifican polipéptidos homólogos a los polinucleótidos que se desvelan. Estos homólogos son polinucleótidos y polipéptidos aislados de una especie diferente a la de los polipéptidos y polinucleótidos que se desvelan, o dentro de la misma especie, pero con una similitud de secuencia significativa para los polinucleótidos y polipéptidos que se desvelan. Preferentemente, los homólogos de polinucleótidos tienen una identidad de secuencia de al menos un 50 % (más preferentemente, una identidad de al menos un 75 %; lo más preferentemente, una identidad de al menos un 90 %) con los polinucleótidos que se desvelan, mientras que los homólogos de polipéptidos tienen una identidad de secuencia de al menos un 30 % (más preferentemente, una identidad de al menos un 45 %; lo más preferentemente, una identidad de al menos un 60 %) con los anticuerpos/polipéptidos que se desvelan. Preferentemente, los homólogos de los polinucleótidos y polipéptidos que se desvelan son los que se aíslan de especies de mamíferos.

Los polinucleótidos aislados de la presente invención también se pueden usar como sondas y cebadores de hibridación al identificar células y tejidos que expresan los anticuerpos de la presente invención y las condiciones en las que se expresan.

- 20 Además, los polinucleótidos aislados de la presente invención se pueden usar para alterar (es decir, aumentar, reducir, o modificar) la expresión de los genes que corresponden a los polinucleótidos de la presente invención en una célula u organismo. Estos "genes correspondientes" son las secuencias de ADN genómicas de la presente invención que se transcriben para producir los ARNm a partir de los cuales se derivan los polinucleótidos de la presente invención.

- 25 La presente invención también proporciona constructos en forma de plásmidos, vectores, casetes de transcripción o expresión que comprenden al menos un ácido nucleico de la invención tal como se ha mencionado anteriormente.

- Los polinucleótidos aislados de la presente invención se pueden unir de forma operativa a una secuencia de control de la expresión para producción recombinante de los polipéptidos de la presente invención. Además, un experto en la materia reconocerá que los polinucleótidos de la invención se pueden unir de forma operativa a secuencias de nucleótidos bien conocidas que codifican la región constante de diversos isotipos de anticuerpos. Por ejemplo, un polinucleótido de la invención que codifica una región o regiones variables de cadena ligera de la invención (por ejemplo, la secuencia que se establece en la SEC ID N°: 8) se puede unir de forma operativa a una secuencia de nucleótidos que codifica la región constante (o derivados de la misma) de cualquiera de una cadena ligera κ o cadena ligera λ , de modo que la expresión de los nucleótidos unidos dará como resultado una cadena ligera completa kappa o lambda con una región variable que se une de forma específica y neutraliza GDF-8. De forma análoga, un polinucleótido de la invención que codifica una región variable de cadena pesada de la invención (por ejemplo, la secuencia establecida en la SEC ID N°: 6) se puede unir de forma operativa a una secuencia de nucleótidos que codifica la región constante de un isotipo de cadena pesada (o derivados de los mismos), por ejemplo, IgM, IgD, IgE, IgG e IgA. En la técnica se conocen bien procedimientos generales para expresar proteína recombinantes. Tales proteínas recombinantes se pueden expresar en forma soluble para su uso en el tratamiento de trastornos relacionados con la actividad de GDF-8, por ejemplo, trastornos degenerativos musculares y óseos.

- Los vectores de expresión recombinantes de la invención pueden llevar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en células huésped (por ejemplo, orígenes de replicación), secuencias de marca tales como histidina, y genes marcadores que se pueden seleccionar. El gen marcador que se puede seleccionar facilita la selección de células huésped en las que se ha introducido el vector. Por ejemplo, por lo general el gen marcador que se puede seleccionar confiere resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato, en una célula huésped en la que se ha introducido el vector. Los genes marcadores que se pueden seleccionar preferentes incluyen el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) (para su uso en células huésped dhfr con selección/amplificación de metotrexato) y el gen *neo* (para selección de G418).

- 50 Se pueden elegir o construir vectores adecuados, que contienen secuencias de regulación apropiadas, incluyen secuencias promotoras, secuencias terminadoras, secuencias de poliadenilación, secuencias potenciadas, genes marcadores y otras secuencias que sean apropiadas. Los vectores pueden ser plásmidos o virales, por ejemplo, fago, o fagémido, si fuera apropiado. Para detalles adicionales véase, por ejemplo, Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 2ª ed., Sambrook y col., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. Muchas técnicas y protocolos conocidos para manipulación de ácidos nucleicos, por ejemplo, para preparación de constructos de ácidos nucleicos, mutagénesis, secuenciación, introducción de ADN de células y expresión genética, y análisis de proteínas, se describen con detalle en Current Protocols in Molecular Biology, 2ª ed., Ausubel y col. eds., John Wiley & Sons, 1992.

- La presente invención también proporciona una célula huésped que comprende uno o más constructos tal como se mencionó anteriormente. Un ácido nucleico que codifica cualquier dominio de CDR (H1, H2, H3, L1, L2, o L3), VH o

VL, o fragmento de unión a antígeno tal como se proporciona en el presente documento, forma un aspecto de la presente divulgación.

La presente invención también incluye un procedimiento para producir un péptido mediante la expresión de la proteína a partir del ácido nucleico que codifica en una célula huésped. La expresión se puede conseguir por cultivo de células huésped recombinantes que contienen el ácido nucleico en condiciones apropiadas.

Se pueden proporcionar fragmentos de anticuerpos, dominios de VH y/o VL, y moléculas de ácidos nucleicos que codifican y vectores de acuerdo con la presente invención aislados y codificados, por ejemplo, a partir de su entorno natural, en forma básicamente pura u homogénea, o, en el caso de ácidos nucleicos, libre o básicamente libre de ácidos nucleicos o genes de origen distinto de la secuencia que codifica un polipéptido con la función requerida.

Una serie de líneas celulares son células huésped adecuadas para la expresión recombinante de los polipéptidos y anticuerpos de la presente invención. Las líneas de células huésped de mamífero incluyen, por ejemplo, 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 de Jurkat, así como cepas celulares derivadas de cultivo *in vitro* de tejido primario y explantes primarios. Tales células huésped también permiten el corte y empalme de los polinucleótidos de la invención que consisten en ADN genómico.

Como alternativa, puede ser posible producir de forma recombinante los polipéptidos y anticuerpos de la presente invención en eucariotas inferiores tales como levaduras o en eucariotas. Las cepas de levadura potencialmente adecuadas incluyen *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, cepas de *Kluyveromyces*, y cepas de *Candida*. Las cepas de bacterias potencialmente adecuadas incluyen *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, y *Salmonella typhimurium*. Si los polipéptidos de la presente invención se preparan en levadura o bacterias, puede ser necesario modificarlos, por ejemplo, por fosforilación o glicosilación de sitios apropiados, con el fin de obtener proteínas funcionales. Tales uniones covalente se pueden conseguir usando procedimientos químicos o enzimáticos bien conocidos.

Los polipéptidos y anticuerpos de la presente invención también se pueden producir de forma recombinante mediante la unión de forma operativa de los polinucleótidos aislados de la presente invención a secuencias de control adecuadas en uno o más vectores de expresión de insectos, tales como vectores de baculovirus, y usando un sistema de expresión de células de insecto. En el mercado están disponibles materiales y procedimientos para sistemas de expresión de baculovirus/Sf9 en forma de kit (por ejemplo, el kit MAXBAC[®], Invitrogen, Carlsbad, CA).

Después de la expresión recombinante en las células huésped apropiadas, los polipéptidos y anticuerpos de la presente invención se pueden purificar a partir de 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 por afinidad con agentes conocidos porque se unen a los polipéptidos y anticuerpos de la presente invención. Estos procedimientos de purificación también se pueden usar para purificar los polipéptidos y anticuerpos de la presente invención a partir de fuentes naturales.

Como alternativa, los polipéptidos y anticuerpos de la presente invención se pueden expresar de forma recombinante en una forma que facilita la purificación. Por ejemplo, los polipéptidos se pueden expresar como fusiones con proteínas tales como proteínas de unión la maltosa (MBP), glutatión-S-transferasa (GST), o tiorredoxina (TRX). Los kits para expresión y purificación de tales proteínas de fusión están disponibles en el mercado en New England BioLabs (Beverly, MA), Pharmacia (Piscataway, NJ), e Invitrogen, respectivamente. Los polipéptidos y anticuerpos de la presente invención también se pueden marcar con un epítipo pequeño y posteriormente identificar o purificar usando un anticuerpo específico para el epítipo. Un epítipo preferente es el epítipo FLAG, que está disponible en el mercado en Eastman Kodak (New Haven, CT).

Los polipéptidos y anticuerpos de la presente invención también se pueden producir mediante síntesis química convencional conocida. Los procedimientos para sintetizar químicamente los polipéptidos y anticuerpos de la presente invención son bien conocidos por los expertos en la materia. Tales polipéptidos y anticuerpos químicamente sintéticos pueden poseer propiedades biológicas en común con los polipéptidos y anticuerpos purificados naturales, y de este modo se pueden usar como sustitutos biológicamente activos o inmunológicos de los polipéptidos y anticuerpos naturales.

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

La introducción de ácidos nucleicos puede ir seguido de causar o permitir la producción de proteínas a partir del ácido nucleico, por ejemplo, mediante el cultivo de las células huésped en condiciones adecuadas para expresión

genética. Tales condiciones son bien conocidas en la técnica.

III. Procedimientos para Tratar, Mejorar, Prevenir, e Inhibir el Progreso de Trastornos Óseos, Adiposos, Metabolismo de Glucosa, Insulina y Musculares

5 La implicación de GDF-8 en ELA, y el descubrimiento de los nuevos anticuerpos de la invención, permite procedimientos para tratar, aliviar, y mejorar trastornos asociados con GDF-8, 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 anticuerpos permiten diagnosticar, pronosticar y controlar el progreso de trastornos óseos, musculares, adiposos o de insulina midiendo el nivel de GDF-8 en una muestra biológica. En particular, los anticuerpos de la invención se pueden usar para tratar un individuo con ELA u otro trastorno muscular, o en un procedimiento para distinguir si un paciente está padeciendo ELA u otro trastorno muscular.

10 Los anticuerpos de la presente invención son útiles para prevenir, diagnosticar, o tratar diversos trastornos médicos en seres humanos o animales. Los anticuerpos se pueden usar para inhibir o reducir una o más actividades asociadas con GDF-8. Más preferentemente, los anticuerpos inhiben o reducen una más de las actividades de GDF-8 con respecto a actividades de GDF-8 sin unir. En determinadas realizaciones, la actividad de GDF-8, cuando se une con uno o más anticuerpos anti-GDF-8 se inhibe al menos en un 50 %, preferentemente al menos en un 60, un 62, un 64, un 66, un 68, un 70, un 72, un 72, un 76, un 78, un 80, un 82, un 84, un 86, o un 88 %, más preferentemente al menos un 90, un 91, un 92, un 93, o un 94 %, e incluso más preferentemente al menos de un 95 % a un 100 % con respecto a una proteína GDF-8 madura que no está unida con uno o más anticuerpos anti-GDF-8. La inhibición en la neutralización de la actividad de GDF-8 se puede medir, por ejemplo, en ensayos de genes indicadores (RGA) de pGL3(CA-GA)₁₂ tal como se describe en Thies y col., mencionado anteriormente, y en ensayos de receptor ActRIIB tal como se ilustra en los Ejemplos.

15 Los trastornos médicos diagnosticados, pronosticados, controlados, tratados como mejorados o prevenidos con anticuerpos GDF-8 son trastornos asociados con GDF-8, por ejemplo, trastornos musculares o neuromusculares que incluyen, por ejemplo, distrofia muscular (DM; incluyendo distrofia muscular de Duchenne), esclerosis lateral amiotrófica (ELA), atrofia muscular, atrofia de órganos, debilidad, síndrome del túnel carpiano, enfermedad pulmonar obstructiva congestiva, sarcopenia, caquexia, y otros síndromes de debilidad muscular (por ejemplo, causados por otras enfermedades y afecciones). Además, otros trastornos médicos que se pueden diagnosticar, pronosticar, controlar, tratar, mejorar o prevenir con los anticuerpos GDF-8 son del trastornos tejido adiposo tales como obesidad, diabetes de tipo 2, tolerancia alterada a la glucosa, síndromes metabólicos (por ejemplo, síndrome X), resistencia a la insulina inducida por traumatismos (tales como quemaduras o desequilibrio de nitrógeno), o enfermedades degenerativas óseas (por ejemplo, osteoartritis, osteoporosis, etc.). En realizaciones preferentes, los trastornos que se diagnostican, pronostican, controlan, tratan, mejoran o previenen con anticuerpos GDF-8 son trastornos musculares o neuromusculares. En una realización más preferente, el trastorno muscular o neuromuscular que se diagnostica, pronostica, controla, trata, mejora o previene con anticuerpos anti-GDF-8 es cualquiera de DM o ELA. En la realización más preferente de la invención, el trastorno muscular o neuromuscular que se diagnostica, pronostica, controla, trata, mejora o previene con antagonistas de GDF-8 de la presente invención, por ejemplo, anticuerpos que inhiben la actividad de GDF-8, es ELA.

20 Otros trastornos médicos que se pueden diagnosticar, pronosticar, controlar, tratar, mejorar o prevenir con antagonistas de GDF-8 son los asociados con una pérdida de hueso, que incluyen osteoporosis, especialmente en las mujeres de mayor edad y/o postmenopáusicas, osteoporosis inducida por glucocorticoides, osteopenia, osteoartritis, y fracturas relacionadas con la osteoporosis. Otras enfermedades y trastornos óseos metabólicos diana incluyen masa ósea reducida debido a terapia crónica con glucocorticoides, insuficiencia de gónadas prematura, supresión de andrógenos, deficiencia de vitamina D, hiperparatiroidismo secundario, deficiencias nutricionales, y anorexia nerviosa. Los anticuerpos se usan preferentemente para diagnosticar, pronosticar, controlar, tratar, mejorar o prevenir tales trastornos en mamíferos, en particular en seres humanos.

25 Los anticuerpos de la presente invención se administran en cantidades terapéuticamente eficaces. Generalmente, una cantidad terapéuticamente eficaz puede variar con la edad, condición, y sexo del sujeto, así como con la gravedad de la afección médica en el sujeto. La dosificación la puede determinar un médico y la puede ajustar, si fuera necesario, para que se adapte a los efectos observados del tratamiento. La toxicidad de eficacia terapéutica de tales compuestos se puede determinar mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la DL₅₀ (la dosis letal para un 50 % de una población) y la DE₅₀ (la dosis terapéutica mente eficaz en un 50 % de una población). La relación de dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos, es decir, la DL₅₀/DE₅₀, es el índice terapéutico, y son preferentes los anticuerpos que presentan índices terapéuticos elevados.

30 Los datos obtenidos a partir de ensayos de cultivo celular y estudios en animales se pueden usar en la formulación de un intervalo de dosificación para su uso en seres humanos. La dosificación de tales compuestos permanece preferentemente dentro de un intervalo de concentraciones en circulación que incluye la DE₅₀ con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación y la vía de administración. Para cualquier anticuerpo usado en la presente invención, la dosis terapéuticamente eficaz se puede

estimar inicialmente a partir de ensayos en cultivo celular. Una dosis se puede formular en modelos animales para conseguir un intervalo de concentración en plasma circulante que incluye la CI_{50} (por ejemplo, la concentración del anticuerpo de ensayo que consigue una inhibición máxima media de síntomas o una inhibición máxima media de inhibición de la actividad biológica) tal como se determina en cultivo celular. Se pueden medir niveles en plasma, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alto rendimiento. Los efectos de cualquier dosificación en particular se pueden controlar mediante un bioensayo adecuado. Los ejemplos de bioensayos adecuados incluyen, pero no se limitan a, ensayos de replicación del ADN, ensayos basados en transcripción, ensayos de unión a proteína/receptor de GDF-8, ensayos de creatina quinasa, ensayos en base a la diferenciación de preadipocitos, ensayos en base a la absorción de glucosa en adipocitos, y ensayos inmunológicos.

Generalmente, las composiciones se administran de modo que los anticuerpos o sus fragmentos de unión se proporcionan a una dosis de 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a 150 mg/kg , de 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a 100 mg/kg , de 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a 50 mg/kg , de 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a 20 mg/kg , de 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a 10 mg/kg , de 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a 1 mg/kg , de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a 1 mg/kg , de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a 1 mg/kg , y de 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a 1 mg/kg . Preferentemente, los anticuerpos se proporcionan como una dosis de bolo para maximizar los niveles en circulación de anticuerpos para el período de tiempo más elevado después de la dosis. También se puede usar infusión continua antes, después, o en lugar de la dosis de bolo.

IV. Procedimientos para Identificar Agentes Terapéuticos

Además, otro aspecto de la divulgación proporciona un procedimiento para identificar agentes terapéuticos útiles en el tratamiento del músculo, por ejemplo, trastornos de metabolismo de la glucosa, adiposos, y óseos. En la técnica se conocen ensayos de identificación sistemática apropiados, por ejemplo, ensayos basados en ELISA. En tal ensayo de identificación sistemática, se forma una primera mezcla de unión por combinación de un anticuerpo de la invención y su ligando, GDF-8, y se mide la cantidad de unión entre el ligando y el anticuerpo en la primera mezcla de unión (M_0). También se forma una segunda mezcla de unión por combinación del anticuerpo, el ligando, y un compuesto o agente a identificar sistemáticamente, y se mide la cantidad de unión entre el ligando y el anticuerpo en la segunda mezcla de unión (M_1). Las cantidades de unión en la primera y segunda mezclas de unión se comparan a continuación, por ejemplo, calculando la relación M_1/M_0 . Se considera que el compuesto o agente es capaz de inhibir la actividad de GDF-8 si se observa una disminución de la unión en la segunda mezcla de unión en comparación con la primera mezcla de unión (es decir, $M_1/M_0 < 1$). La formulación y optimización de las mezclas de unión está dentro del nivel de experiencia en la materia; tales mezclas de unión también pueden contener tampones y sales necesarias para aumentar o para optimizar la unión, y se pueden incluir ensayos de control adicionales en el ensayo de identificación sistemática de la divulgación.

De este modo se pueden identificar compuestos que se encuentra que reducen la unión de anticuerpo-ligando en al menos aproximadamente un 10 % (es decir, $M_1/M_0 < 0,9$), preferentemente superior a aproximadamente un 30 %, y a continuación, si se desea, identificar sistemáticamente de forma secundaria la capacidad para inhibir la actividad de GDF-8 en otros ensayos tales como el ensayos de unión a ActRIIB, u otros ensayos basados en células e *in vivo* tal como se describe en dos Ejemplos o se conocen bien en la técnica.

V. Moléculas Pequeñas

También se puede conseguir la inhibición de la actividad de GDF-8 en un organismo (o sujeto) afectado con (o con riesgo de) un trastorno asociado con GDF-8, o en una célula de tal organismo implicado en tales trastornos, a través del uso de moléculas pequeñas antagonistas (normalmente moléculas pequeñas orgánicas) que antagonizan, es decir, inhiben la actividad de, GDF-8. Se pueden identificar nuevas moléculas pequeñas antagonistas mediante los procedimientos de identificación sistemática que se han descrito anteriormente y se pueden usar en los procedimientos de tratamiento que se describen en el presente documento.

