

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 872**

51 Int. Cl.:

C07K 16/22 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 3/00 (2006.01)

A61P 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.10.2003 E 03758426 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.12.2014 EP 1554312**

54 Título: **Neutralización de anticuerpos contra GDF-8 y usos de los mismos**

30 Prioridad:

22.10.2002 US 419964 P

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

18.05.2015

73 Titular/es:

**WYETH LLC (50.0%)
235 East 42nd Street
New York, NY 10017, US y
MEDIMMUNE LIMITED (50.0%)**

72 Inventor/es:

**VELDMAN, GEERTRUIDA M.;
DAVIES, MONIQUE V.;
SONG, KENING;
WOLFMAN, NEIL M.;
GROVE-BRIDGES, KRISTIE;
FIELD, ANNE;
RUSSELL, CAROLINE y
VALGE-ARCHER, VIIA**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 535 872 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

Neutralización de anticuerpos contra GDF-8 y usos de los mismos.

5 CAMPO TÉCNICO

10 [0001] El campo técnico se refiere a anticuerpos contra el factor de crecimiento y diferenciación 8 (GDF-8), en particular anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos, especialmente aquellos que inhiben GDF-8 actividad *in vitro* y / o *in vivo*. El campo se refiere además a diagnosticar, prevenir, o tratar trastornos degenerativos de músculos o huesos, o trastornos del metabolismo de la insulina.

ANTECEDENTES

15 [0002] Factor de crecimiento y diferenciación-8 (GDF-8), también conocido como miostatina, es una proteína secretada y es miembro del factor de crecimiento transformante-beta (TGF- β) superfamilia de factores de crecimiento estructuralmente relacionados, todos los cuales poseen fisiológicamente importante propiedades reguladoras del crecimiento y morfogenéticas (Kingsley et al (1994) Genes Dev., 8: 133-146; Hoodless et al (1998) Curr Topics Microbiol Immunol, 228: 235-272). De manera similar a TGF- β , GDF-8 humana se sintetiza como una proteína precursora larga 375 de aminoácidos. La proteína precursora de GDF-8 forma un homodímero. Durante el procesamiento del propéptido amino-terminal se escinde en Arg-266. El propéptido escindido, conocido como el "péptido asociado a la latencia" (LAP), puede permanecer no covalentemente unido a la homodímero, inactivando así el complejo (Miyazono et al (1988) J. Biol Chem., 263: 6.407 a 6.415; Wakefield et al (1988) J. Biol Chem., 263: 7.646 hasta 7.654; Brown et al (1990) Factores de Crecimiento, 3: 35-43; y Thies et al Factores (2001) Crecimiento, 18: 251 -259). El complejo de GDF maduro-8 con propéptido se conoce comúnmente como el "pequeño complejo latente" (Gentry et al (1990) Biochemistry, 29: 6851 a 6857; Derynck et al (1995) Nature, 316: 701-705; y Massague (1990) Ann Rev. Cell Biol., 12: 597-641). Se conoce que otras proteínas también se unen a madurar GDF-8 e inhibir su actividad biológica. Tales proteínas inhibitoras incluyen follistatina y proteínas relacionadas con la follistatina (Gamer-et al (1999) Dev Biol, 208: 222-232).

30 [0003] Un alineamiento de secuencias de aminoácidos deducidas de varias especies demuestra que GDF-8 está altamente conservado durante la evolución (McPherson y colaboradores (1997) Proc Nat Acad Sci EE.UU., 94: 12457 a 12.461). De hecho, las secuencias de humano, ratón, rata, porcino, pollo y GDF-8 son 100% idénticas en la región C-terminal, mientras que en babuino, bovina, ovina y sólo se diferencian por 3 aminoácidos. El pez cebra GDF-8 es el más divergente; Sin embargo, todavía es 88% idéntico al humano.

35 [0004] El alto grado de conservación sugiere que GDF-8 tiene una función esencial. GDF-8 se expresa altamente en el músculo esquelético en desarrollo y adulto y se encontró que están involucrados en la regulación de procesos biológicos críticos en el músculo y en la osteogénesis. Por ejemplo, GDF-8 el cuero de los ratones transgénicos se caracteriza por una marcada hipertrofia e hiperplasia del músculo esquelético (McPherron y colaboradores (1997) Nature, 387: 83-90). Y la estructura ósea cortical alterada (Hamrick y colaboradores (2000) Bone, 27 (3): 343-349). Son evidentes los incrementos similares en la masa del músculo esquelético en mutaciones de origen natural de GDF-8 en el ganado (Ashmore y colaboradores (1974) Crecimiento., 38: 501-507; Swatland y colaboradores (1994) J. Anim Sci, 38.: 752-757; McPherron y colaboradores (1997) Proc Nat Acad Sci EE.UU., 94: 12457 hasta 12461; y Kambadur y colaboradores (1997) Genome Res, 7: 910-915). Los estudios han indicado que la atrofia muscular asociada con la infección por VIH está acompañada por un aumento en la expresión de GDF-8 (González-Cadavid et al (1998) Proc Nat Acad Sci EE.UU., 95: 14938-14943). GDF-8 también ha sido implicado en la producción de enzimas específicas del músculo (por ejemplo, la creatina quinasa) y la proliferación de las células de mioblastos (WO 00/43781). Además por sus propiedades reguladoras de crecimiento y morfogenéticas, se cree que GDF-8 es también involucrado en un número de otros procesos fisiológicos, incluyendo homeostasis de la glucosa en el desarrollo de la diabetes tipo 2, la tolerancia alterada a la glucosa, síndromes metabólicos (por ejemplo, síndrome X), resistencia a la insulina inducida por trauma, tales como quemaduras o desequilibrio de nitrógeno, y trastornos del tejido adiposo (por ejemplo, obesidad) (Kim et al (2001). BBRC, 281: 902-906).

55 [0005] Un número de trastornos humanos y animales se asocian con tejido muscular deteriorado funcionalmente, por ejemplo, distrofia muscular (incluyendo distrofia muscular de Duchenne), esclerosis lateral amiotrófica (ALS), atrofia muscular, atrofia de los órganos, la fragilidad, congestiva enfermedad pulmonar obstructiva, sarcopenia, caquexia, y pérdida de masa muscular síndromes causados por otras enfermedades y condiciones. Hasta la fecha, muy pocas terapias fiables o eficaces han sido desarrolladas para tratar estos trastornos.

60 [0006] También hay un número de condiciones asociadas con una pérdida de hueso, que incluyen osteoporosis y osteoartritis, especialmente en los ancianos y / o mujeres posmenopáusicas. Además, las enfermedades óseas metabólicas y trastornos incluyen baja masa ósea debido a la terapia crónica con glucocorticoides, insuficiencia gonadal prematura, supresión androgénica, deficiencia de vitamina D, hiperparatiroidismo secundario, deficiencias nutricionales, y anorexia nerviosa. Actualmente los tratamientos disponibles para estas condiciones de trabajo

mediante la inhibición de la resorción ósea. Una terapia que promueve la formación de hueso nuevo sería una alternativa deseable para estas terapias.

5 [0007] Por lo tanto, existe una necesidad de desarrollar nuevas terapias que contribuyan a un aumento global de masa muscular y / o fuerza y / o densidad ósea, especialmente, en los seres humanos.

RESUMEN

10 [0008] Es uno de los objetos de la presente invención proporcionar métodos terapéuticos seguros y eficaces para el músculo y / o trastornos de huesos asociado.

[0009] Es otro objeto de la invención proporcionar métodos para aumentar la masa muscular y / o fuerza y / o la densidad ósea en los vertebrados.

15 [0010] Otro objeto de la invención es aún proporcionar inhibidores de GDF-8 que sean seguros y efectivos *in vivo*.