A la inversa, el aumento de la actividad de GDF-8 en un organismo (o sujeto) afectado con (o en riesgo de) un trastorno relacionado con la disminución de la expresión y/o actividad de GDF-8 o un trastorno relacionado con la disminución de los niveles de GDF-8 también se puede conseguir a través del uso de moléculas pequeñas (normalmente moléculas pequeñas orgánicas) que antagonizan, es decir, aumentan la actividad de, GDF-8. Se pueden identificar nuevas moléculas pequeñas antagonistas mediante los procedimientos de identificación sistemática que se han descrito anteriormente y se pueden usar en los procedimientos de tratamiento que se describen en el presente documento.

VI. Procedimientos para Diagnosticar, Pronosticar, y Controlar el Progreso de Trastornos Óseos, Adiposos, de Metabolismo de Glucosa, y Musculares

Además de tratar, por ejemplo, trastornos musculares, óseos, de metabolismo de glucosa, y adiposos, la presente divulgación proporciona procedimientos para diagnosticar tales trastornos mediante la detección de la disminución o aumento de GDF-8 en una muestra biológica, por ejemplo, suero, plasma, fluido de lavado broncoalveolar, esputo, biopsias (por ejemplo, de músculo), etc. "Diagnóstico" o "diagnosticar" se refieren a identificar la presencia o ausencia de una afección patológica. Los procedimientos de diagnóstico implican la detección de la presencia de GDF-8, por ejemplo, mediante la determinación de una cantidad de ensayo de polipéptido GDF-8 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 que intervalo de un individuo o individuos que se sabe que no padecen tal trastorno) para el polipéptido GDF-8. Aunque un procedimiento de diagnóstico en particular puede no proporcionar un diagnóstico definitivo de ELA u otros trastornos asociados con GDF-8, es suficiente si el procedimiento proporciona una indicación positiva de que ayuda en el diagnóstico.

5 La presente divulgación también proporciona procedimientos para pronosticar ELA u otros trastornos musculares, o por ejemplo, trastornos óseos, de metabolismo de glucosa, y adiposos mediante la detección de la regulación positiva de GDF-8. "Pronóstico" o "pronosticar" se refieren a predecir el desarrollo y/o gravedad probable de una afección patológica. Los procedimientos de pronóstico implican la determinación de la cantidad de ensayo de GDF-8 en una muestra biológica de un sujeto, y comparar la cantidad de ensayo con una cantidad o intervalo de pronóstico (por ejemplo, una cantidad por intervalos de individuos con gravedades variables, por ejemplo, de ELA) para GDF-8. Diversas cantidades del GDF-8 en una muestra de ensayos son coherentes con determinados pronósticos de ELA u otros trastornos asociados con GDF-8. La detección de la cantidad de GDF-8 a un nivel de pronóstico en particular proporciona un pronóstico para el sujeto.

15 La presente divulgación también proporciona procedimientos para controlar el transcurso de ELA u otros trastornos asociados con GDF-8 mediante la detección de la regulación positiva o regulación negativa de GDF-8. Los procedimientos de control implican la determinación de las cantidades de ensayo de GDF-8 en muestras biológicas tomadas de un sujeto en un primer y segundo momento, y comparar las cantidades. Un cambio en la cantidad de GDF-8 entre el primer y segundo momento indica un cambio en el transcurso, por ejemplo, de la gravedad de ELA u otros trastornos asociados con GDF-8. Un experto en la materia reconocerá que en trastornos asociados con GDF-8 similares a ELA, por ejemplo, en los que se desea un aumento de la masa muscular, una disminución de la cantidad de GDF-8 y/o actividad de GDF-8 entre el primer y segundo momento indica la remisión del trastorno, y un aumento en la cantidad indica la progresión del trastorno. Tales ensayos de control también son útiles para evaluar la eficacia de una intervención terapéutica en particular (por ejemplo, atenuación y/o inversión de la enfermedad) en pacientes que se están tratando para ELA u otros trastornos asociados con GDF-8.

25 Los anticuerpos de la presente invención se pueden usar para diagnóstico, pronóstico o control mediante la detección de la presencia de GDF-8 *in vivo* o *in vitro*. Tales procedimientos de detección son bien conocidos en la técnica e incluyen ELISA, radioinmunoensayo, inmunoensayo, transferencia de Western, inmunofluorescencia, inmunoprecipitación, y otras técnicas comparables. Los anticuerpos se pueden proporcionar adicionalmente en un kit de diagnóstico que incorpora una o más de estas técnicas para detectar GDF-8. Tal kit puede contener otros componentes, envases, instrucciones u otro material para ayudar a la detección de la proteína y uso del kit.

30 Cuando los anticuerpos están destinados a fines de diagnóstico, pronóstico, o control, puede ser deseable modificarlos, por ejemplo, con un grupo ligando (tal como biotina) o un grupo marcado detectable (tal como un grupo fluorescente, un radioisótopo o una enzima). Si se desea, los anticuerpos (bien policlonales o monoclonales) se pueden marcar usando técnicas convencionales. Las marcas adecuadas incluyen fluoróforos, cromóforos, átomos radiactivos, reactivos con densidad electrónica, enzimas, ligandos que tienen asociados de unión específicos. Por lo general las enzimas se detectan por su actividad. Por ejemplo, la peroxidasa de rábano picante se puede detectar por su capacidad para convertir la tetrametilbencidina (TMB) en un pigmento de color azul, que se puede cuantificar con un espectrofotómetro. Otras marcas adecuadas pueden incluir biotina y avidina o estreptavidina, IgG y proteína A, y las numerosas parejas de receptor-ligando conocidas en la técnica. Otras permutaciones y posibilidades serán rápidamente evidentes para los expertos habituales en la materia, y se consideran como equivalentes dentro del ámbito de la presente invención.

VII. Composiciones Farmacéuticas y Procedimientos de Administración

La presente divulgación proporciona composiciones que comprenden un antagonista de GDF-8, es decir, polipéptidos, polinucleótidos, vectores, anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, y moléculas pequeñas. Tales composiciones pueden ser adecuadas para uso farmacéutico y administración a pacientes. Las composiciones comprenden por lo general una o más moléculas de la presente invención, preferentemente un anticuerpo, y un excipiente farmacéuticamente aceptable. Los anticuerpos anti-GDF-8 de la presente invención se pueden usar *in vitro*, *ex vivo*, o incorporar en una composición farmacéutica cuando se combinan con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "excipiente farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de disolventes, soluciones, tampones, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retraso de la absorción, y similares, que son compatible con la administración farmacéutica. Tal composición puede contener, además de los anticuerpos de la invención y vehículo, diversos diluyentes, cargas, sales, tampones, estabilizantes, solubilizantes, y otros materiales bien conocidos en la técnica. La expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a un material no tóxico que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica del principio o principios activos. Las características del vehículo dependerán de la vía de administración. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Las composiciones también pueden contener otros compuestos activos que proporcionan funciones terapéuticas complementarias, adicionales, o aumentadas. Las composiciones farmacéuticas también se prevén incluir en un envase, paquete, o dosificador junto con instrucciones para administración.

La composición farmacéutica de la invención puede estar en forma de un liposoma en el que se combina un anticuerpo de la invención, además de otros vehículos farmacéuticamente aceptable, con agentes anfipáticos tales como lípidos que existen en forma agregada como micelas, monocapas insolubles, cristales líquidos, o capas lamelares mientras están en solución acuosa. Los líquidos adecuados para formulación de liposomas incluyen, sin limitación, monoglicéridos, diglicéridos, sulfátidos, lisolecitina, fosfolípidos, saponina, ácidos biliares, y similares. La preparación de tales formulaciones liposomales esta dentro del nivel de experiencia en la materia.

Como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad total de cada componente activo de la composición farmacéutica o procedimiento que es suficiente para mostrar un beneficio significativo en el paciente, por ejemplo, mejora de síntomas de, curación de, o aumento de la tasa de curación de tales afecciones. Cuando se aplica a un principio activo individual, se administra sola, la expresión se refiere a ese ingrediente solo. Cuando se aplica una combinación, la expresión se refiere a cantidades combinadas de los principios activos que dan como resultado del efecto terapéutico, tanto si se administran en combinación, en serie o de forma simultánea.

En la práctica del uso de la presente invención, una cantidad terapéuticamente eficaz, por ejemplo, de un anticuerpo que se une a GDF-8 e interfiere con la señalización de GDF-8 se administra a un sujeto, por ejemplo, mamífero (por ejemplo, un ser humano). Un anticuerpo de la invención se puede administrar de acuerdo con el procedimiento de la invención solo o en combinación con otras terapias tales como agentes antiinflamatorios. Cuando se administra con uno o más agentes, un anticuerpo de la invención se puede administrar de forma simultánea con el segundo agente, o secuencialmente. Si se administra secuencialmente, el médico que atiende al paciente decidirá la secuencia apropiada de administración de un anticuerpo de la invención en combinación con otros agentes.

En una realización, los anticuerpos de la invención, por ejemplo, composiciones farmacéuticas de los mismos, se administran en terapia de combinación, es decir, se combinan con otros agentes, por ejemplo, agentes terapéuticos, que son útiles para tratar afecciones o trastornos patológicos, tales como trastornos musculares, trastornos neuromusculares, trastornos degenerativos óseos, trastornos óseos metabólicos o inducidos, trastornos adiposos, trastornos del metabolismo de la glucosa o trastornos relacionados con la insulina, por ejemplo, así como trastornos alérgicos y inflamatorios. La expresión "en combinación" en este contexto se refiere a que los agentes se proporcionan básicamente de forma contemporánea, ya sea de forma simultánea o secuencial. Si se proporcionan de forma secuencial, en el inicio de la administración del segundo compuesto, el primero de los dos compuestos todavía se puede detectar preferentemente a concentraciones eficaces en el sitio de tratamiento o en el sujeto.

Una composición farmacéutica de la invención se formula para que sea compatible con su vía de administración pretendida. Los procedimientos para conseguir la administración son conocidos por los expertos habituales en la materia. También puede ser posible obtener composiciones que se deben administrar por vía tópica o por vía oral, o que pueden ser capaces de transmisión a través de membranas mucosas. La administración de un anticuerpo de la invención usado en una composición farmacéutica para poner en práctica el procedimiento de la presente invención se puede realizar en una diversidad de vías convencionales, tales como ingestión oral, inhalación, inyección cutánea, subcutánea, o intravenosa.

Las soluciones o suspensiones usadas para aplicación intradérmica o subcutánea por lo general 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 etilendiamintetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos; y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro sódico o dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido sódico. Tales preparaciones se pueden incluir en ampollas, jeringas desechables o viales de múltiples dosis fabricados con vidrio o plástico.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para inyección incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para administración intravenosa, los vehículos adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor™ EL (BASF, Parsippany, NJ) o solución salina tamponada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debería ser fluida hasta el punto en el que exista una fácil capacidad de inyección. Debe ser estable en las condiciones de preparación y almacenamiento y se debe conservar frente a la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos se puede conseguir mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferente incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, y cloruro sódico en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede producir mediante la inclusión en la composición de un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

5 Cuando una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de la invención se administra, por ejemplo, mediante inyección intravenosa, cutánea o subcutánea, el agente de unión estará en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable libre de pirógenos. La preparación de tales soluciones de proteínas parenteralmente aceptables, teniendo en cuenta el pH, isotonicidad, estabilidad, y similares, está dentro de la experiencia en la materia. Una composición farmacéutica preferente para inyección intravenosa, cutánea, o subcutánea debería contener, además de agentes de unión, un vehículo isotónico tal como inyección de cloruro sódico, inyección de Ringer, inyección de dextrosa, inyección de dextrosa y cloruro sódico, inyección de Ringer lactada, u otro vehículo tal como se conoce en la técnica. La composición o composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden contener estabilizantes, conservantes, tampones, antioxidantes, otros aditivos conocidos por los expertos en la materia.

10 La cantidad de un anticuerpo de la invención (u otro antagonista de la invención) en la composición farmacéutica de la presente invención dependerá de la naturaleza y gravedad de la afección que se está tratando, y de la naturaleza de los tratamientos anteriores experimentados por el paciente. Por último, el médico que atiende decidirá la cantidad de anticuerpo con la que tratar a cada paciente individual. Inicialmente, un médico que atiende administrar dosis bajas de anticuerpo y observa la respuesta del paciente. Se pueden administrar dosis más elevadas de anticuerpo hasta que se obtiene el efecto terapéutico óptimo para el paciente, y en ese punto la dosificación por lo general no se aumenta adicionalmente. Se contempla que las diversas composiciones farmacéuticas usadas para poner en práctica el procedimiento de la presente invención deberían contener de aproximadamente 0,1 :g a 50 mg de anticuerpo por kg de peso corporal.

15 La duración de la terapia que usa la composición farmacéutica de la presente invención variara, dependiendo de la gravedad de la enfermedad que se está tratando y la afección y la respuesta idiosincrática potencial de cada paciente individual. Se contempla que la duración de cada aplicación de anticuerpo será a través, por ejemplo, de la vía subcutánea y, por ejemplo, en el intervalo de una vez a la semana. Por último, el médico que atiende decidirá la duración apropiada de la terapia que usa la composición farmacéutica de la presente invención.

20 Las composiciones orales incluyen por lo general un diluyente inerte o un vehículo comestible. Se pueden encerraren cápsulas de gelatina o formar comprimidos por compresión. Con el fin de administración terapéutica oral, el antagonista de GDF-8 (por ejemplo, anticuerpo, molécula pequeña, etc.) se puede incorporar con excipientes y usar en forma de comprimidos o cápsulas. Como parte de la composición se pueden incluir agentes de unión y/o materiales adyuvantes farmacéuticamente compatibles. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de una naturaleza similar; un aglutinante tal como as celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa; un agente disgregante tal como ácido algínico, Primogel™, o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o Sterotes™; un agente de deslizamiento tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente saborizante tal como menta, salicilato de metilo, o sabor a naranja.

25 Cuando una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica de la invención, por ejemplo, un anticuerpo que se une a GDF-8 e interfiere con la señalización de GDF-8, se administra por vía oral, el agente de unión estará en forma de un comprimido, cápsula, polvo, solución o elixir. Cuando se administra en forma de comprimido, la composición farmacéutica de la invención puede contener adicionalmente un vehículo sólido tal como una gelatina o un adyuvante. El comprimido, cápsula, y polvo contienen de aproximadamente un 5 a un 95 % de agente de unión, y preferentemente de aproximadamente un 25 a un 90 % de agente de unión. Cuando se administra en forma líquida, se puede añadir un vehículo líquido tal como agua, petróleo, aceites de origen animal o vegetal tales como aceite de cacahuete, aceite mineral, aceite de semilla de soja, o aceite de sésamo, o aceites sintéticos (después de tener en cuenta las alergias del paciente individual y/o la mayoría de la población de individuos a tales vehículos líquidos). La forma líquida de la composición farmacéutica puede contener adicionalmente solución salina fisiológica, dextrosa u otra solución de sacárido, o glicoles tales como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol. Cuando se administra en forma líquida, la composición farmacéutica contiene de aproximadamente un 0,5 a un 90 % en peso del agente de unión, y preferentemente de aproximadamente un 1 a un 50 % del agente de unión.

30 Para administración por inhalación, un antagonista de GDF-8 se administra en forma de una pulverización en aerosol a partir de un envase o dosificador presurizado, que contiene un propelente adecuado, por ejemplo, un gas tal como dióxido de carbono, o un nebulizador. Por consiguiente, los compuestos que se describen en el presente documento se pueden administrar 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 el tracto respiratorio tanto superior como inferior, excepto cuando se indica de otro modo. Se puede administrar uno o más anticuerpos de GDF-8 en combinación con una o más de las modalidades existentes para el tratamiento de enfermedades pulmonares.

35 En un ejemplo, el compuesto se formula para un nebulizador. En una realización, el compuesto se puede almacenar en una forma liofilizada (por ejemplo, a temperatura ambiente) y reconstituir en solución antes de la inhalación.

40 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 de polvo) y N° 6.012.454 (un inhalador de polvo seco)). El inhalador puede incluir compartimentos separados para el compuesto activo fa un pH

adecuado para almacenamiento y otro compartimento para un tampón de neutralización, y un mecanismo para combinar el compuesto con un tampón de neutralización inmediatamente antes de la atomización. En una realización, el inhalador es un inhalador de dosis medida.

- 5 Aunque no es necesario, se pueden usar potenciales de la administración tales como tensioactivos para aumentar la administración pulmonar. Un "tensioactivo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto que tiene restos hidrófilos y lipófilos que estimulan la absorción un fármaco por interacción con una superficie de contacto entre dos fases inmiscibles. Los tensioactivos son útiles con partículas secas por varias razones, por ejemplo, reducción de la aglomeración de partículas, reducción fagocitosis de macrófagos, etc. Cuando se acoplan con tensioactivo pulmonar, se puede conseguir una absorción más eficaz del compuesto porque los tensioactivos, tales como DPPC, facilitarán en gran medida la difusión del compuesto. Los tensioactivo son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitara, fosfoglicéridos, por ejemplo, fosfatidilcolinas, dipalmitoil L-alfa-fosfatidilcolina (DPPC) y difosfatidil glicerol (DPPG); hexadecanol; ácidos grasos; polietilenglicol (PEG); polioxietileno-9-; éter laurílico; ácido palmítico; ácido oleico; trioleato de sorbitán (Span 85); glicocolato; surfactina; poloxómero; éster de ácido graso de sorbitán; trioleato de sorbitán; tiloxapol; y fosfolípidos.
- 10 La administración sistémica también puede ser por medios transmucosales o transdérmicos. Por ejemplo, en el caso de anticuerpos que comprenden la parte de Fc, las composiciones pueden ser capaces de transmisión a través de membranas mucosas (por ejemplo, intestino, boca, o pulmones) a través de la ruta mediada por el receptor de FcRn (por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 6.030.613). En general, la administración transmucosal se puede conseguir, por ejemplo, a través del uso de pastillas para chupar, pulverizaciones nasales, inhaladores, o supositorios. Para administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en pomadas, ungüentos, geles, parches o cremas tal como se conoce por lo general en la técnica. Para administración transmucosal o transdérmica, en la formulación se usan agentes penetrantes apropiados para la barrera a permear. Tales agentes penetrantes se conocen por lo general en la técnica, e incluyen, por ejemplo, detergentes, sales biliares, y derivados del ácido fusídico.
- 15 Las composiciones farmacéuticas también pueden consistir en composiciones adecuadas para terapia génica, es decir, composiciones formadas por los polinucleótidos que se desvelan en el presente documento. en el caso de terapia génica, el vehículo farmacéuticamente aceptable puede incluir, por ejemplo, lípidos, esferas de colágeno, sistemas de emulsión catiónica, agua, tampones salinos, vectores virales, restos de quilomicrones, nanopartículas de polímero (por ejemplo, gelatina-ADN o quitosano-ADN), partículas de oro, complejos de polímeros, lipoplejos, poliplejos, etc. (véase, por ejemplo, Gardlik y col. (2005) Med. Sci. Monit. 11 (4): RA110-21).
- 20
- 25
- 30

Estabilización y Retención

En una realización, un anticuerpo de GDF-8 está asociado físicamente con un resto que mejora su estabilización y/o retención en circulación, por ejemplo, lavado en sangre, suero, linfa, broncopulmonar o broncoalveolar, u otros tejidos, por ejemplo, al menos 1,5, 2, 5, 10, o 50 veces.

- 35 Los antagonistas de la invención se pueden preparar con vehículos que protegerán frente a la rápida eliminación del organismo, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de administración microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como acetato de etileno y vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Los procedimientos para la preparación de tales formulaciones serán evidentes para los expertos en la técnica. Las suspensiones liposomales que contienen un antagonista de GDF-8, por ejemplo, uno o más anticuerpos anti-GDF-8, también se pueden usar como vehículos farmacéuticamente aceptable. Estas se pueden preparar de acuerdo con procedimientos conocidos por los expertos en la materia.
- 40

- Por ejemplo, un anticuerpo de GDF-8 se puede asociar con un polímero, por ejemplo, un polímero básicamente no antigénico, tal como óxidos de polialquileno u óxidos de polietileno. Los polímeros adecuados variarán básicamente en peso. Se pueden usar polímeros que tienen un peso molecular medio en número que varía de aproximadamente 200 a aproximadamente 35.000 (o de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 15.000, o de aproximadamente 2.000 a aproximadamente 12.500).
- 45

- Por ejemplo, un anticuerpo de GDF-8 se puede conjugar con un polímero hidrosoluble, por ejemplo, polímeros de polivinilo hidrófilos, por ejemplo, alcohol polivinílico y polivinilpirrolidona. Una lista no limitante de tales polímeros incluye homopolímeros de óxido de polialquileno tales como polietilenglicol (PEG) o polipropilenglicoles, polioles polioxietilenados, copolímeros de los mismos y copolímeros de bloque de los mismos, con la condición de que se mantenga la solubilidad en agua de block copolímeros de bloque. Los polímeros útiles adicionales incluyen polioxialquilenos tales como polioxietileno, polioxipropileno, y copolímeros de bloque de polioxietileno y polioxipropileno (Pluronic); polimetacrilatos; carbómeros; polisacáridos ramificados o sin ramificar, que comprenden los monómeros sacáridos 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 de hidroxietilo, amilosa, sulfato de dextrano, dextrano, dextrinas, glucógeno, o la subunidad polisacárida de mucopolisacáridos ácidos, por ejemplo, ácido hialurónico; polímeros de
- 50
- 55

alcoholes de azúcar tales como polisorbitol y polimanol; heparina, etc.

Otros compuestos también se pueden unir al mismo polímero, por ejemplo, una citotoxina, una marca, u otro agente de direccionamiento, por ejemplo otro anticuerpo de GDF8 o un ligando no relacionado. Para la reticulación se pueden usar óxidos de polialquileno monoactivados terminados en alcoxi (PAO), por ejemplo, polietilenglicoles terminados en monometoxi (mPEG), polímeros terminados en alquilo C₁₋₄ y óxidos de polietileno (glicoles) bisactivados (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.951.974).

En una realización, no es necesario que el polímero de antes de la reticulación con el ligando sea, pero preferentemente es, 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 debería ser muy inmunogénico en la forma del conjugado, ni tampoco debería poseer viscosidad que sea incompatible con infusión intravenosa, aerosolización o inyección, si se pretende administrar el conjugado 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 para purificar los productos de reacción a través de filtración en gel o cromatografía de intercambio iónico para recuperar derivados básicamente homogéneos. En otras realizaciones, el polímero contiene dos o más grupos reactivos con el fin de unir múltiples ligandos a la estructura principal del polímero. De nuevo, se puede usar filtración en gel o cromatografía de intercambio iónico para recuperar el derivado deseado en forma básicamente 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 elegido dependerá del tamaño eficaz del conjugado a conseguir, la naturaleza (por ejemplo, estructura, tal como lineal o ramificada) del polímero, y el grado de derivatización.

Se puede usar un enlace covalente para unir un anticuerpo de GDF8 a un polímero, por ejemplo, reticulación con el grupo amino N-terminal del ligando y grupos épsilon amino encontrados en restos de lisina del ligando, así como otros grupos amino, imino, carboxilo, sulfhidrilo, hidroxilo u otros grupos hidrófilos. El polímero se puede unir de forma covalente directamente al anticuerpo de GDF-8 sin el uso de un agente de recirculación multifuncional (normalmente bifuncional). La unión covalente a grupos amino se consigue por reacciones químicas conocidas basadas en cloruro cianúrico, carbonil diimidazol y grupos reactivos aldehído (alcóxido de PEG más dietil acetal de bromoacetaldehído; PEG más DMSO y anhídrido acético, o PEG cloruro más el fenóxido de 4-hidroxibenzaldehído, ésteres de succinimidilo activados, ditiocarbonato de PEG activado, PEG activado con 2,4,5-triclorofenilcloroformiato o P-nitrofenilcloroformiato). Los grupos carboxilo se pueden derivatizar por acoplamiento de PEG-amina usando cabodiimida. Los grupos sulfhidrilo se pueden derivatizar por acoplamiento de PEG sustituido con 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 en el ligando (por ejemplo, grupos amino épsilon en restos de lisina) se pueden tiolar con 2-imino-tiolano (reactivo de Traut) y después acoplar con derivados que contengan maleimida de PEG, por ejemplo, tal como se describe en Pedley y col. (1994) Br. J. Cancer 70: 1126-30.

Están disponibles polímeros de PEG funcionalizados que se pueden unir a un anticuerpo de GDF8, por ejemplo, en Shearagua Polymers, Inc. (Huntsville, AL). Tales derivados de PEG disponibles en el mercado incluyen, por ejemplo, amino-PEG, ésteres de aminoácido de PEG, PEG-hidrazida, PEG-tiol, PEG-succinato, PEG carboximetilado, PEG-ácido propiónico, aminoácidos de PEG, succinato de PEG y succinimidilo, propionato de PEG y succinimidilo, éster de succinimidilo de PEG carboximetilado, carbonato de succinimidilo de PEG, ésteres de succinimidilo de aminoácidos de PEG, PEG-oxicarbonilimidazol, PEG-carbonato de nitrofenilo, tresilato de PEG, PEG-éter glicidílico, PEG-aldehído, vinilsulfona de PEG, PEG-maleimida, PEG-disulfuro de ortopiridilo, PEG heterofuncionales, derivados de PEG vinilo, silanos de PEG, y fosfólidos de PEG. Las condiciones de reacción para el acoplamiento de estos derivados de PEG pueden variar dependiendo del anticuerpo de GDF-8, el grado deseado de derivatización, y del derivado de PEG usado. Algunos factores implicados en la elección de derivados de PEG incluyen: el punto de unión deseado (tal como grupos R de lisina o cisteína), estabilidad hidrolítica y reactividad de los derivados, estabilidad, toxicidad y antigenicidad de la unión, idoneidad para el análisis, etc. Las instrucciones específicas para el uso de cualquier derivado en particular se encuentran disponibles a través del fabricante.

Los conjugados de un anticuerpo de GDF-8 y un polímero se pueden separar 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. Las 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).

Se espera que los polinucleótidos y proteínas de la presente invención presente en uno o más de los usos o

actividades biológicas (incluyendo los asociados con ensayos que se mencionan a continuación) identificados en el presente documento. Los usos o actividades descritos para proteínas de la presente divulgación se pueden proporcionar mediante la administración o uso de tales proteínas, o mediante la administración o uso de polinucleótidos que codifican tales 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 vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las formas de dosificación unitarias de la invención se dictamina y depende directamente de las características únicas del compuesto activo, del efecto terapéutico a conseguir en particular, y de las limitaciones inherentes en la técnica de formulación de tal 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 anticuerpos de GDF-8 de la invención, por ejemplo, con o sin otros compuestos terapéuticos o para el uso de los anticuerpos de anti-GDF-8 como una herramienta de investigación o terapéutica para determinar la presencia y/o nivel de GDF-8 en una muestra biológica, tal como un kit de ELISA. En una realización de la divulgación, el kit comprende uno o más anticuerpos anti-GDF-8 formulados en un vehículo farmacéutico, y al menos un agente, por ejemplo, un agente terapéutico, formulado según sea apropiado, en una o más preparaciones farmacéuticas individuales.

Los ejemplos que siguen continuación se exponen para ayudar a comprender la invención pero no pretenden, ni se deberían interpretar como, limitantes del ámbito de la invención en modo alguno. Los Ejemplos no incluyen descripciones detalladas de procedimientos convencionales, tales como formación de hibridomas, ELISA, ensayos de proliferación, análisis de citometría de flujo y técnicas de ADN recombinante. Tales procedimientos son bien conocidos por los expertos habituales en la materia.

Ejemplos

Ejemplo 1

Creación e Identificación de Anticuerpo RK35 Anti-GDF-8

Se aislaron proteína GDF-8 humana (GDF-8 maduro y propéptido de GDF-8) y proteína BMP-11 y se caracterizaron tal como se describe en la Solicitud de Patente Publicada de Estados Unidos N° 2004/0142382.

Se inmunizaron seis ratones BALB/c hembra genosuprimidos para miostatina (8 semanas de edad; McPherron y col., mencionado anteriormente) mediante inyecciones cutáneas con 20 µg de dímero de GDF-8 recombinante en adyuvante completo de Freund.

Se proporcionaron varias inyecciones de refuerzo de la misma cantidad de antígeno en adyuvante incompleto de Freund en intervalos de 2 semanas y se administró una inyección intravenosa final (vena de la cola) de 2 µg en PBS antes de la fusión. Los esplenocitos de dos de los ratones que demostraban las titulaciones de anticuerpo más elevadas se fusionaron con células de mieloma de ratón (N° de Registro de la ATCC P3X63.Ag8.653) usando técnicas convencionales (Oi y Herzenberger (1980) En: Mishell, B.B., Shiigi, S.M., Henry, C., Mishell, R.I. (Eds.), Selected Methods in Cellular Immunology W.H. Freeman, San Francisco, páginas 351-72). Después de 10-14 días, nos sobrenadan que se cosecharon y se identificaron sistemáticamente para producción de anticuerpo anti-GDF-8 mediante ELISA en fase sólida y de solución (Whittemore y col., mencionado anteriormente). Se usaron técnicas convencionales de ELISA y el ensayo indicador de pGL3-(CAGA)₁₂ (Theis y col (2001) Growth Factors 18: 251-59) para determinar la CI₅₀ a la inhibición de la unión de miostatina a su receptor, ActRIIB, usando un ActRIIB-Fc quimérico generado por fusión del dominio extracelular del receptor de ActRIIB-Fc humano con la región Fc de la IgG1 humana. Los hibridoma elegidos para estudios adicionales se volvieron monoclonales dilución limitante repetida para asegurar su monoclonalidad. Se seleccionó anticuerpo RK35 monoclonal para estudio adicional.

Ejemplo 2

El anticuerpo monoclonal RK35 tiene afinidad elevada para GDF-8 y presenta actividad de neutralización

Ejemplo 2.1: Procedimientos Experimentales

Para el ELISA, se revistió GDF-8 biotinilado durante una noche a 4 °C en placas de microtitulación de estreptavidina de 96 pocillos (Pierce, Rockford, IL) a 1 µg/ml. Después del revestimiento, las soluciones se retiraron de los pocillos, y las placas se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente en solución SuperBlock (Pierce). Las placas se aclararon con PBS, y se añadieron 100 µl de anticuerpo RK35 a los pocillos a diversas concentraciones. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora y a continuación se lavaron con PBS. A cada pocillo, se añadieron 100 µl de una dilución a 1:5000 de conjugado anti-hulgG-HRP (Southern Biotech, Birmingham, AL) y las

placas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Cada placa se lavó tres veces con PBS. Se añadió sustrato de TMB (100 µl) a cada pocillo y se incubó hasta desarrollo del color. La reacción se detuvo mediante la adición de 100 µl de H₂SO₄ 0,18 M. La señal generada se midió por lectura de la absorbancia a 450 nm usando un lector de placas de microtitulación. Se confirmó la unión a GDF-8 usando anticuerpo de control de isotipo humano.

- 5 Se revistió quimera de ActRIIB-Fc recombinante (R&D Systems, Minneapolis, MN, N° de Cat. 339-RB/CF) en placas de ensayo de fondo plano de 96 pocillos (Costar, NY, N° de Cat. 3590) a 1 µg/ml en tampón de carbonato sódico 0,2 M durante una noche a 4 °C. A continuación, las placas se bloquearon con 1 mg/ml de albúmina en suero bovino y se lavaron después del protocolo de ELISA convencional. Se añadieron alícuotas (100 µl) de GDF-8 o BMP-11 biotinilado a la placa de ELISA bloqueada a diversas concentraciones, se incubó durante 1 h, se lavó, y la cantidad de GDF-8 o BMP-11 unidos se detectó con estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (SA-HRP, BD PharMingen, San Diego, CA, N° de Cat. 13047E) seguido de la adición de TMB (KPL, Gaithersburg, MD, N° de Cat. 50-76-04). Se tomaron medidas colorimétricas a 450 nm en un lector de microplacas de Molecular Devices. Para analizar la actividad inhibitoria, se sometió a ensayo RK35 a diversas concentraciones por preincubación con 20 ng/ml de GDF-8 o 20 ng/ml de BMP-11. Después de incubación durante 1 h a temperatura ambiente, se añadieron 100 µl de RK35 y la mezcla de GDF-8 o BMP-11 se añadió a la placa. La detección y la cuantificación del factor unido se describe en Whittemore y col. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 300: 965-71.

Para demostrar la actividad de GDF-8, se desarrolló un ensayo de gen indicador (RGA) usando un vector pGL3(CAGA)₁₂ indicador que expresa luciferasa bajo el control de promotor inducido por TGF-β. La CAGA es una secuencia sensible a TGF-β dentro del promotor del gen PAI-1 inducido por TGF-β (Denner y col. (1998) *EMBO J.* 17: 3091-3100). Un vector indicador que contiene 12 cajas CAGA se preparó usando el plásmido pGL3 indicador de luciferasa básico (Promega, Madison, WI). La caja TATA y el sitio de iniciación de la transcripción del promotor tardío principal de adenovirus (-35/+10) se insertó entre los sitios BglII y HindIII. Los oligonucleótidos que contienen 12 repeticiones de las cajas CAGA, es decir, AGCCAGACA, se hibridar o NYSE clonaron en el sitio XhoI. La línea celular de rhabdomyosarcoma humano A204 (HTB-82 de la ATCC) se transfectar de forma transitoria con pGL3(CAGA)₁₂ usando reactivo de transfección FuGENE 6 (Boehringer Mannheim, Alemania). Después de la transfección, las células se cultivaron en placas de 96 pocillos en medio 5A de McCoy complementado con glutamina 2 mM, 100 U/ml de estreptomycin, 100 µg/ml de penicilina y suero de ternero fetal al 10 % durante 16 h. a continuación, las células se trataron con o sin 10 ng/ml de GDF-8 en medio 5A de McCoy con glutamina, estreptomycin, penicilina y 1 mg/ml de albúmina de suero bovino durante 6 h a 37 °C. La luciferasa se cuantificó en las células tratadas usando el Sistema de Ensayo de Luciferasa (Promega). Para someter a ensayo la actividad inhibitoria de RK35, GDF-8 se preincubó con el anticuerpo durante 1 h a temperatura ambiente. Esta mezcla se añadió a continuación a las células transfectadas y las células se incubaron durante 6 h a 37 °C. La luciferasa se cuantificó usando el Sistema de Ensayo de Luciferasa (Promega).

Ejemplo 2.2: Resultados

- 35 Se generó un anticuerpo monoclonal de ratón de alta afinidad para miostatina por inmunización de ratones genosuprimidos para GDF-8 con GDF-8 humano recombinante purificado, que tiene una secuencia aminoácidos idéntica a la de la miostatina de murino madura (McPherron y col., 1997). El anticuerpo RK35 se unió con alta afinidad a GDF-8 tal como se somete a ensayo con ELISA directo (4 nM; **FIG. 1A**). Se usó un ELISA de competición para evaluar la capacidad de RK35 para inhibir la unión de GDF-8 a su receptor de alta afinidad, ActRIIB. RK35 bloqueó la unión de GDF-8 biotinilado a ActRIIB-Fc inmovilizado con una CI₅₀ ~ 2,5 nM (**FIG. 1B**). El ActRIIB soluble también bloqueó la unión de GDF-8 a ActRIIB-Fc inmovilizado mientras que los anticuerpos de control no bloqueaban la unión. La actividad de neutralización de RK35 también se midió usando un ensayo indicador basado en células pGL3-(CAGA)₁₂. En este ensayo, el gen de luciferasa se clonó bajo el control de promotor sensible a GDF-8/TGF-β y células de rhabdomyosarcoma A204 humano se transfectaron de forma transitoria con el plásmido indicador. Los aumentos de la actividad de luciferasa en células A204 inducida por GDF-8 se bloquearon de una forma dependiente de la dosis con RK35 (**FIG. 1C**). RK35 redujo la actividad de la transición de la señal de GDF-8 con una CI₅₀ de 0,2 nM. Por lo tanto, RK35 es un nuevo anticuerpo de neutralización monoclonal de murino altamente potente dirigido contra GDF-8.

Ejemplo 3

- 50 Actividad *In Vivo* de RK35 en Modelos de Roedor de Tipo Silvestre y de ELA

Ejemplo 3.1: Procedimientos Experimentales

Ejemplo 3.1.1: Animales y Tratamiento con Fármaco

- 55 Todos los procedimientos que implicaban fueron aprobados por el IACUC de cualquiera de la Universidad de Pensilvania o Wyeth. Se cruzaron ratones transgénicos que expresan SODG93A humano (Gurney y col., mencionado anteriormente) en un antecedente híbrido de B6SJL (Jackson Laboratories) de forma interna con ratones hembra reproductores B6SJLF1 (Jackson Laboratories). La progenie se identificó sistemáticamente por PCR; los ratones negativos para el transgén se usaron como controles de tipo silvestre de camada emparejados por edad. Los ratones se dividieron en cuatro grupos: 29 ratones SODG93A tratados con el anticuerpo RK35anti-

miostatina, 28 ratones SODG93A se trataron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) (vehículo), 23 ratones de tipo silvestre se trataron con RK35, y 23 ratones de tipo silvestre se trataron con PBS. Comenzando a los 28 días después del nacimiento, los ratones se inyectaron por vía intraperitoneal en una base semanal, con cualquiera de anticuerpo monoclonal RK35 anti-GDF-8 o un volumen equivalente de PBS. La primera dosis fue de 40 mg/kg; las dosis posteriores fueron de 20 mg/kg/semana siguiendo el protocolo descrito para el anticuerpo JA16 anti-miostatina (Whittemore, y col., mencionado anteriormente). Se sacrificaron 9-12 ratones de cada grupo entre 84 y 90 días (12 semanas) de edad (media de 88 días) para evaluar la masa y la histología muscular en húmedo, y los ratones restantes se controlaron hasta que alcanzaban la enfermedad en el estadio terminal (~134 días), definido como una insuficiencia a la derecha a los 30 segundos a partir de decúbito lateral tanto izquierdo como derecho.

En paralelo, ratas transgénicas (58) que expresan SODG93A humano (Howland y col., mencionado anteriormente) en una mezcla igual de machos y hembras se administraron con cualquiera de PBS (vehículo) o RK35. Diez ratas de cada grupo se sacrificaron a los 95 días de edad para determinar el efecto de RK35 en la masa muscular en húmedo. Las 19 ratas restantes de cada grupo continuaron a través de la enfermedad en el estadio terminal. Se usó un segundo estudio usando ratas de control de la camada hembra transgénica así de tipo silvestre para comparar aumentos de peso corporal así como cambios en la resistencia al agarre a través de grupos de tratamiento y genotipo. En cada estudio, las ratas se inyectaron por vía intraperitoneal con RK35 a 40 mg/kg (a las 6 semanas (~42 días) de edad) y posteriormente se inyectaron con 20 mg/kg/semana o vehículo continuando hasta el sacrificio a los 95 días para analizar la masa muscular, o hasta el estadio terminal tal como se mide mediante insuficiencia refleja derecha.