[0011] Sin embargo, otro objeto de la invención es proporcionar anticuerpos humanos y fragmentos de los mismos que se unen GDF-8 con alta especificidad y afinidad.

20 [0012] En conformidad, un aspecto de invención provee un anticuerpo, o antígeno uniendo fragmentos de los mismos, que específicamente unen GDF-8, de dicho anticuerpo o fragmento comprimiendo:

Un anticuerpo variable (VH) de la región pesada, donde VH CDR1 comprime SEQ ID NO: 31, VH CDR2 comprime SEQ ID NO: 32, y VH CDR3 comprime SEQ ID NO: 33, y

25 Un anticuerpo variable (VL) de la región liviana, donde VL CDR1 comprime SEQ ID NO: 34, VL CDR2 comprime SEQ ID NO: 35, y VL CDR3 comprime SEQ ID NO: 36

[0013] Otro aspecto de invención provee un anticuerpo, o antígeno uniendo fragmentos de los mismos, que específicamente unen GDF-8, dicho anticuerpos o fragmentos comprimiendo:

30 Un anticuerpo variable (VH) de la región pesada, donde VH CDR1 comprime SEQ ID NO: 37, VH CDR2 comprime SEQ ID NO: 38, y VH CDR3 comprime SEQ ID NO: 39, Y

Un anticuerpo variable (VL) de la región liviana, donde VL CDR1 comprime SEQ ID NO: 41, VH CDR3 comprime SEQ ID NO: 42.

35 [0014] Un aspecto extra de invención provee un anticuerpo, o antígeno uniendo fragmentos de los mismos, que específicamente unen GDF-8, dicho anticuerpos o fragmentos comprimiendo:

Un anticuerpo variable (VH) de la región pesada, donde VH CDR1 comprime SEQ ID NO: 43, VH CDR2 comprime SEQ ID NO: 44, y VH CDR3 comprime SEQ ID NO: 45, Y

40 Un anticuerpo variable (VL) de la región liviana, donde VL CDR1 comprime SEQ ID NO: 46, VL CDR2 comprime SEQ ID NO: 47, VL CDR3 comprime SEQ ID NO: 48.

45 [0015] Lo que también se provee de acuerdo a la invención es un anticuerpo aislado o fragmentos del mismo que específicamente unen GDF-8, donde dicho anticuerpo es un scFv comprimiendo una secuencia de amino ácidos seleccionada de un grupo de una secuencia de amino ácidos que consisten en: SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 26, la secuencia de amino ácidos codificada por el vector fagémido depositado en ATCC bajo un número de depósito PTA-4741, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 20, una secuencia de amino ácido codificada por un vector fagémido depositado en ATCC bajo el número de depósito PTA-4739.

50 [0016] Otro aspecto de invención provee una composición farmacéutica comprimiendo un anticuerpo o fragmento de la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

[0017] Otro aspecto de invención provee para el uso de anticuerpos o fragmentos de la invención en la preparación de una tratamiento médico un trastorno de un mamífero seleccionado de un grupo que conteniendo un trastorno muscular, neuromuscular, hueso degenerativo y un trastorno de tejido adiposo.

55 [0018] La invención también provee para el uso de anticuerpos o fragmentos de la invención en la preparación de un médico para el tratamiento de un trastorno de una mamífero seleccionado de una grupo que contiene distrofia muscular, distrofia muscular de Duchenne, atrofia muscular, sarcopenia, caquexia, síndrome de pérdida muscular, esclerosis lateral amiotrófica, osteoporosis, osteoartritis, intolerancia a la glucosa, trauma inducido por la resistencia de insulina, diabetes tipo 2 y obesidad.

60 [0019] En concreto, la invención provee el uso de anticuerpos o fragmentos de la invención en la preparación de medicamentos para el tratamiento de distrofia muscular, y el uso de anticuerpos o fragmentos de la invención en la preparación de los medicamentos para incrementar la masa muscular del mamífero.