20 **Ejemplo 3.1.2: Medidas de Peso Corporal y Masa Muscular**

Los pesos corporales iniciales se usaron para distribuir uniformemente los animales entre poblaciones base con el fin de asegurar esos corporales medios equivalentes al comienzo del estudio. El inicio de la pérdida de peso se puntuó como la edad a la que se observó la primera de tres medidas consecutivas de pérdida de peso. La masa popular en húmedo se determinó en el gastrocnemio, el tibial craneal, el cuádriceps, y el diafragma en un punto coherente con el inicio de la enfermedad (88 días para ratones, 95 días para ratas) y en el estadio terminal (~134 días para ratones y ~128 días para ratas). Los animales se sacrificaron y los músculos de cada pierna se diseccionaron cuantitativamente y se pesaron; se promediaron los valores de las piernas derecha e izquierda.

25 **Ejemplo 3.1.3: Histopatología Muscular y Recuentos de Neuronas Motoras**

Gastrocnemio y diafragma se fijaron y se seccionaron para tinción con H y E (Howland y col. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99: 1604-29). La puntuación para atrofia e hipertrofia se realizó con dos patólogos independientes, cegados a la entidad de la muestra. Se midieron los diámetros de la fibra por morfometría (Axiovision 4.3, Zeiss, Thornwood, NY) en el músculo gastrocnemio (ratones SODG93A tratados con PBS y RK35 y ratones de tipo silvestre tratados con PBS) a los 88 días y en el estadio terminal, así como el músculo del diafragma (ratones SODG93A tratados con PBS y RK35 y ratones de tipo silvestre tratados con PBS) y en el estadio terminal. Tres músculos por grupos se congelaron inmediatamente en isopentano enfriado con hielo seco, se criosectionaron hasta un espesor de 8 μm , y se inmunotifieron usando un anticuerpo anti-laminina (Sigma, St. Louis, MO; número de catálogo L9393). Se tomaron medidas lineales del diámetro máximo del eje menor de al menos doscientas fibras, usando el software Axiovision de Zeiss. Los diámetros de las fibras se agruparon en intervalos de 20 μm , y se generaron histogramas de frecuencia para cada grupo muscular.

Se realizaron recuentos de neuronas motoras en 3 ratones de cada grupo (tipo silvestre, SODG93A tratados con PBS, y SODG93A tratados con RK35) en la enfermedad tanto en el estado inicial como en el estadio terminal (total de 18 ratones analizados). Las columnas vertebrales retiradas de ratones decapitados se fijaron posteriormente en paraformaldehído al 4 %, a continuación las médulas se diseccionaron y se fijaron posteriormente durante un período adicional de 24 horas en paraformaldehído al 4 %. Usando tecnología MultiBrain™ (Neuroscience Associates, Knoxville, TN), 18 medidas espinales lumbares se embebieron juntas en un solo bloque, y se seccionaron transversalmente a 50 μm en el plano coronal a lo largo de todo el segmento (~6 mm) del aumento lumbar. Cada sexta sección (300 μm) se tiñó con tiónina NISSL para revelar cuerpos celulares (Bjugn (1993) Brain Res. 627: 25-33; Kieran y col. (2004) Nat. Med. 10: 402-05). Se realizaron recuentos usando dos enfoques independientes. En primer lugar, se analizaron diez secciones de médula espinal incluyendo L3-5 para cada uno de los 18 ratones por un observador cegado a la identidad de la muestra usando un Axoplan2 de Zeiss a 20x y 40x. Se hizo recuento de ambas astas ventrales de cada sección, identificando neuronas motoras sanas grandes por la presencia de nucleolos visibles tal como se ha descrito anteriormente (Kieran y col., mencionado anteriormente). Los datos resultantes se representaron como el número medio de neuronas motoras grandes por asta ventral. En segundo lugar, se analizaron secciones de la región L3-L5 de forma estereológica usando un Axioskop2 de Zeiss equipado con una plataforma de muestras motorizadas, microcator electrónico, y software de estereología (Stereo Investigator (MBF Bioscience, Williston, VT), tal como se describe (West y col. (1991) Anat. Rec. 231: 482-97; Schmitz y Hof (2000) J. Chem. Neuroanat. 20: 93-114; Schmitz y Hof (2005) Neuroscience 130: 813-31); se puntuaron neuronas α -motoras como neuronas con un área de proyección máxima superior a 300 μm^2 .

55 **Ejemplo 3.1.4: Análisis Fenotípico**

Se realizaron medidas de resistencia al agarre (Columbus Instruments, Columbus, OH) dos veces a la semana comenzando a los 28 días después del nacimiento en las extremidades tanto delanteras como posteriores de ratones tratados y de control (n = 8-24) tal como se describe en (LaMonte y col. (2002) Neuron 34: 715-24). Ratas transgénicas de tipo silvestre se sometieron ensayo para resistencia al agarre de las extremidades delanteras dos veces a la semana usando un medidor de resistencia al agarre de rata de Dunnett (MJS Technology, Stevenage, Hertfordshire, Inglaterra) en la fase inicial de la enfermedad (entre 95 y 110 días después del nacimiento; n = 10). Las ratas también se analizaron por sistema de rotación con aceleración constante (Ugo Basile, Comerio, Italia) así como control de anomalías en la marcha y datos de movilidad de las extremidades (no se muestran los datos).

Ejemplo 3.1.5: Electrofisiología

Se realizaron registros de electromiografía (EMG) y análisis de datos cegados al grupo de genotipo y tratamiento. Ratas anestesiadas con nembutal mantenidas a 35-37 °C de temperatura corporal se sometieron a EMG con aguja mediante la inserción de un electrodo de aguja monopolar concéntrico (9013R0011, Medtronic, MN, USA) en el músculo del diafragma expuesto de forma quirúrgica hasta que apareció un patrón de estallidos de interferencia de EMG con cara inspiración. Se tomaron señales eléctricas a 20 KHz con un equipo BIOPAC que consiste en Unidad de Adquisición de Datos MP150, Módulo de Interfaz Universal UIM100C, Módulo de Electromiografía EMG100C, y el software Acknowledge (BIOPAC Systems Inc, Goleta, CA). Primero se analizaron las señales para retirar el artefacto de 60 Hz y se filtró la banda de paso entre 500 y 1000 Hz para retirar artefactos en movimiento debido a la respiración y para enfatizar las descargas de la unidad motora. Los estallidos de EMG se identificaron por rectificación de la señal, filtrando a paso bajo a 10 Hz, y a continuación detectando los tiempos en los que la envoltura resultante era superior a este valor medio. No se hizo recuento de los estallidos que duraban menos de 100 ms, y se hizo el recuento de los periodos sin estallido que duraban menos de 100 ms como partes de los estallidos circundantes. Por último, los máximos en la señal sin rectificar se detectaron usando un umbral de detección de picos ajustado igual a tres veces la desviación estándar de la amplitud de la señal durante los periodos que sin estallido. El análisis de estallido máximo se realizó con software habitual escrito por K.C. McGill (Stanford University, CA), y la tasa de estallido máximo (Hz) para cada animal se calculó como el número medio de estallidos máximos dividido por la duración media del estallido.

Ejemplo 3.1.6: Análisis de Datos y Estadísticas

Se aplicó un modelo ANOVA de medidas repetidas de dos factores en los datos del peso corporal así como en todos los datos de resistencia al agarre usando un procedimiento mixto de SAS. Se aplicó un modelo lineal de ANOVA de dos factores en los datos de la masa muscular usando el procedimiento de GLM de SAS. Se analizaron datos de electrofisiología para los dos ensayos t de muestras. Para los datos del recuento de neuronas motoras, se usó un modelo lineal generalizado (GLM) suponiendo distribución de Poisson. Los datos de fibra muscular se analizaron por ANOVA seguido de ensayo de comparación múltiple de Tukey. Las comparaciones se consideraron estadísticamente significativas cuando los valores de p eran inferiores a 0,05; las comparaciones con $0,05 < p < 0,15$ se indicaron como tendencias.

Ejemplo 3.2: Resultados

Ejemplo 3.2.1: El tratamiento con RK35 aumentaba los pesos corporales de roedores SODG93A pero no prolongaba la supervivencia

Se trataron ratones SODG93A con el anticuerpo RK35 anti-miostatina comenzando a los 28 días después del nacimiento y continuando hasta el estadio terminal de la enfermedad (aproximadamente 134 días después del nacimiento). El tratamiento con RK35 dio como resultado un aumento significativo del peso corporal de 40 a 120 días después del nacimiento en comparación con ratones SODG93A tratados con PBS. Aunque los ratones SODG93A tratados con PBS alcanzaron un peso corporal máximo de $27,78 \pm 0,46$ g a los 70 días, los ratones tratados con RK35 alcanzaron un máximo de $32,13 \pm 0,48$ g, un aumento relativo de un 16 % (**FIG. 2A**). Aunque los ratones de tipo silvestre continuaban ganando peso durante todo el estudio, los ratones SODG93A tratados tanto con PBS como con RK35 comenzaron a mostrar signos significativos de pérdida de peso debido a la progresión de la enfermedad aproximadamente a los 98 días después del nacimiento.

Las ratas SODG93A transgénicas también se trataron con anticuerpo RK35 comenzando a los 42 días después del nacimiento y continuando hasta el estadio terminal de la enfermedad (~128 días de edad). El tratamiento con RK35 anti-miostatina condujo a un aumento del peso corporal en ratas SODG93A en comparación con ratas tratadas con PBS (**FIG. 2B**). Las ratas transgénicas que recibían RK35 pesaban significativamente más que las ratas transgénicas tratadas con PBS ya a los 60 días después del nacimiento ($p < 0,05$), que corresponde a 3 semanas después del inicio de la dosificación. Las ratas macho tratadas con RK35 alcanzaron un máximo de $458,8 \pm 6,5$ g a los 96 días, un aumento de un 10 % con respecto a las ratas macho tratadas con PBS a $419,1 \pm 10,7$ g. Las hembras tratadas con RK35 alcanzaron un máximo de $289,7 \pm 9,3$ g, un aumento de un 15 % con respecto a las hembras tratadas con PBS a $252,8 \pm 6,0$ g. Las ratas SODG93A tratadas con cualquiera de PBS o RK35 comenzaron a mostrar una pérdida significativa de peso después de ~112 días debido a la progresión de la enfermedad; el tratamiento con RK35 no retrasaba el comienzo de la pérdida de peso.

Aunque el tratamiento con RK35 condujo a aumentos significativos del peso corporal, los inventores no observaron efectos del tratamiento con RK35 en la supervivencia. El tiempo hasta el estadio terminal, tal como se mide usando el punto final definido de insuficiencia a la derecha a los 30 segundos, era de 132 ± 8 días para ratones SODG93A tratados con RK35 ($n = 16$), mientras que los ratones SODG93A tratados con PBS alcanzaron el estadio terminal hacia los 134 ± 7 días ($n = 17$). Las ratas SODG93A tratadas con RK35 alcanzaron el estadio terminal hacia los 125 ± 8 días en comparación con los 128 ± 6 días para las ratas SODG93A tratadas con PBS. Ninguna de estas diferencias era estadísticamente significativa, lo que indica que la inhibición de la miostatina no retrasa el tiempo para llegar a la enfermedad en el estadio terminal en cualquiera de los modelos de ratón o rata de ELA.

Ejemplo 3.2.2: Efectos de la Inhibición de la Miostatina en Masa Muscular y Resistencia

Con el fin de determinar si la inhibición de la miostatina ralentizaba el debilitamiento muscular, se sacrificaron ratones SODG93A transgénicos y de tipo silvestre de cada grupo a los 88 días después del nacimiento, un punto temporal cercano al aumento máximo del peso corporal inducido por el tratamiento con RK35. En este punto temporal, no ratones SODG93A tratados con PBS mostraban disminuciones significativas de la masa muscular en el gastrocnemio, tibial craneal, y que cuádriceps con respecto a los ratones de control de tipo silvestre coherentes con la enfermedad en el estadio inicial (**FIG. 2C**). Por el contrario, los ratones SODG93A tratados con RK35 presentaban aumentos estadísticamente significativos en la masa muscular en todos los músculos examinados en comparación con ratones SODG93A tratados con PBS emparejados por edades en el punto temporal a los 88 días que variaba de ~19 % a un 32% (músculo gastrocnemio, +26 %; tibial craneal, +19 %; cuádriceps, +32 %). Aunque no se observó pérdida explicativa de masa muscular en los días tras más de ratones SODG93A tratados con PBS durante la enfermedad en estadio inicial; el tratamiento con RK35 también indujo un aumento significativo de la masa en este músculo (+21 %).

Los ratones restantes en cada población base se controlaron hasta el estadio terminal tal como se define con el ensayo de reflejo derecho. En el estadio terminal, se observó debilitamiento muscular en las extremidades en ratones SODG93A tratados tanto con RK35 como con PBS (**FIG. 2E**). Por el contrario a las observaciones en el tejido de ratones de 88 días, los ratones SODG93A tratados con PBS con la enfermedad en el estadio terminal mostraban una reducción significativa de la masa muscular del diafragma con respecto a los animales de tipo silvestre (**FIG. 2E**). Sin embargo, el aumento de la masa del diafragma inducido por RK35 observado en ratones SODG93A tratados permaneció significativo en el estadio terminal, lo que indica que la inhibición de la miostatina ralentizó la atrofia del diafragma en el ratón SODG93A.

Los efectos del anticuerpo anti-miostatina en la masa muscular también se investigaron en ratas SODG93A. del mismo modo a las observaciones realizadas en ratones, ratas SODG93A tratadas con RK35 de ~95 días de edad presentaban un aumento significativo de la masa con respecto a ratas SODG93A tratadas con PBS en los músculos gastrocnemio (+17 %), tibial craneal (+30 %), cuádriceps (+30 %) y diafragma (+17 %) (**FIG. 2D**). Hacia el estadio terminal de la enfermedad, la atrofia muscular en las extremidades era evidente en ratas SODG93A tratadas tanto con PBS como con RK35 (**FIG. 2F**). Una tendencia hacia el aumento de la masa muscular de las extremidades como resultado del tratamiento con RK35 en las ratas SODG93A persistió en el estadio terminal, pero estos efectos no alcanzaron significancia. Sin embargo, un aumento importante y significativo de un 35 % en la masa del diafragma de ratas SODG93A tratadas con RK35 con respecto a controles tratados con PBS (~35 %) aún era evidente en el estadio terminal de la enfermedad (**FIG. 2F**), de acuerdo con las observaciones observadas con los ratones SODG93A (**FIG. 2E**).

Con el fin de someter a ensayo los efectos de la inhibición de la miostatina en la función muscular, se realizaron ensayos cuantitativos de resistencia al agarre en ratones tratados con RK35 y con PBS. Los ratones SODG93A tanto tratados con RK35 como tratados con PBS presentaban aumentos en el desarrollo de la resistencia al agarre de las extremidades posteriores entre 28 y 56 días después del nacimiento. Hacia los 56 días después del nacimiento, los ratones SODG93A tratados con PBS se hicieron significativamente más débiles que los ratones de control emparejados por edad (**FIG. 3A**) ($p < 0,0001$). Aunque las disminuciones en la resistencia al agarre también eran evidentes en los ratones SODG93A tratados con RK35 hacia los 63 días después del nacimiento, los ratones tratados con RK35 permanecían significativamente más fuertes (o presentan una tendencia hacia ser más fuertes) que los ratones SODG93A tratados con PBS de 49 a 88 días después del nacimiento ($p < 0,05$). El análisis de la resistencia al agarre de las extremidades delanteras presentaba un patrón similar (**FIG. 3B**). La resistencia máxima de las extremidades delanteras en ratones SODG93A tratados tanto con PBS como con RK35 se observó hacia ~49 y 56 días después del nacimiento, respectivamente. Los ratones SODG93A tratados con PBS se hicieron significativamente más débiles que los animales de tipo silvestre hacia los 56 días después del nacimiento ($p < 0,05$) y continuaron en declive a partir de ese momento. Los ratones SODG93A tratados con RK35 se hicieron más fuertes que todos ratones SODG93A tratados con PBS a partir de los 56 a 88 días de edad (56 d; $p = 0,08$; 63 d: $p = 0,06$; 70-88 d; $p < 0,001$). Estos datos indican que la inhibición de la miostatina disminuye la pérdida de la función muscular a través del estadio inicial de la enfermedad en los ratones SODG93A. Sin embargo, después de ~100 días, las disminuciones de la resistencia al agarre eran similares en ratones SODG93A tanto tratados como sin tratar.

Para determinar si el tratamiento con RK35 inducía cambios similares en las ratas SODG93A, también se analizó la resistencia al agarre de las extremidades delanteras en ratas SODG93A tratadas tanto con RK35 como con PBS y

compañeros de camada de tipo silvestre emparejados por edad durante el estadio inicial de la enfermedad (**FIG. 3C**). Las ratas SODG93A tratadas tanto con PBS eran significativamente más débiles que los controles de tipo silvestre, lo que confirma que las ratas SODG93A también presentan una fase inicial de la enfermedad que precede a déficits motores manifiestos y pérdida de peso de una forma similar a la de los ratones. Las medidas de resistencia al agarre de ratas SODG93A tratadas con RK35 por lo general eran menores que las de las ratas de tipo silvestre tratadas con PBS, aunque los grupos no eran significativamente diferentes. La inhibición de la miostatina en ratas SODG93A mejoró de forma significativa la resistencia a la agarre cuando se comparaba con ratas SODG93A tratadas con PBS en este intervalo de edades.

Ejemplo 3.2.3: La inhibición de la miostatina disminuyó la degeneración de los músculos de las extremidades y diafragma en ratones y ratas SODG93A.

También se examinaron los efectos del tratamiento con RK35 en la morfología del músculo. Se examinó el diafragma y el músculo gastrocnemio medio de ratones SODG93A de 88 días (enfermedad en el estadio inicial) y ~134 días (enfermedad en el estadio terminal), comparando los efectos del tratamiento con RK35 con PBS, en paralelo con tejido de controles de tipo silvestre emparejados por edades. El grado de atrofia e hipertrofia en cada tejido se puntuó en un análisis ciego (0, ninguna; 1, ligera; 2, leve; 3, moderada; 4, notable; 5, severa) tal como se muestra en la Tabla 4. Los ratones SODG93A tratados con PBS mostraban una atrofia significativa del gastrocnemio en el estadio inicial de la enfermedad (puntuación media de 2,0; y **FIG. 4B**). El encogimiento observado de las fibras musculares, núcleos colocados centralmente y núcleos condensados con cromatina eran coherentes con el músculo que experimenta la denervación activa; caminaría evidencia de inflamación en comparación con ratones de tipo silvestre (**FIG. 4A y B**). Por el contrario, el gastrocnemio de ratones SODG93A tratados con RK35 en el estadio inicial (**FIG. 4C**) presentaban poca o ninguna atrofia (Tabla 4; puntuación media de 0,3). Estos resultados apoyan los datos de masa muscular que indican que la atrofia del músculo esquelético de las extremidades en la fase inicial de la enfermedad (88 días después del nacimiento) en los ratones SODG93A se ve reducida de forma significativa mediante la inhibición de miostatina.

El examen del gastrocnemio de ratones SODG93A en el estadio terminal confirmó atrofia muscular moderada en grupos tratados tanto con PBS (Tabla 4; puntuación media de 3,0) como con RK35 (Tabla 4; puntuación media de 3,3) (**FIG. 4E y F**) sin signos de degeneración en músculo de tipo silvestre (**FIG. 4D**). Estos resultados son coherentes con los datos de masa muscular, lo que indica que los efectos protectores de la inhibición de la miostatina en el comienzo de la enfermedad no persisten a través del estadio terminal de la enfermedad en ratones SODG93A.