[0020] Otro aspecto de la invención provee polinucleótidos aislados que contiene una secuencia de ácidos nucleótidos uniendo los anticuerpos y los fragmentos de la invención. También provee una expresión del vector que comprime polinucleótidos de la invención y células de un huésped aislado que expresa anticuerpos o fragmentos de los mismos de la invención.

[0021] La invención también provee un método para producir anticuerpos o fragmentos de los mismos, que comprimen el paso de cultivar los huéspedes celulares de la invención y recuperar el anticuerpo o fragmentos del mismo producidos. En un aspecto relacionado, la siguiente invención provee un anticuerpo o fragmentos del mismo producidos por este método.

[0022] Se proveen métodos para el tratamiento de desórdenes de músculos y huesos degenerativos. Estos métodos también son útiles para incrementar la masa muscular y la densidad del cuerpo en animales normales. También se provee son anticuerpos humanos anti-GDF-8, expresan Myo29, Myo28, y Myo22, y anticuerpos y antígenos unidos de fragmentos derivados. Los anticuerpos de la invención poseen un número de propiedades útiles. Primero, los anticuerpos los anticuerpos están unidos a GDF-8 maduro con alta afinidad. Segundo, el desarrollo de anticuerpos inhibe la actividad de GDF-8 in vitro y in vivo como se demuestra, por ejemplo, por la inhibición de ActRIIB uniendo y evaluando el gen. Tercero, los anticuerpos desarrollan pueden inhibir la actividad GDF-8 asociada con regulación negativa del esqueleto de la masa muscular y densidad del hueso.

[0023] Ciertos revestimientos de la invención comprimen el Vh y/o VI dominan el fragmento de Fv de My29, Myo28, Myo22. Además, los revestimientos comprimen una o más regiones complementarias de determinadas regiones (CDRs) de cualquiera de estos dominios Vh y VI. Otros revestimientos comprimen un fragmento H3 del dominio de Vh de Myo29, Myo28, o Myo22.

[0024] otro aspecto provee composiciones que contienen anticuerpos de invención o sus fragmentos de sus antígenos, y sus usos en los métodos de inhibición o neutralización GDF-8, incluyendo métodos de tratamiento de humanos o animales. Los anticuerpos de invención pueden usarse para tratar o prevenir condiciones en las cuales un incremento en el tejido muscular o densidad ósea. Por ejemplo, el presente desarrollo de anticuerpos puede usarse en terapias para reparar el daño muscular, por ejemplo miocardia, diafragma, etc. Enfermedades y desórdenes incluyendo musculares y neuromusculares tales como, la distrofia muscular (distrofia muscular Duchenne); esclerosis lateral amiotrófica, atrofia muscular, atrofia de órganos, fragilidad, síndrome del túnel, obstrucción congestiva pulmonar, sarcopenia, caquexia y otros síndromes musculares; desórdenes en el tejido (ejemplo: obesidad), diabetes del tipo 2, intolerancia a la glucosa, síndromes metabólicos (ejemplo: síndrome X); resistencia a la insulina inducida por traumas tales como, quemaduras o desbalance de nitrógeno; y enfermedades óseas degenerativas (ejemplo: osteoartritis y osteoporosis).

[0025] Además, el presente desarrollo de anticuerpos puede ser usado como una herramienta de diagnóstico para detectar cuantitativa y cualitativamente GDF-8 o sus fragmentos en un ejemplo biológico. La presencia o cantidad de GDF-8 detectados pueden estar correlacionadas con una o más condiciones médicas de la lista antes mencionada.

[0026] Otro aspecto provee un ácido nucleico aislado, el cual comprime una secuencia de los dominios Vh o VI de un fragmento Fv de Myo29, Myo28, o Myo22. Un ácido nucleico aislado que comprime una secuencia de al menos un CDR de cualquier dominio presentado Vh o VI. También se proveen células que comprimen ácido nucleico.