El diafragma de los ratones SODG93A tratados con PBS o tratados con RK35 presentaba de poca a ninguna atrofia (Tabla 4; puntuaciones medias de 0,6) en comparación con los ratones de tipo silvestre a los 88 días. Hacia el estadio terminal, sin embargo, se observó una atrofia de leve a moderada en el diafragma de los ratones SODG93A tratados con PBS (**FIG. 4H**; Tabla 4; puntuación media de 2,3). Por el contrario, el diafragma de los ratones SODG93A tratados con RK35 analizado en el estadio terminal de la enfermedad no presentaba signos significativos de atrofia en comparación con los animales SODG93A tratados con PBS (Tabla 4; comparar las **FIGs. 4H y 4I**), similar al diafragma de los ratones de tipo silvestre emparejados por edades (**FIG. 4G**). Tomados en conjunto, evaluación de la masa muscular e histológica indica que la inhibición de la miostatina por RK35 conserva la integridad del diafragma pero no la del músculo esquelético de las extremidades a través del estadio terminal de la enfermedad.

Tabla 4: Resumen de patología muscular observada en ratones SODG93A tratados con PBS o RK35, en comparación con ratones de control de tipo silvestre emparejados por edad

genotipo	G93A	G93A	TS	G93A	G93A	TS
RK35:	-	+	-	-	+	-
Edad:	88 d	88 d	88 d	134 d	134 d	134 d
Nº de ratones:	3	3	3	3	3	3
gastrocnemio						
hipertrofia	0	0	0	0	0	0
atrofia	2	0,3	0	3,0	3,3	0
diafragma						
hipertrofia	0	0,6	0	0	1,7	0
atrofia	0,6	0,6	0	2,3	0	0

Puntuación: 0, ninguna; 1, ligera; 2, leve; 3, moderada; 4, notable; 5, severa

El análisis del tamaño de la fibra muscular en el músculo gastrocnemio y diafragma presentaba un patrón similar. Las distribuciones de frecuencias de medidas del diámetro de la fibra del músculo gastrocnemio a los 88 días presentaba un desplazamiento hacia fibras más pequeñas en ratones SODG93A (**FIG. 5A**) en comparación con ratones de control de tipo silvestre (**FIG. 5C**). La distribución de los diámetros de las fibras de los ratones SODG93A tratados con RK35 (**FIG. 5B**) es intermedia entre ratones SODG93A sin tratar y ratones de tipo silvestre durante el estadio inicial de la enfermedad. Hacia el estadio terminal, sin embargo, el diámetro medio de la fibra en el músculo gastrocnemio de los ratones SODG93A tratados con RK35 no difería significativamente de la de los ratones SODG93A tratados con PBS (no se muestran los datos). Los diámetros medios de las fibras en el músculo gastrocnemio de ratones SODG93A tratados tanto con RK35 como con PBS eran significativamente diferentes que los de tipo silvestre en el estadio terminal, coherente con la atrofia muscular notable observada por histología. Las diferencias significativas en el tamaño de la fibra entre ratones SODG93A de tipo silvestre y tratados con PBS eran también evidentes en el estadio terminal en el músculo del diafragma. El tamaño de las fibras del músculo del diafragma de los ratones SODG93A tratados con RK35 presenta un desplazamiento significativo en el diámetro medio de la fibra, lo que conduce a una distribución del tamaño intermedia entre los ratones SODG93A de tipo silvestre y los tratados con PBS (**FIG. 5D**).

Los efectos de la expresión de SODG93A en la actividad eléctrica del músculo del diafragma (**FIGs. 4J y 4K**) se examinaron a continuación usando el modelo de rata en un momento correspondiente al inicio clínico (~112 días; Howland y col. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99: 1604-09). La EMG mostrada para el grupo de ratas SODG93A tratadas con PBS presenta una actividad máxima escasa así como una cierta presencia de actividad espontánea anómala (**FIG. 4J**). La actividad máxima de las ratas SODG93A tratadas con RK35 era similar a la observada para las ratas de tipo silvestre, sin evidencia de actividad espontánea anómala. Tal como se muestra en la **FIG. 4K**, del músculo del diafragma de ratas SODG93A transgénicas presentaba una disminución estadísticamente significativa en las tasas de estallido máximo por EMG indicativo de función alterada. Por el contrario, las ratas SODG93A tratadas con RK35 presentaban una tasa de estallido máximo que era significativamente más elevada que la de las ratas SODG93A tratadas con PBS, y que no era significativamente diferente de la de los controles de tipo silvestre emparejados por edad. Por lo tanto, la inhibición de la miostatina por RK35 era eficaz en la conservación tanto de la estructura del diafragma como la función del diafragma.

Ejemplo 3.2.4: La inhibición de la miostatina disminuye la pérdida de neuronas motoras en el asta ventral

Para determinar si RK35 disminuía la pérdida de neuronas motoras grandes en la médula espinal, se hizo recuento de neuronas motoras grandes en L3-5 lumbar de la médula espinal de ratones SODG93A tratados con RK35 o PBS y ratones de tipo silvestre tratados con PBS. Los recuentos se realizaron en la médula espinal a las 12 semanas (84-90 días de edad; media de 88 días), un tiempo en el que el tratamiento con RK35 dio como resultado aumento de la masa muscular, aumento del peso corporal, aumento de la resistencia al agarre y atenuación de la y su patología muscular en ratones SODG93A. En este punto temporal, existe una pérdida significativa (25-40 %) de neuronas motoras grandes en el ratón SODG93A (Guo y col. (2003) Hum. Mol. Genet. 12: 2519-32; Sharp (2005) Neuroscience 130: 897-910; Schutz y col. (2005) J. Neurosci. 25: 7805-12).

Los recuentos de las neuronas motoras lumbares grandes (**FIGs. 6A-D**) en ratones SODG93A tratados con PBS (**FIG. 6F**) disminuyeron de forma significativa en comparación con los controles de tipo silvestre de la camada (**FIG. 6E**). El tratamiento con RK35 redujo la pérdida de neuronas motoras en el estadio inicial de la enfermedad (**FIG. 6G**) hasta un nivel intermedio entre ratones SODG93A tratados con PBS y ratones de tipo silvestre.

Hacia el estadio terminal de la enfermedad, las pérdidas significativas de neuronas motoras grandes en el asta ventral lumbar así como aumento de gliosis eran evidentes en los ratones SODG93A independientemente del tratamiento (**FIGs. 6I y J**) sin cambios correspondientes observados en los ratones de tipo silvestre (**FIG. 6H**).

El recuento estereológico de la población total de neuronas motoras grandes (área superior a $300 \mu\text{m}^2$) reveló una tendencia de una pérdida de un 25 % de neuronas motoras en ratones SODG93A tratados con PBS en comparación con controles de tipo silvestre. Se observó una tendencia hacia una disminución de la pérdida de neuronas motoras en ratones tratados con RK35 ($p = 0,08$) (**FIG. 6A**). Si los recuentos se limitaban a neuronas motoras grandes con nucleolos visibles para evitar el recuento de neuronas motoras que mostraban signos de degeneración (es decir, presencia de membrana irregular y vacuolas), existe una disminución de un 40 % en el número medio de neuronas motoras grandes por sección en ratones SODG93A tratados con PBS en comparación con los ratones de control de tipo silvestre (**FIG. 6B**), así como una diferencia estadística significativa entre ratones SODG93A tratados con RK35 y tratados con PBS (**FIG. 6B**). Tomados en conjunto, sin embargo, los datos compuestos mostrados en las **FIGs. 6A y B** indican que tanto la pérdida de neuronas motoras grandes como los efectos del tratamiento con RK35 en esta pérdida son relativamente sutiles en el intervalo de edad de 12 semanas (88 días).

Hacia el estadio terminal, los recuentos de neuronas motoras en ratones SODG93A tratados tanto con RK35 como con PBS eran significativamente diferentes de los de los ratones de control de tipo silvestre con ambos

procedimientos de análisis (**FIGs. 6C y D**). Estos datos son coherentes con los datos de la estructura y función del músculo esquelético presentados anteriormente que las mejoras mediadas por RK35 observadas durante el estadio inicial de la enfermedad no se mantienen en el estadio terminal.

Ejemplo 4

5 Análisis

ELA es una enfermedad mortal y progresiva en la que las neuronas motoras de la médula espinal y el tronco cerebral se degeneran con posterior atrofia muscular. Se ha enfocado una atención considerable hacia los mecanismos implicados en la muerte celular de las neuronas motoras. Varios estudios recientes han sugerido que pueden estar implicados múltiples tipos celulares en la etiología de la enfermedad mediante el control de la producción de factores fundamentales en el microentorno extracelular de la unión neuromuscular (Bruijn y col. (2004) Annu. Rev. Neurosci. 27: 723-49). Estudios que usan ratones quiméricos han mostrado que la presencia de células no neuronales de tipo silvestre puede prolongar la supervivencia de las neuronas motoras que expresan SOD1 mutante (Clement y col. (2003) Science 302: 113-17). Estas observaciones han conducido a la investigación de terapias que podrían disminuir la degeneración neuronal proporcionando un microentorno óptimo para la supervivencia. Por ejemplo, la administración en el músculo de factores de crecimiento expresados de forma viral que incluyen IGF-1, GDNF y VEGF han mostrado todos que prolonga la supervivencia en el modelo de ratón SODG93A (Kaspar y col. (2003) Science 301: 839-42; Azzouz y col. (2004) Nature 429: 413-17; Wang y col (2002) J. Neurosci. 22: 6920-28). Además, se ha mostrado que la expresión específica del músculo de IGF-1 estabiliza las uniones neuromusculares, aumenta la supervivencia de las neuronas motoras, y retrasa el inicio y la progresión de la enfermedad en el modelo de ratón transgénico SODG93A, lo que indica que los efectos directos en el músculo pueden tener impacto en el inicio y la progresión de la enfermedad (Dobrowolny y col. (2005) J. Cell. Biol. 168: 193-99). También ser informado de cambios en el metabolismo muscular y vulnerabilidad de las neuronas motoras en ratones con ELA, lo que apoya adicionalmente la hipótesis de que el músculo puede ser un conductor activo de la patología de la enfermedad (Dupois y col. (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101: 11159-64).

La miostatina, o GDF-8, es un inhibidor endógeno del crecimiento muscular, que obtiene su función biológica, al menos en parte, mediante la activación del receptor de Activina IIb (ActRIIb), dando como resultado la represión de la proliferación y diferenciación celular de mioblastos (Langley y col. (2002) J. Biol. Chem. 277: 49831-40; Thomas y col. (2000) J. Biol. Chem. 275: 40235-43). Se ha mostrado que la inhibición de la función de GDF-8 usando anticuerpos neutralizantes anti-GDF-8 aumenta la masa muscular y la resistencia en ratones adultos sanos así como que proporciona mejora funcional en el modelo de distrofia muscular de ratón mdx (Whittemore y col. (2003) Biochem. Biophys. Res. Commun. 300: 965-71; Bogdanovich y col. (2002) Nature 420: 418-21). Para comprender mejor el papel del músculo en la progresión de la enfermedad de las neuronas motoras, se usó un nuevo anticuerpo neutralizante para GDF-8, RK35, que se une con afinidad más elevada que un reactivo descrito anteriormente (CI₅₀ 3 nM para RK35 frente a >100 nM para JA16; Whittemore y col. (2003) Biochem. Biophys. Res. Commun. 300: 965-71; Bogdanovich y col. (2002) Nature 420: 418-21), dando como resultado aumentos mayores de la masa muscular en ratones de tipo silvestre tratados con RK35 (los datos no se muestran).

En los modelos de ratón y rata SODG93A de ELA familiar, el tratamiento con RK35 dio como resultado aumento del peso corporal y aumento de la masa y la resistencia muscular durante las fases iniciales de la enfermedad de neuronas motoras. Esta fase inicial de la enfermedad se define como la edad (56-88 días después del nacimiento) a la que los ratones SODG93A presentan una pérdida significativa de resistencia muscular, tal como se mide por evaluación de la resistencia al agarre (Ligon y col. (2005) Neuroreport 16: 533-36) y anomalías de la marcha (Wooley y col. (2005) Muscle Nerve 32: 43-50), y que coincide con la denervación de uniones neuromusculares (Frey y col. (2000) J. Neurosci. 20: 2534-42; Fischer y col (2004) Experimental Neurology 185: 232-40). Los aumentos de masa muscular resultantes de la inhibición de GDF-8 por RK35 eran más evidentes en los músculos del cuádriceps, pero también eran pronunciados en el gastrocnemio, tibial craneal y el diafragma en ambos modelos de roedor sometidos a ensayo. Estos aumentos se correlacionaban bien con el aumento de la resistencia, a medida que la resistencia de las extremidades posteriores y las extremidades delanteras disminuía más lentamente en ratones tratados con RK35 en comparación con los controles. El alcance del aumento de la masa muscular inducido por el tratamiento con anticuerpo anti-GDF-8 RK35 era similar en magnitud a un aumento de un 25 % de la masa muscular observado en ratones heterocigotos para alteración del gen GDF-8; la masa muscular de los ratones que son homocigotos nulos para GDF-8 es de aproximadamente dos veces la de los ratones de tipo silvestre (McPherron (1997) Nature 387: 83-90).

A aproximadamente 84-88 días después del nacimiento en ratones SODG93A, y aproximadamente 110 días para ratas SODG93A, se hicieron evidentes signos manifiestos de la enfermedad incluyendo disminuciones del peso corporal, anomalías de la marcha y parálisis. El tratamiento con RK35 no prolongo la supervivencia en cualquiera de los ratones o ratas SODG93A. El aumento de la masa muscular y la resistencia inducido por el tratamiento anti-GDF-8 en la fase inicial de la enfermedad no retrasó la aparición de anomalías en la marcha y parálisis de las extremidades tanto en ratones como ratas SODG93A (los datos no se muestran), ni se produjo mantenimiento del aumento de la masa muscular en las extremidades.

60 Sin embargo, se observaron aumentos significativos en la masa del diafragma en los ratones y ratas SODG93A

tratados con RK35 en comparación con controles de SODG93A tratados con vehículo en la enfermedad en fases tanto de estadio inicial como terminal. El músculo del diafragma de los ratones SODG93A tratados con RK35 en el estadio terminal era comparable con el de los controles de tipo silvestre emparejados por edad en la evaluación tanto de masa como histológica. Las ratas SODG93A tratadas con RK35 también mantuvieron un aumento significativo de la masa del músculo del diafragma en el estadio terminal. Coherente con estos cambios morfológicos, el análisis electrofisiológico de los diafragmas de ratas SODG93A sin tratar indica que la expresión de SOD1 mutante da como resultado una inhibición significativa de la función muscular, y que el tratamiento con RK35 conservaba de forma eficaz la función muscular en el diafragma.

En este estudio se usó un punto final definido (insuficiencia del ensayo reflejo derecho, lo que indica parálisis equitativa de las extremidades), como los criterios para "estadio terminal" y eutanasia. Por lo tanto, no queda claro si el aumento de la masa muscular del diafragma, disminución de la atrofia, y mejoría de la función electrofisiológica inducidos por el tratamiento con RK35 habría dado como resultado una prolongación de la vida útil en roedores provistos con complementos nutricionales. Sin embargo, éstos hallazgos son potencialmente importantes dado el hecho de que la disfunción respiratoria es la causa principal de muerte en pacientes con ELA (Lechtzin y col. (2002) Amyotroph. Lateral Scler. Other Motor Neuron Disord. 3: 5-13). Los tratamientos tales como RK35 diseñados para aumentar la función del diafragma deben tener el potencial de retrasar la necesidad de respiración asistida de forma mecánica en pacientes con ELA.

La inhibición de GDF-8 con RK35 puede influir en la pérdida de neuronas motoras en la médula espinal lumbar en la fase inicial de la enfermedad, aunque muchos beneficios terapéuticos se perdieron aparentemente hacia el estadio terminal de la enfermedad. Estos datos indican que las terapias que actúan directamente en el músculo pueden tener un beneficio en las neuronas motoras inervan el músculo, posiblemente mediante la modulación del microentorno trófico, aunque este enfoque es evidentemente no suficiente para retrasar la enfermedad. Por lo tanto, estas observaciones son coherentes con los resultados de Dobrowolny y col. ((2005) J. Cell. Biol. 168: 193-99), en el que la expresión de una isoforma de IGF específica del músculo condujo a una disminución de la pérdida de neuronas motoras en el modelo de ratón SODG93A, y en el de Kaspar y col. ((2003) Science 301: 839-42), en el que la administración viral de IGF1 al músculo dio como resultado una reducción de la pérdida de neuronas motoras en el estadio inicial de la enfermedad. Similar a las observaciones de Kaspar y col. ((2003), mencionado anteriormente), los efectos beneficiosos del tratamiento en la supervivencia de las neuronas motoras no se mantuvieron a través del estadio terminal de la enfermedad. Por lo tanto, es probable que el aumento del apoyo del factor trófico del músculo sea insuficiente para prevenir la pérdida de neuronas motoras en el modelo de SODG93A.

En resumen, en modelos de ELA familiar tanto de ratón como de rata, la inhibición de la miostatina da como resultado aumento de la masa muscular y resistencia, que se mantiene a través de los estadios iniciales de la enfermedad pero se pierde hacia el estadio terminal. La inhibición de la miostatina disminuyó los cambios degenerativos en el músculo esquelético en el estadio inicial de la enfermedad, pero no ralentizó el inicio de la parálisis ni la prolongación de la supervivencia, tal como se define mediante insuficiencias refleja derecha, ni la inhibición de la miostatina disminuyó de forma significativa la pérdida de neuronas motoras. Sin embargo, ambas diferencias morfológicas y funcionales a través del estadio terminal de la enfermedad se observaron en el músculo del diafragma de animales tratados con anticuerpos anti-miostatina, en comparación con controles sin tratar. En general, los datos proporcionados en el presente documento apoyan el potencial de un efecto beneficioso en la construcción del músculo por tratamiento con RK35, que puede contribuir a una mejora inicial de la "calidad de vida del paciente" en el proceso de la enfermedad. Dado que los anticuerpos anti-GDF-8 están en la actualidad el desarrollo clínico, el uso de tales reactivos clínicos en ELA para el mantenimiento de la masa muscular de las extremidades y diafragma garantiza una investigación adicional como un componente para un enfoque de múltiples puntos para el tratamiento de ELA. La combinación de una terapia anti-GDF-8 con fármacos existentes tales como el riluzol, antagonista de glutamato, o agentes más nuevos que entran el desarrollo clínico, podría no solamente mejorar el nivel de eficacia mediante la ayuda del mantenimiento de la masa muscular sino también tener un impacto significativo en la calidad de vida general del paciente.

Ejemplo 5

Formación de Esquemas de Epítomos para RK35

Con el fin de formar esquemas de epítomo del anticuerpo exacto para GDF-8, 48 péptidos de 13 restos de solapamiento que representan toda la secuencia del GDF-8 maduro establecida en la SEC ID N°: 1 se sintetizaron directamente en papel de celulosa usando la técnica de síntesis de aplicación puntual (por ejemplo, Molina y col. (1996) Peptide Res. 9: 151-55; Frank y col. (1992) Tetrahedron 48: 9217-32). El solapamiento de los péptidos era de 11 aminoácidos. En esta matriz, los restos de cisteína se sustituyeron con serina con el fin de reducir las complicaciones químicas causadas por las cisteínas. Las membranas de celulosa modificadas con polietilenglicol y aminoácidos protegidos con Fmoc se adquirieron en Abimed (Lagenfeld, Alemania). La matriz se define en la membrana por acoplamiento de un espaciador de β -alanina, y se sintetizaron péptidos usando química de acoplamiento convencional de DIC (diisopropilcarbodiimida)/HOBt (hidroxibenzotriazol) tal como se ha descrito anteriormente (Molina y col., mencionado anteriormente; Frank y col., mencionado anteriormente).

Se aplicaron puntualmente aminoácidos activados usando un robot ASP 222 de Abimed. Las etapas de lavado y

desprotección se realizaron manualmente, y los péptidos se acetilaron de forma N-terminal después del ciclo de síntesis final. Después de la síntesis de péptidos, la membrana se lavó en metanol durante 10 minutos y en bloqueador (TBST (solución salina tamponada con Tris con Tween™ 20 al 0,1 % (v/v)) y caseína al 1 % (p/v)) durante 10 minutos. A continuación, la membrana se incubó con 2,5 µg/ml de un anticuerpo anti-GDF-8 en bloqueador durante 1 h con agitación suave. Después de lavar en 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. A continuación, la membrana se lavó tres veces durante 10 min cada una con bloqueados y 2 veces durante 10 minutos cada una con TBST. El anticuerpo unido se visualizó usando reactivo SuperSignal™ West (Pierce) y una cámara digital (Alphananotech Fluoromager). Tal como se muestra en la **FIG. 7**, el epítipo de RK35 forma esquema de una región de GDF-8 entre los aminoácidos 30-40 y 84-97, que supuestamente interactúa con el receptor de Tipo II de GDF-8 tal como se predice con la comparación de secuencia del receptor GDF-8 con receptores de la familia de TGF-β homólogos con dominios caracterizados.

Ejemplo 6

Caracterización del Anticuerpo RK35

Los genes de cadena pesada variable (VH) y ligera variable (VL) que codifican RK35 se clonaron a partir de células de hibridoma que producen el anticuerpo, y se determinaron las secuencias de aminoácidos. Se usaron datos de secuencias para el anticuerpo RK35 para identificar la secuencia de la línea germinal más próxima para la cadena pesada y ligera. Una comparación de las regiones variables ligera y pesada de RK35 con las secuencias de la línea germinal humana más próximas se muestra en la **FIG. 8**. Se pueden hacer mutaciones apropiadas usando técnicas convencionales de mutagénesis dirigida al sitio con los cebadores mutagénicos apropiados. La mutación del anticuerpo se confirma a continuación por análisis de secuencias. Las secuencias de aminoácidos a modo de ejemplo para RK35 humanizado se establecen en las SEC ID N^{os}: 7 (VH) y 9 (VL), ambas de las cuales se pueden codificar con una secuencia de ácidos nucleicos determinada fácilmente por un experto en la materia, por ejemplo, las secuencias de ácidos nucleicos que se establecen como SEC ID N^o: 6 (VH) y 8 (VL). Un experto en la materia reconocerá que cualquiera y/o todos los aminoácidos en el marco conservador del anticuerpo humanizado se pueden retromutar al aminoácido murino original, por ejemplo, para mantener la conformación del fragmento de unión a antígeno. Los ejemplos no limitantes de la SEC ID N^o: 7 (VH) y la SEC ID N^o: 9 (VL) con algunas retromutaciones que pueden ayudar a mantener la afinidad del anticuerpo para GDF-8 se establecen como la SEC ID N^o: 26 y la SEC ID N^o: 27, respectivamente.

Para crear anticuerpos quiméricos, la secuencia de VH se subclona en un vector de expresión pED6 hulG1 mut, que codifica la IgG1 humana que contiene dos mutaciones puntuales (L234A y G237A) para reducir la unión a receptores de Fc humano y componentes de complemento (Morgan y col. (1995) *Immunology* 86: 319-24; Shields y col (2001) *J. Biol. Chem.* 276: 6591-604). La secuencia de VL de RK35 se puede subclonar en el vector de expresión pED6 Kappa. Los vectores de expresión que contienen las secuencias de VH y VL de RK35 se cotransfectan a continuación en células COS-1 y un anticuerpo RK35 quimérico se purifica a partir de medio acondicionado.

Ejemplo 7

Tratamiento de Trastornos Musculares

Los inhibidores de GDF-8, es decir, antagonistas de GDF-8, tales como, por ejemplo, anticuerpos inhibidores, son útiles para el tratamiento de trastornos metabólicos asociados con GDF-8 tales como diabetes de tipo 2, tolerancia alterada a la glucosa, síndrome metabólico (por ejemplo, síndrome X), resistencia a la insulina (por ejemplo, inducida por traumatismos tales como quemaduras o desequilibrio de nitrógeno), y trastornos del tejido adiposo (por ejemplo, obesidad). Los inhibidores de GDF-8 también son útiles para el tratamiento de trastornos óseos y musculares asociados con GDF-8, tales como ELA, distrofia muscular y osteoartritis. Los anticuerpos anti-GDF-8 y los fragmentos de anticuerpos de la invención se pueden usar para tratar un sujeto, por ejemplo, un sujeto humano, preferentemente un sujeto que padece ELA, al inicio de la enfermedad, o un sujeto que tiene una enfermedad metabólica u ósea/muscular establecida. Los anticuerpos inhibidores contra GDF-8 también se prevén usar para prevenir y/o reducir la gravedad y/o los síntomas de la enfermedad. Se prevé que los anticuerpos anti-GDF-8 y fragmentos de anticuerpos se administren, por ejemplo, por vía subcutánea, con una frecuencia tal como de una vez al día y de forma tan infrecuente como de una vez al mes. Las relaciones del tratamiento varían de aproximadamente un mes (o menos) a varios años.

Para someter a ensayo la eficacia clínica de anti-GDF-8 en seres humanos, los sujetos que padecen lo que están en riesgo de ELA se identifican y se clasifican aleatoriamente en grupos de tratamiento. Los grupos de tratamiento incluyen un grupo de placebo y de uno a tres o más grupos que reciben anticuerpo (a diferentes dosis cuando hay dos o más grupos). Los individuos se siguen de forma potencial, por ejemplo, durante un mes a tres años para evaluar cambios en peso, masa muscular, y resistencia al agarre. Se prevé que los individuos que reciben tratamiento presentarán una mejora.

Un antagonista de GDF-8, preferentemente en forma de un anticuerpo o anticuerpos, se administra como el único compuesto activo o en combinación con otro compuesto o composición. Cuando se administra como el único

5 compuesto activo o en combinación con otro compuesto o composición, la dosificación es preferentemente de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg, dependiendo de la gravedad de los síntomas y/o la progresión de la enfermedad. La dosis eficaz apropiada se puede seleccionar mediante un médico que trata a partir del siguiente listado de intervalos no limitante: 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. Los regímenes de tratamiento no limitantes a modo de ejemplo y resultados potenciales se resumen en la Tabla 5.

Tabla 5: Ejemplos Casos Clínicos Potenciales

Estado antes del tratamiento	Régimen de Tratamiento	Resultado Potencial
Sin signos clínicos, historia familiar de ELA	0,01-1 mg/kg cada 4 semanas durante 48 semanas	Prevención de ELA o retraso del inicio
Signos clínicos leves de ELA	0,01-100 mg/kg semanalmente durante 4 o más semanas	Aumento de la resistencia al agarre, aumento de peso, y masa muscular
Estadio avanzado de ELA caracterizado por debilitamiento muscular severo, pérdida de peso, y pérdida de resistencia, etc.	0,01-100 mg/kg dos veces a la semana durante 6 o más semanas	Mejora de los signos clínicos, reducción de la gravedad de los síntomas y/o aumento de la masa muscular/relación de grasa corporal

10 La memoria descriptiva se entiende más a fondo a la vista de las enseñanzas de las referencias mencionadas dentro de la memoria descriptiva. Las realizaciones dentro de la memoria descriptiva proporcionan ilustraciones de la invención y no se deberían interpretar como limitantes del ámbito de la invención. El experto en la materia reconoce que se podrían incluir otras realizaciones por medio de la invención reivindicada, y que la memoria descriptiva y los ejemplos se deben considerar solamente a modo de ejemplo.

15 LISTADO DE SECUENCIAS

- 15 <110> Wyeth The Trustees of the University of Pennsylvania
- 20 <120> ANTICUERPOS ANTAGONISTAS CONTRA GDF-8 Y USOS EN EL TRATAMIENTO DE ELA Y OTROS TRASTORNOS ASOCIADOS CON GDF-8
- 20 <130> 01997.040600
- 25 <150> US 60/709.704
- 25 <151> 19-08-2005
- 30 <160> 31
- 30 <170> PatentIn versión 3.3
- 30 <210> 1
- 30 <211> 109
- 30 <212> PRT
- 30 <213> *Homo sapiens*
- 35 <400> 1

ES 2 534 760 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

5 <210> 2
 <211> 348
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*
 <400> 2

gaagtgcagc tggaggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatgccca tgtcttgggt tcgccagact 120
 ccggagaaga ggctggagtg ggctcgaacc attagtagtg gtggtagtta cacctcctat 180
 ccagacagtg tgaagggctg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac 240
 ctgcaaatga gcagtctgag gtctgaggac acggccatgt attactgtgc aagacaagac 300
 10 tatgctatga actactgggg tcaaggaacc tcagtcaccg tctcctca 348

15 <210> 3
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 3

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

5 <210> 4
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

<400> 4

5 gacattgaga tgaccagtc tcacaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc 60
 atcacctgca aggccagtca ggatgtgagt actgctgtag cctggtatca acagaaacca 120
 ggacaatctc ctaaactact gctttactcg gcatcctacc ggtacactgg agtccctgat 180
 cggttcactg gcagtgatc tgggacggat ttcactttca ccatcagcag tgtgcaggct 240
 gaagacctgg cagtttatta ctgtcagcaa cattatagta ctccgtggac gttcgggtga 300
 10 ggcaccaagc tggaaatcaa a 321

15 <210> 5
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 5

ES 2 534 760 T3

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

5 <210> 6
 <211> 348
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de ácido nucleico que codifica la región variable de cadena pesada de RK35 humanizada (retrotraducida de SEC ID N°: 7)

<400> 6

gaggccaac tattagaatc gggagggcgg	ctggttcagc caggagggag tctcaggctt	60
agttgcgctg cgtcgggatt caccttttca	agttacgcaa tgcacatgggt tcgtcaggca	120
ccggggaaag gcttagagtg ggtgtcaact	attagctctg gcggtagcta tacgtcgtat	180
cctgactctg tgaagggacg atttacaata	agccgggaca attctaaaaa cactttgtac	240
ctacagatga attccttgag agccgaagat	accgccgtct actattgtgc gaagcaagat	300
tacgctatga actattgggg tcaagggaca	atggtaacgg tatectcc	348

15 <210> 7
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Región variable de cadena pesada de RK35 humanizada

25 <400> 7

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

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

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

Ser Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Lys Gln Asp Tyr Ala Met Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

- <210> 8
- <211> 321
- <212> ADN
- <213> Artificial
- <220>
- <223> Secuencia de ácido nucleico que codifica la región variable de cadena ligera de RK35 humanizada (retrotraducida de SEC ID N°: 9)
- <400> 8

```

gacattcaaa tgacccaaag cccttcttcc ttaagcgcag cagtaggtga ccgagttaca      60
ataacgtgta aagcgagcca agatgtgagt actgcagtag cgtggtatca gcaaaagcca      120
gggaaggctc cgaaactatt gatttactcc gcctcttaca gatatacggg cgttcctgat      180
aggtttagtg gaagtgggtc ggttacggac tttaccctga ctatatcgtc acttcagcca      240
gaggattttg ctacctacta ttgccaacag cattattcaa caccgtggac attcggccag      300
ggaactaagg tcgaaataaa a                                     321
    
```

- <210> 9
- <211> 107
- <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- <223> Región variable de cadena ligera de RK35 humanizada
- <400> 9

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

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

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

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

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

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

5 <210> 10
<211> 5
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 10

Ser Tyr Ala Met Ser
1 5

10

15 <210> 11
<211> 17
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 11

Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

20 Gly

25 <210> 12
<211> 7
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 12

Gln Asp Tyr Ala Met Asn Tyr
1 5

30 <210> 13
<211> 11
<212> PRT

ES 2 534 760 T3

<213> *Mus musculus*

<400> 13

5 Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 14

<211> 7

<212> PRT

10 <213> *Mus musculus*

<400> 14

15 Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr
1 5

<210> 15

<211> 7

<212> PRT

20 <213> *Mus musculus*

<400> 15

25 Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro
1 5

<210> 16

<211> 321

<212> ADN

30 <213> *Homo sapiens*

<400> 16

cgaaccgtag	eggcaccgtc	agtattcata	ttccctccat	cggacgagca	attgaaaagt	60
gggacagctt	cggtcgtgtg	tctcttgaat	aacttttacc	ccagagaagc	taaggtccag	120
tggaaagtgtg	acaatgctt	acagagcggg	aattctcaag	aatccgttac	tgaacaggat	180
agtaaggatt	ctacgtattc	acttagcagt	actctgacct	tatcaaaggc	agattatgaa	240
aaacacaagg	tatacgctg	cgaggtgacg	catcaaggct	tatccagccc	agttacaaaa	300
tcttttaaca	ggggtgagtg	t				321

<210> 17

<211> 107

<212> PRT

35 <213> *Homo sapiens*

<400> 17

40

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

<210> 18
 <211> 990
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 18

5

gcctccacaa aaggaccatc tgtttttccc ttggcgccat caagtaaadc tacttccgga 60
 ggtaccgctg cgcttggtg cctcgtgaaa gactatttcc cagaacctgt cacagtctcg 120
 tggaatagtg gtgctttaac ctggggcgta catacttttc ctgctgtact tcaatcaagc 180
 ggactgtact cattatcgtc tgtagtcacg gtcccagatt cttcactcgg aacacagact 240
 tatatatgca acgtaataca taagcctagc aacaccaagg ttgacaaaaa ggtggaacca 300
 aaatcgtgcg ataagacgca cacatgtcca cctgtcctg caccagaagc tctgggcgcg 360
 ccacgggttt tcttgttccc acccaaacct aaggacacgt taatgataag tcgaacgcca 420
 gaggtgacat gtgtttagt ggatgtgagc cacgaagatc cggaagtaaa attcaattgg 480
 tatgtagatg gtgttgaagt ccataacgca aaaactaagc cgaggggaaga gcagtacaac 540
 tctacttata gggtagtctc cgtactaact gtcttgcacc aagattggct aaatgggaag 600
 gaatataaat gtaaggtttc aaataaggca ctaccagccc cgatagagaa gacaataagc 660
 aaagcgaagg ggcaaccaag agagcccaaa gtgtacacct tgccctccgag cagagaggaa 720
 atgacaaaaa atcaagtatc ccttacgtgt ctggtaaagg gattttatcc aagtacata 780
 gcagtggagt gggagagtaa cggccagcca gaaaacaatt acaaaaccac tccccgggtt 840
 ttagatagcg atgggagttt cttttgtac tcaaagttga ccggtgacaa gtcacgatgg 900
 cagcaaggta atgtatttag ttgttctggt atgcatgagg cttacataa tctactacag 960
 cagaaatctc tctccttaag ccccgggaaa 990

10

ES 2 534 760 T3

<210> 19
<211> 330
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 19

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Ala Leu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

ES 2 534 760 T3

<210> 20
<211> 10
<212> PRT
<213> *Mus musculus*
5
<400> 20

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser
1 5 10

<210> 21
<211> 10
<212> PRT
<213> *Mus musculus*
15
<400> 21

Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Ser
1 5 10

<210> 22
<211> 7
<212> PRT
<213> *Mus musculus*
20
<400> 22

Gln Asp Tyr Ala Met Asn Tyr
1 5

<210> 23
<211> 11
<212> PRT
<213> *Mus musculus*
25
<400> 23

Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 24
<211> 7
<212> PRT
<213> *Mus musculus*
30
<400> 24

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr
1 5

<210> 25
<211> 7
<212> PRT
<213> *Mus musculus*
35
<400> 25

Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro
1 5

<210> 26

ES 2 534 760 T3

<211> 116
 <212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Región variable de cadena pesada de RK35 humanizada con retromutaciones

<400> 26

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

10
 15 <210> 27
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Región variable de cadena ligera de RK35 humanizada con retromutaciones

20 <400> 27

ES 2 534 760 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 28
 <211> 405
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 28

atgaactttg tgctcagctt gattttccct gccctcattt taaaagggtg ccagtgtaa 60
 gtgcagctgg tggagtctgg gggaggctta gtgaagcctg gagggccctt gaaactctcc 120
 tgtgcagcct ctggattcac tttcagtagc tatgccatgt ctggggttcg ccagactccg 180
 gagaagaggc tggagtgggt cgcaaccatt agtagtggtg gtagttacac ctcctatcca 240
 gacagtgtga agggctgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg 300
 caaatgagca gtctgaggtc tgaggacacg gccatgtatt actgtgcaag acaagactat 360
 gctatgaact actgggggtca aggaacctca gtcaccgtct cctca 405

10

<210> 29
 <211> 135
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

15

<400> 29

ES 2 534 760 T3

Met Asn Phe Val Leu Ser Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Ser Tyr Pro
65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gln Asp Tyr Ala Met Asn Tyr Trp Gly Gln Gly
115 120 125

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 30
<211> 381
<212> ADN
<213> *Mus musculus*

5

<400> 30

atggagtcac agattcaggt ctttgtattc gtgtttctct ggttgtctgg tgttgacgga 60
gacattgaga tgaccagtc tcaaaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc 120
atcacctgca aggccagtc g gatgtgagt actgctgtag cctggtatca acagaaacca 180
ggacaatctc ctaaactact gctttactcg gcatectacc ggtacactgg agtcctgat 240
cggttcaactg gcagtgatc tgggacggat ttcactttca ccatcagcag tgtgcaggct 300
gaagacctgg cagtttatta ctgtcagcaa cattatagta ctccgtggac gttcgggtgga 360
ggcaccaagc tggaaatcaa a 381

10

<210> 31
<211> 127
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

15

<400> 31

ES 2 534 760 T3

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

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo humanizado que se une específicamente y antagoniza GDF-8, que comprende:

5 una región pesada variable (VH) de anticuerpo que comprende una primera, una segunda y una tercera región determinante de complementariedad (CDR), y una región ligera variable (VL) de anticuerpo que comprende una primera, una segunda y una tercera región determinante de complementariedad (CDR);
en el que:

dicho anticuerpo se une a GDF-8 con una Kd de 10^{-11} M o afinidad más elevada; y

en el que:

10 la primera CDR de una región de VH (H1) tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 10, la segunda CDR de una región de VH (H2) tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 11, la tercera CDR de una región de VH (H3) tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 12, la primera CDR de una región de VL (L1) tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 13, la segunda CDR de una región de VL (L2) tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 14, y la tercera CDR de una región de VL (L3) tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 15;

15 o en el que:

20 la primera CDR de una región de VH (H1) tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 20, la segunda CDR de una región de VH (H2) tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 21, la tercera CDR de una región de VH (H3) tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 22, la primera CDR de una región de VL (L1) tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 23, la segunda CDR de una región de VL (L2) tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 24, y la tercera CDR de una región de VL (L3) tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 25.

2. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 1, en el que dicha región de VH comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 7, y dicha región de VL comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 9.

25 3. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende adicionalmente una región constante de cadena pesada de un subtipo de inmunoglobulina seleccionado entre el grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE e IgM.

4. El anticuerpo humanizado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende adicionalmente una región constante de cadena pesada de IgG1 humana.

30 5. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 3 o la reivindicación 4, en el que la región constante es alterada para modificar las propiedades del anticuerpo.

6. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 5, en el que la región constante alterada está mutada.

7. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 5 o la reivindicación 6, en el que la región constante es alterada para aumentar o disminuir la unión al receptor de Fc.

35 8. El anticuerpo de la reivindicación 4, en el que la región constante comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 19.