[0027] También se desarrolla el nuevo método de producción de los dominios Vh y VI y/o anticuerpos funcionales que comprimen todas o una porción de dichos dominios derivados de Myo29, Myo28, o Myo22.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0028]

FIG. 1 muestra que GDF-8 biotinilado y BMP-11 se unen al receptor ActRIIB con un ED 50 de 15 ng / ml y 40 ng / ml, respectivamente.

FIG. 2 muestra la inhibición de GDF-8 uniéndose al receptor ActRIIB por fragmentos scFv de la invención. Como se ilustra, el IC 50 para scFv de Myo29, Myo28, y Myo22 son 2,4 nM, 1,7 nM, y 60 nM, respectivamente.

Figs. 3A y 3B demuestran que la pre incubación de Myo29 con biotinilado GDF-8 o BMP-11 a 10 ng / ml inhibe GDF-8 o BMP-11 unido a ActRIIB en el ensayo de unión a ActRIIB con una CI 50 de 0,2-0,4 nM.

Figs. 4B y 4C describen resultados de pGL3 (CAGA) 12 ensayos de gen reportero, en el que Myo29 se probó. FIG. 4A demuestra las condiciones de línea base, es decir, la inducción de la actividad del gen indicador por GDF-8, BMP-11, y activina. Figs. 4B y 4C muestran que Myo29 reduce la actividad de GDF-8 de una manera sensible a la dosis, con una CI 50 de 15-30 ng / ml, e inhibe la actividad biológica de BMP-11 en la misma medida. FIG. 4D ilustra que Myo29 no afecta a la actividad de activina en este ensayo.

FIG. 5 muestra los resultados de la cartografía epítipo para Myo22, Myo28 y Myo29. El epítipo para Myo29 fue asignado desde el aminoácido 72 al aminoácido 88 de maduro GDF-8; para Myo22, desde el aminoácido 1 al aminoácido 44; para Myo28, a partir de los aminoácidos 1 a 98 de aminoácidos

FIG. 6 demuestra los resultados de un análisis de la sustitución del epítipo Myo29. Residuos de Lys-78, Pro-81, y Asn-83 madura en GDF-8 parecen ser importantes para la unión a Myo29 GDF-8.

FIG. 7 representa los resultados de un experimento de inmune-precipitación realizada con Myo29 y Myo28. El medio condicionado de células CHO que expresan GDF-8, que fueron radio marcados con 35 S-metionina / cisteína, se sometió a inmune-precipitación con Myo29 o Myo28. Los inmune-precipitados se analizaron entonces mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras. Las bandas en el gel se identifican como maduras de pro péptido GDF-8, GDF-8, y sin procesar GDF-8.

FIG. 8 representa los resultados de un estudio farmacocinético en el que C57B6 / SCID recibió una dosis de 1 mg / kg como una sola (IV) o intraperitoneal administración (IP) intravenosa de Myo29. Myo29 muestra semivida de eliminación prolongada de alrededor de una semana y bajo espacio libre alrededor de 1 ml / h / kg. La fracción absorbida después de la inyección IP es alrededor del 77%.

FIG. 9 muestra las comparaciones de masas de cuádriceps en C57B6 / SCID machos tratados semanalmente con varias dosis de Myo29 (60, 10, y 1 mg / kg) o vehículo (PBS). El tratamiento con Myo29, en los niveles de dosis 10 y 60 mg / kg para cuatro resultados semanas en un aumento estadísticamente significativo en la masa muscular del 19% y 23%, respectivamente.

Figs. 10A y 10B Mostrar gastrocnemio y masas de cuádriceps en ratones CB17 SCID hembras tratadas semanalmente con diversas dosis de Myo29 (10, 5, 2,5 y 1 mg / kg) o PBS durante cuatro semanas. La masa muscular se aumenta en un 10 a 20% en ratones tratados con Myo29 en comparación con el control del vehículo.

Figs. 11A y 11B demostrar respectivamente gastrocnemio y masa muscular de cuádriceps en ratones CB17 SCID hembras tratadas semanalmente con diversas dosis de Myo29 (10, 5, 2,5 y 1 mg / kg) o PBS durante doce semanas. Los ratones tratados con Myo29 muestran incrementos en la masa muscular de entre 12 y 28%.

FIG. 12 muestra la fuerza muscular del miembro frontal, tal como se mide por un medidor de fuerza de agarre, en ratones CB17 SCID hembras tratadas semanalmente con Myo29 (10 y 5 mg / kg) o PBS durante doce semanas. Fuerza de las extremidades frontales se incrementan en 17% y 23% en ratones tratados con Myo29 a 5 mg / kg y 10 mg / kg, respectivamente.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

I. Definiciones

[0029] El término "anticuerpo", como se usa aquí, se refiere a una inmunoglobulina o una parte de la misma, y abarca cualquier polipéptido que comprende un sitio de unión al antígeno independientemente de la fuente, las especies de origen, método de producción y características. Como un ejemplo no limitativo, el término "anticuerpo" incluye anticuerpos de pollo, humanos, orangután, ratón, rata, cabra, y oveja. El término incluye pero no se limita a anticuerpos policlonales, monoclonales, monoespecíficos, poliespecíficos, de cadena sencilla humanizado no específica, quiméricos, sintéticos, recombinantes, híbridos, mutados, y anticuerpos injertados con CDR. Para los fines de la presente invención, también incluye, a menos que se indique lo contrario, los fragmentos de anticuerpos tales como Fab, F (ab')₂, Fv, scFv, Fd, dAb, y otros fragmentos de anticuerpos que retienen la función de unión al antígeno.

[0030] Los anticuerpos se pueden hacer, por ejemplo, a través de técnicas de hibridoma tradicionales (Kohler y Milstein (1975) *Nature*, 256: 495-499) (Patente de Estados Unidos No. 4.816.567), métodos de ADN recombinante, o de fagos utilizando técnicas de visualización de bibliotecas de anticuerpos (Clackson y colaboradores (1991) *Nature*, 352: 624-628; Marks y colaboradores (1991) *J. Mol Biol*, 222: 581-597). Por diversas otras técnicas de producción de anticuerpos, véase *Antibodies: A Laboratory Manual*, eds. Harlow y colaboradores, *Cold Spring Harbor Laboratory*, 1988.

[0031] El término "dominio de unión a antígeno" se refiere a la parte de una molécula de anticuerpo que comprende el área que se une específicamente o complementariamente a una parte o la totalidad de un antígeno. Cuando un antígeno es grande, un anticuerpo puede unirse sólo a una parte particular del antígeno. El "epítipo" o "determinante antigénico" es una porción de una molécula de antígeno que es responsable de las interacciones específicas con el dominio de unión a antígeno de un anticuerpo. Un dominio de unión al antígeno puede ser proporcionado por uno o más dominios variables de anticuerpo (por ejemplo, un denominado fragmento de anticuerpo Fd consistente en un V_H dominio). Un dominio de unión a antígeno comprende una cadena ligera del anticuerpo de región variable (V_L) y el anticuerpo una región variable de cadena pesada (V_H).

[0032] El término "repertorio" se refiere genéticamente a una diversa colección de nucleótidos, por ejemplo, ADN, total o parcialmente a secuencias derivadas que codifican inmunoglobulinas expresadas. Las secuencias se generan por reordenamiento *in vivo* de, por ejemplo, V, D y J segmentos de cadenas H y, por ejemplo, V y J para las cadenas L segmento. Alternativamente, las secuencias pueden generarse a partir de una línea celular por estimulación *in vitro* y en respuesta a la que se produce la reordenación. Alternativamente, parte o la totalidad de las secuencias se pueden obtener mediante la combinación de, por ejemplo, segmentos V no reordenados con segmentos D y J, por la síntesis de nucleótidos, mutagénesis al azar, y otros métodos como se describen en la patente US. No. 5.565.332.