9. El anticuerpo de la reivindicación 6, en el que la región constante de IgG1 humana comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 19 mutada en uno o más de los restos 117 y 120 de la misma.

10. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende adicionalmente una región constante de cadena ligera del anticuerpo seleccionada entre el grupo que consiste en kappa y lambda.

40 11. Un polinucleótido que codifica el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

12. El polinucleótido de la reivindicación 11, unido de forma operativa a una secuencia de control de la expresión.

13. Un vector que comprende el polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 11 y 12 como un antagonista de GDF-8.

45 14. Una célula huésped que comprende el vector de la reivindicación 13 o que comprende el polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 11 y 12 como un antagonista de GDF-8.

15. Un procedimiento de producción de un anticuerpo que se une de forma específica a GDF-8, que comprende la etapa de cultivar la célula huésped de la reivindicación 14 y recuperar el anticuerpo producido a partir de la misma.

16. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 producido mediante el procedimiento de la reivindicación 15.
17. Una composición que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y 16, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 5 18. La composición de la reivindicación 17 para su uso en el tratamiento de un trastorno de un sujeto mamífero, en el que el trastorno es seleccionado entre el grupo que consiste en: un trastorno muscular, un trastorno neuromuscular, un trastorno degenerativo óseo, un trastorno adiposo, un trastorno óseo metabólico, un trastorno óseo inducido, un trastorno del metabolismo de la glucosa, y un trastorno relacionado con la insulina.
- 10 19. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 18, en la que dicho trastorno es seleccionado adicionalmente entre el grupo de trastornos que consiste en: distrofia muscular, distrofia muscular de Duchenne, atrofia muscular, atrofia de órganos, debilidad, síndrome del túnel carpiano, enfermedad pulmonar obstructiva congestiva, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), sarcopenia, caquexia, síndrome de debilitamiento muscular, osteoporosis, fractura relacionada con osteoporosis, osteopenia, osteoartritis, masa ósea baja, tolerancia alterada a la glucosa, resistencia a la insulina, diabetes del tipo 2, obesidad y síndrome metabólico.
- 15 20. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 19, en la que dicho trastorno es distrofia muscular de Duchenne.
21. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 19, en la que dicho trastorno es ELA.
22. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 19, en la que dicho trastorno es caquexia o sarcopenia.
- 20 23. La composición de la reivindicación 17 para su uso en el tratamiento de un trastorno de debilitamiento muscular en un sujeto mamífero.
24. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 23, en la que el trastorno de debilitamiento muscular es un síndrome de debilitamiento muscular o debilitamiento muscular inducido por VIH.
- 25 25. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 24, en la que dicho sujeto mamífero es un ser humano.
26. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para su uso en un procedimiento de diagnóstico.

FIG. 1A

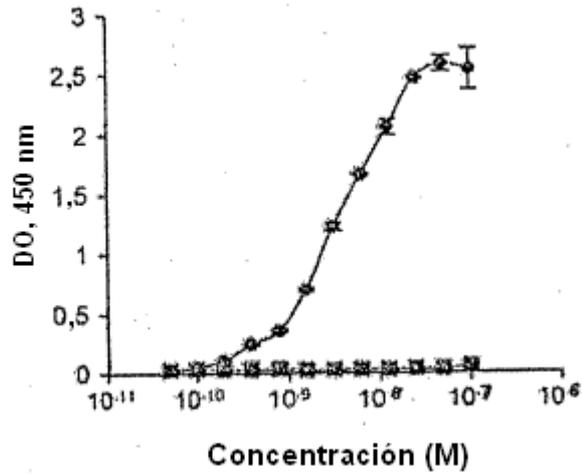


FIG. 1B

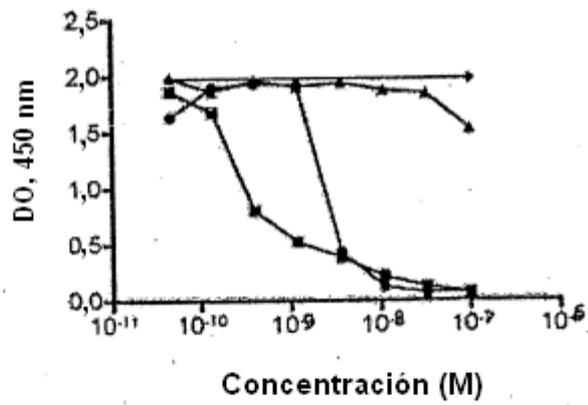
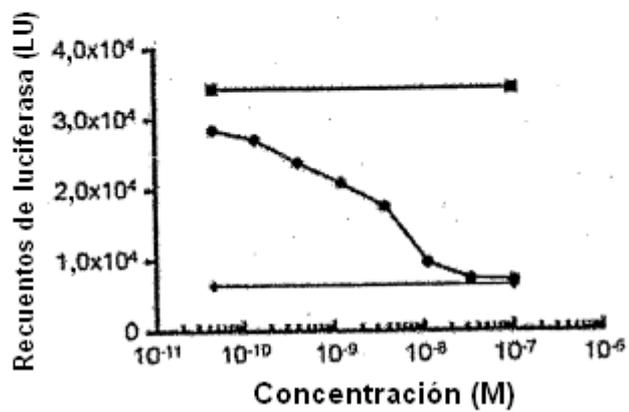


FIG. 1C



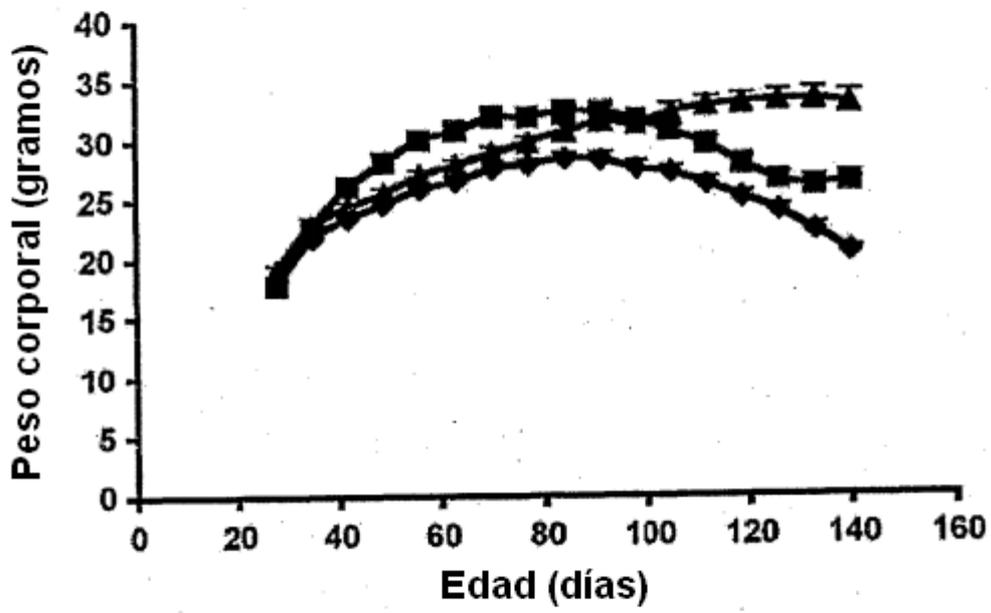


FIG. 2A

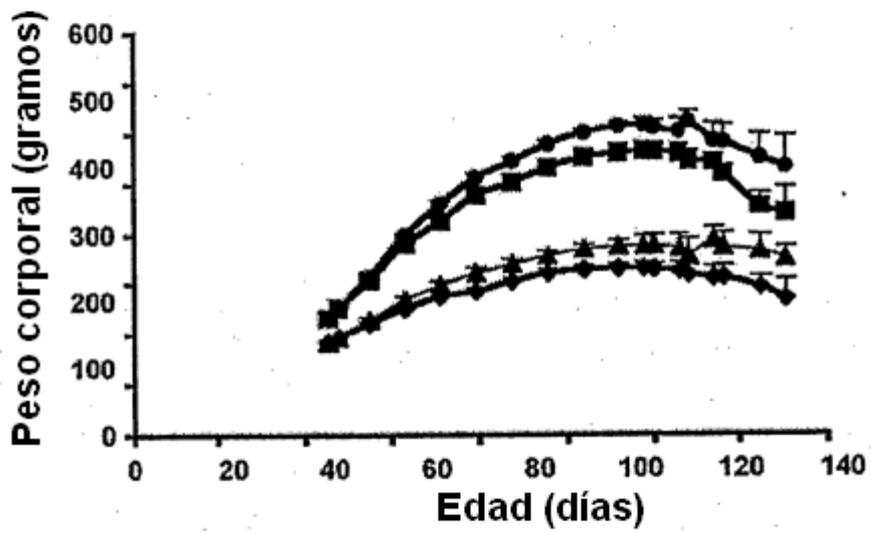


FIG. 2B

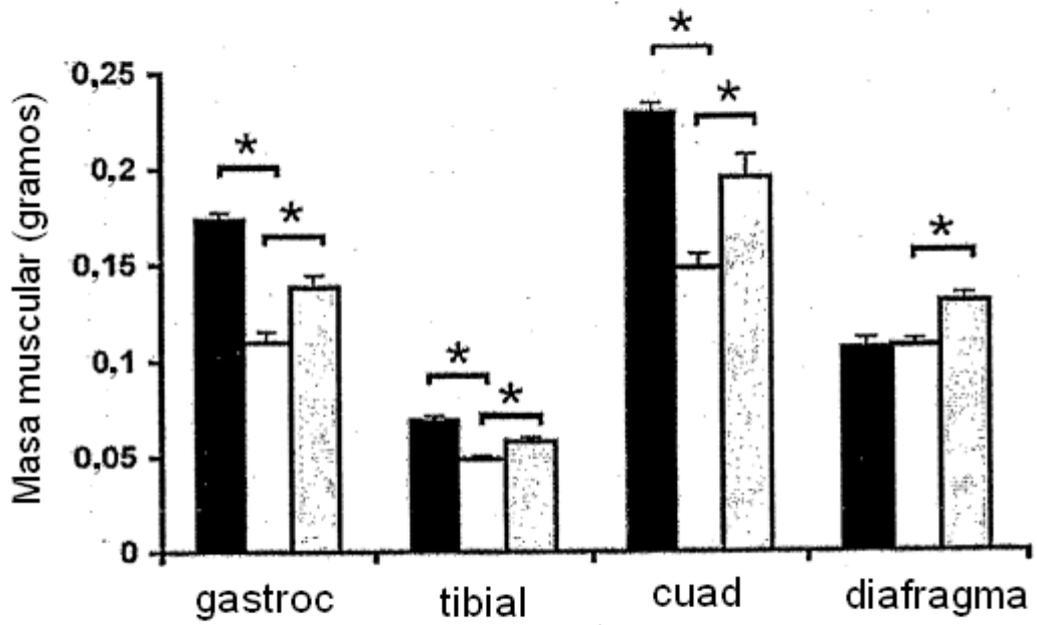


FIG. 2C

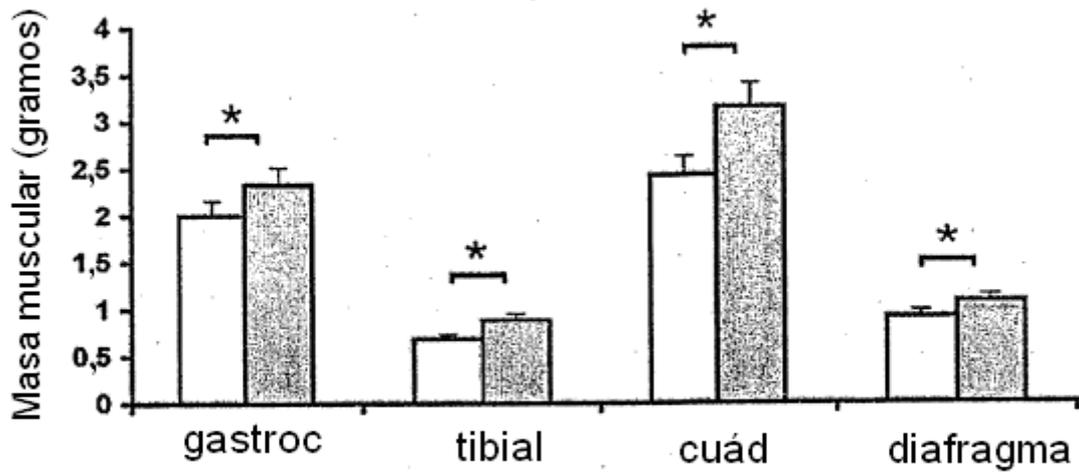


FIG. 2D

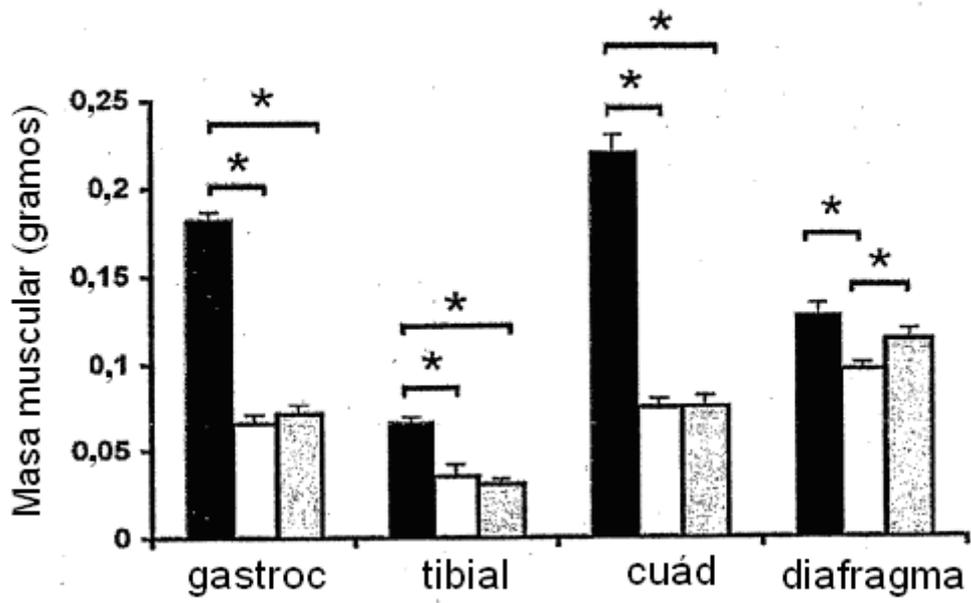


FIG. 2E

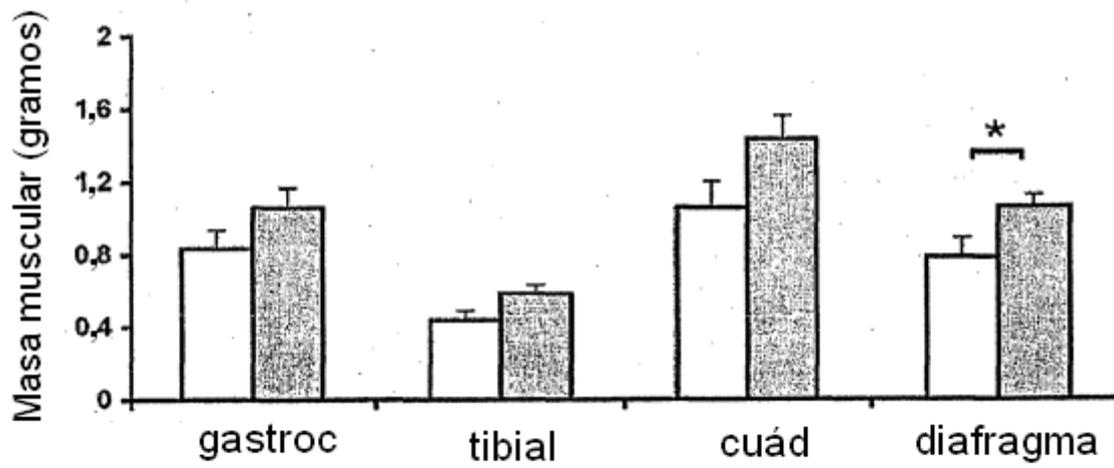


FIG. 2F

FIG. 3A

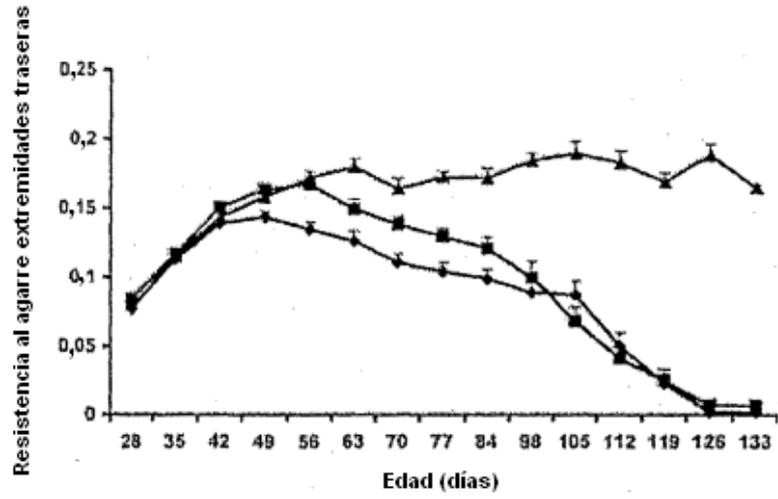


FIG. 3B

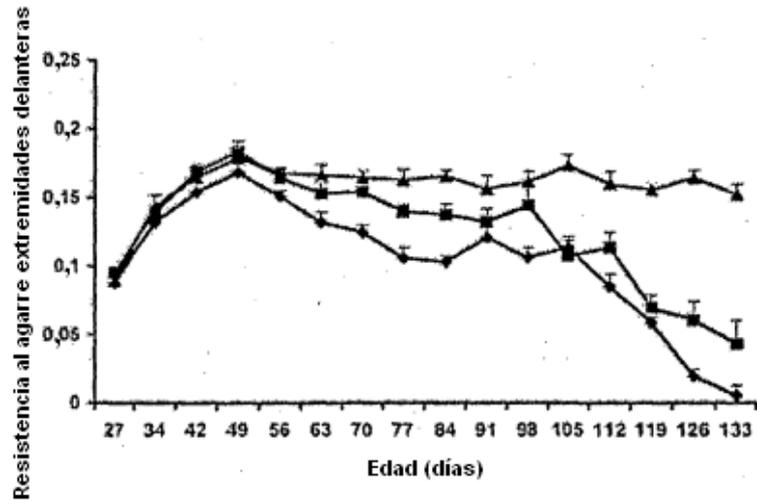
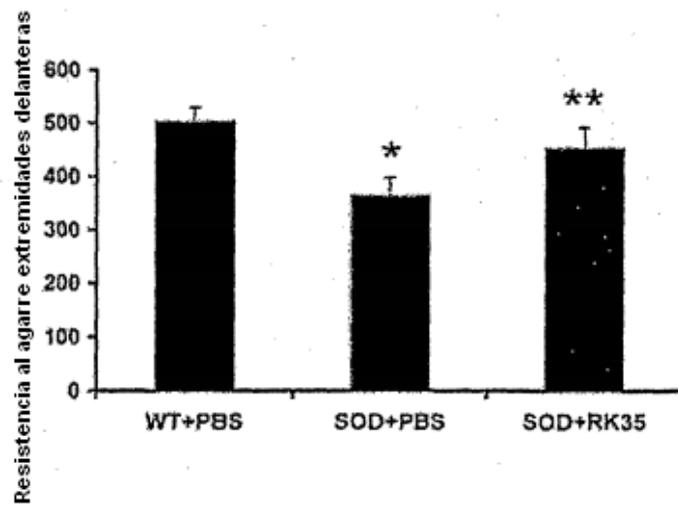


FIG. 3C



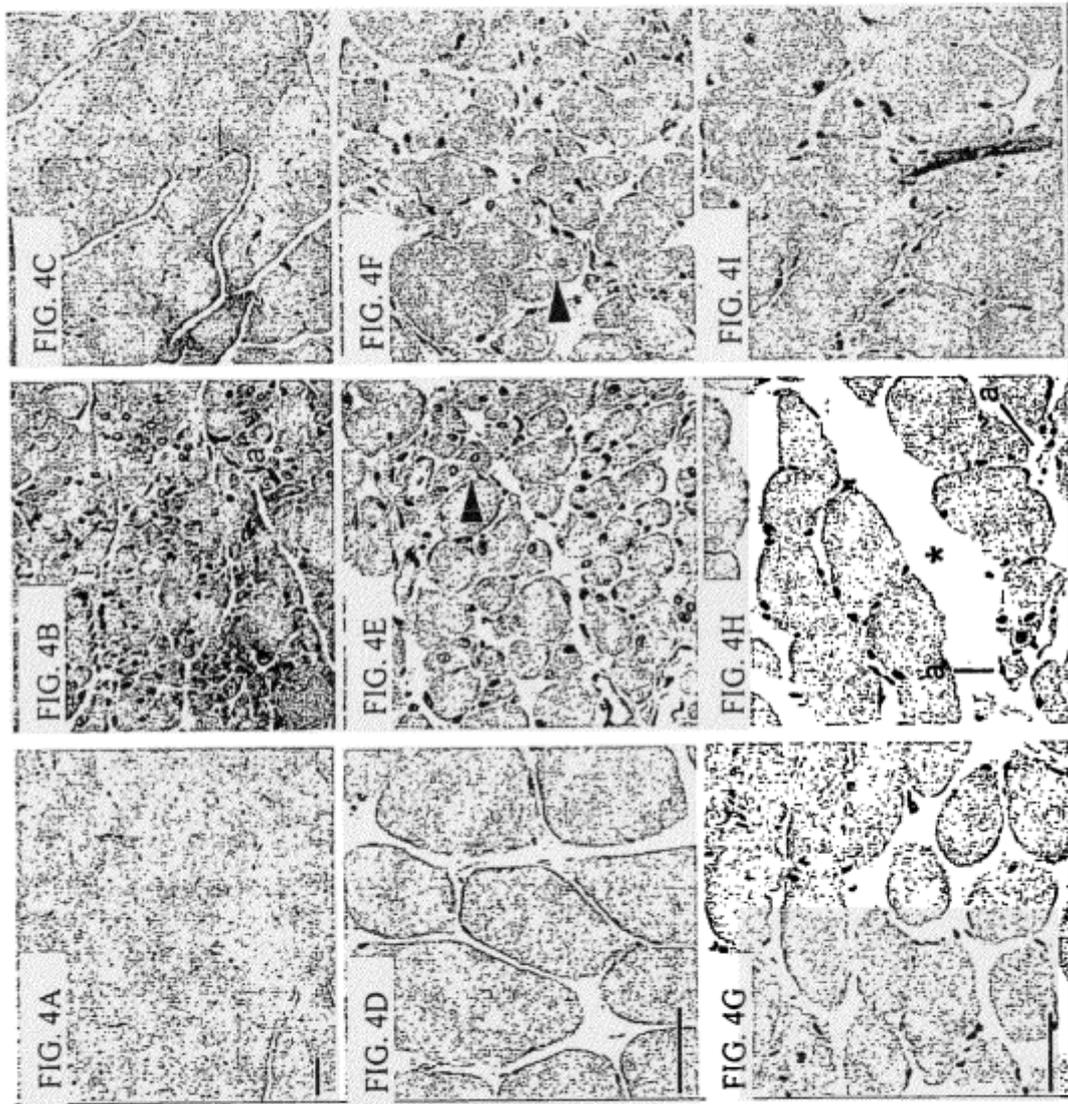


FIG. 4J

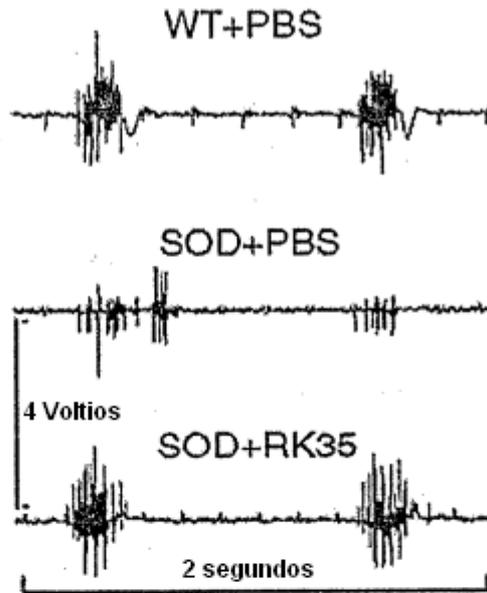


FIG. 4K

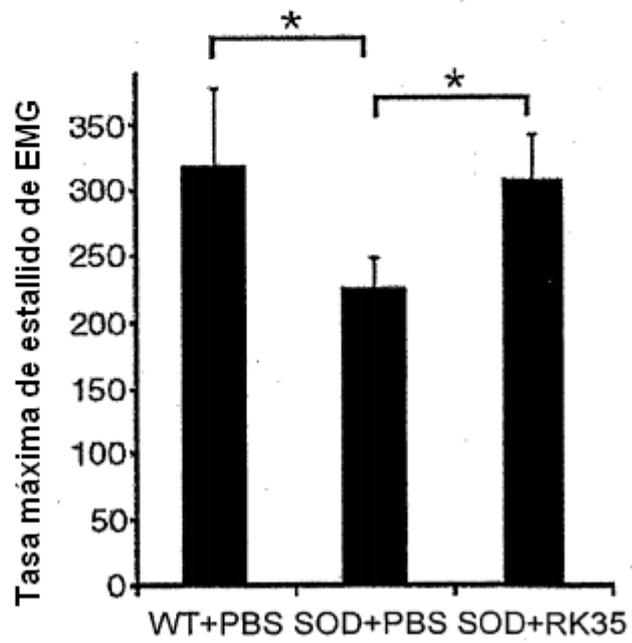


FIG. 5A

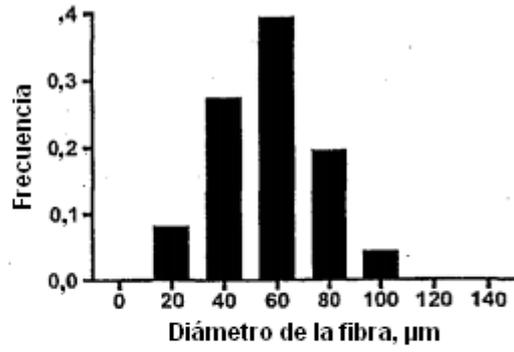


FIG. 5B

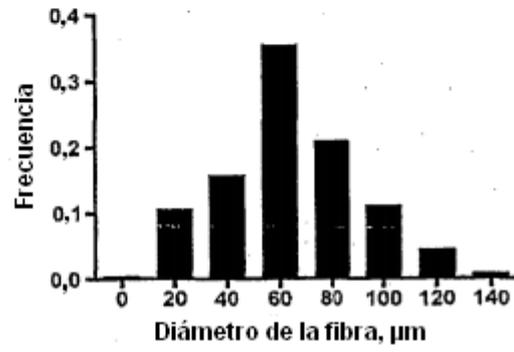


FIG. 5C

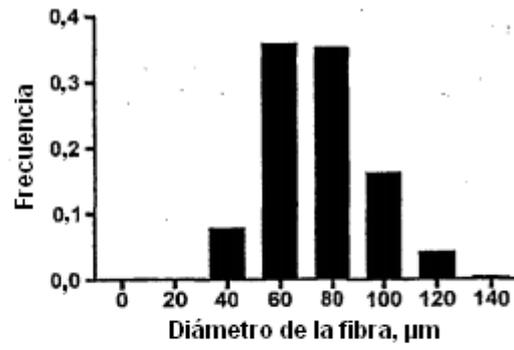


FIG. 5D

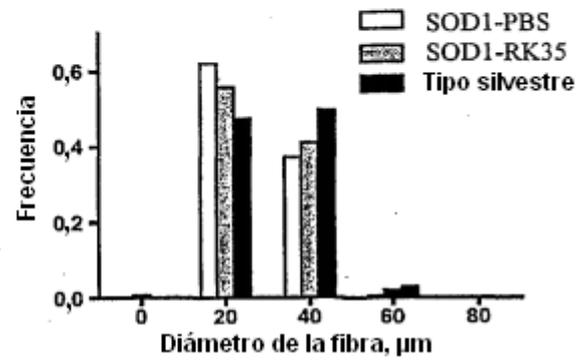


FIG. 6A

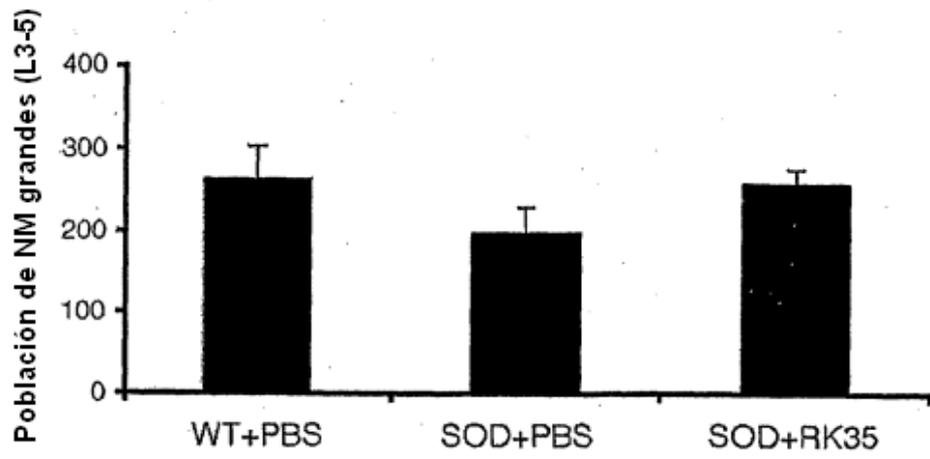


FIG. 6B

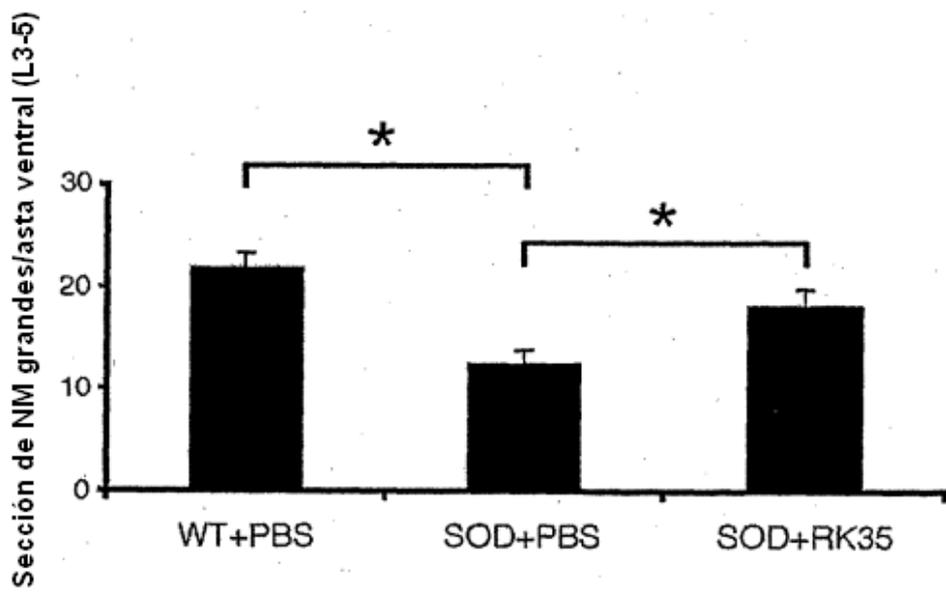


FIG. 6C

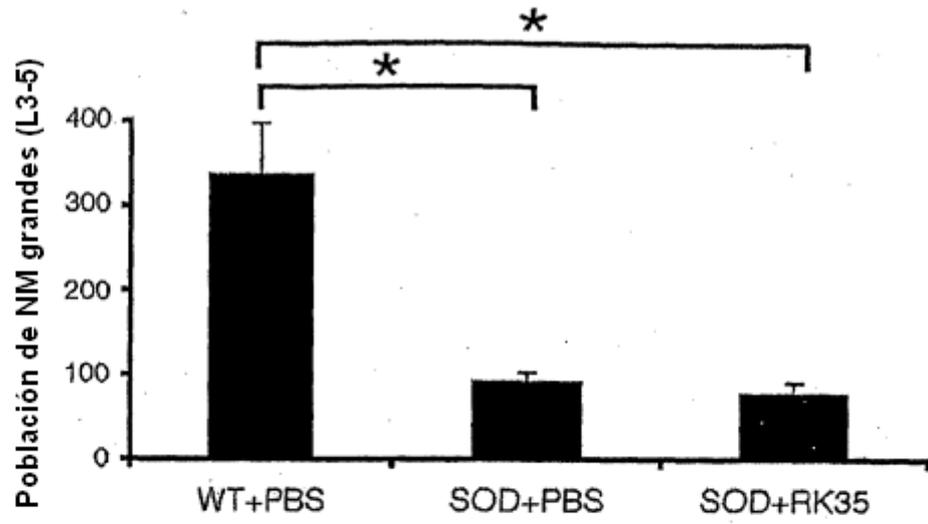
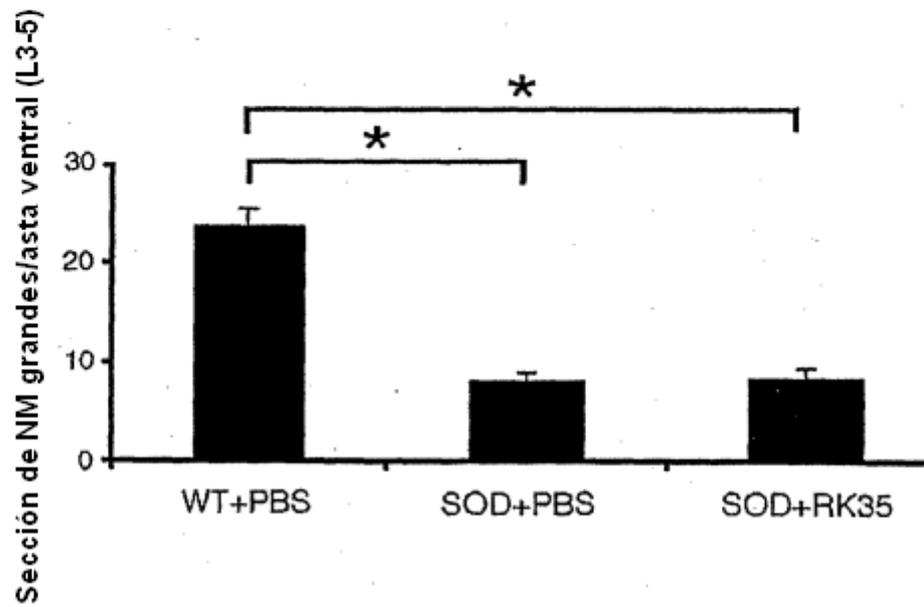
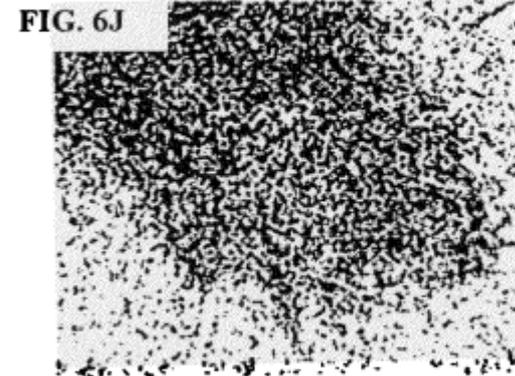
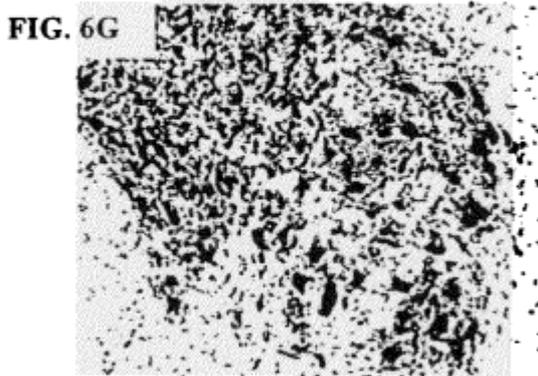
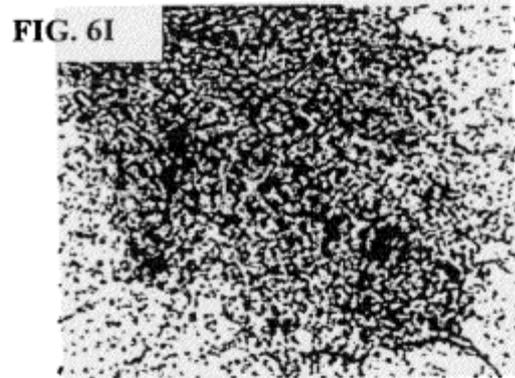
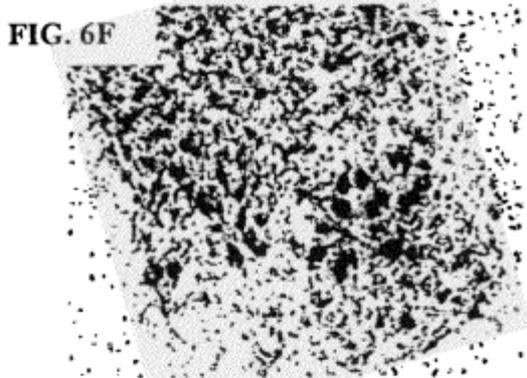
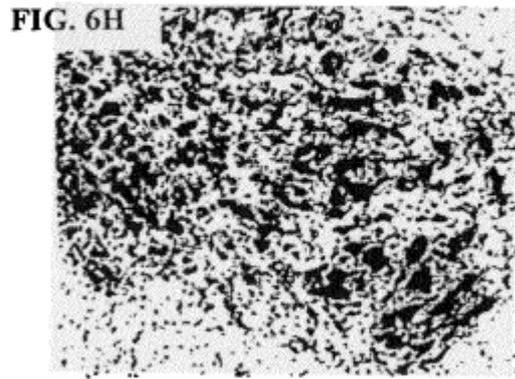
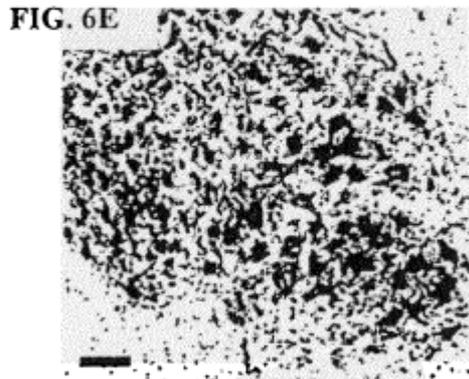


FIG. 6D







DFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYKANYCSGECEF
VFLQKY
PHTHLVHQANPRGSAGPCCTPTKMSPINMLYFNGKEQIIYGKIPAMVVDR
CGCS

FIG. 7