[0033] El término "interacción específica" o "se une específicamente", significan que dos moléculas forman un complejo que es relativamente estable bajo condiciones fisiológicas. El término es también aplicable cuando, por ejemplo, un antígeno-dominio de unión es específico para un epítipo particular, que se lleva por un número de antígenos, en cuyo caso el anticuerpo que lleva el dominio de unión al antígeno será capaz de unirse a los diversos antígenos que lleva el epítipo. Por lo tanto, un anticuerpo puede unirse específicamente, por ejemplo, BMP-11 y GDF-8, siempre se une al epítipo, que se lleva por ambos.

[0034] La unión específica se caracteriza por una alta afinidad y una baja a moderada capacidad. La unión no específica por lo general tiene una baja afinidad con una moderada a alta capacidad. Típicamente, la unión se considera específica cuando la constante de afinidad K es mayor a 10^6 M^{-1} , o preferiblemente mayor que 10^8 M^{-1} . Si es necesario, la unión no específica se puede reducir sin afectar sustancialmente la unión específica mediante la variación de las condiciones de unión. Tales condiciones son conocidas en la técnica, y un experto en la técnica utilizando técnicas rutinarias puede seleccionar las condiciones apropiadas. Las condiciones usualmente se definen en términos de concentración de anticuerpos, la fuerza iónica de la solución, temperatura, tiempo permitido para la unión, concentración de moléculas no relacionadas (por ejemplo, albúmina de suero, caseína de la leche), etc. condiciones ejemplares se exponen en los Ejemplos 4, 7, y 10.

[0035] La frase "sustancialmente como se establece" significa que el CDR relevante, V H o V L dominio será idéntico o muy similar a las regiones determinadas de que la secuencia se establece en el presente documento. Por ejemplo, tales sustituciones incluyen 1 o 2 de los 5 aminoácidos en la secuencia de un CDR (H1, H2, H3, L1, L2, o L3).

[0036] El término "superfamilia de TGF- β " se refiere a una familia de factores de crecimiento estructuralmente relacionados. Esta familia de factores de crecimiento relacionados es bien conocida en la técnica (Kingsley y colaboradores (1994) Genes Dev., 8: 133-146; Hoodless y colaboradores (1998) Curr Topics Microbiol Immunol, 228: 235-72). El TGF- β incluye superfamilia de proteínas óseas morfogenéticas (BMP), activina, inhibina, sustancia inhibidora de Müller, factor neurotrófico derivado de la glía, y un número todavía creciente de factores de crecimiento y diferenciación (GDF), tales como GDF-8 (miostatina). Muchas de dichas proteínas están estructuralmente y / o funcionalmente relacionadas con GDF-8. Por ejemplo, BMP-11 humana, también conocida como GDF-11, es 90% idéntica a GDF-8 en el nivel de aminoácido (Gamer y colaboradores (1999) Dev Biol 208, 222-232;... Nakshima y colaboradores. (1999) Mech Dev, 80:... 185-189).

[0037] El término "GDF-8" se refiere a un crecimiento específico y el factor-8 de diferenciación y, en su caso, los factores que están estructural o funcionalmente relacionados con GDF-8, por ejemplo, BMP-11 y otros factores que pertenecen a la superfamilia de TGF- β . El término se refiere a la longitud de la forma completa del precursor sin procesar de GDF-8, así como las formas maduras y propéptido resultantes de la escisión post-traducciona. El término también se refiere a cualquier fragmento y variante de GDF-8 que mantienen al menos algunas actividades biológicas asociadas con GDF-8 maduro, como se discute en la presente memoria, incluyendo secuencias que se han modificado. La secuencia de aminoácidos humana madura de GDF-8 se proporciona en SEQ ID NO: 49. La presente invención se refiere a GDF-8 de todas las especies de vertebrados, incluyendo, pero no limitado a, humano, bovino, pollo, ratón, rata, porcino, ovino, pavo, babuino, y peces (para información de la secuencia, véase, por ejemplo, McPherron y colaboradores (1997) Proc Nat Acad Sci EE.UU., 94: 12457-12461).

[0038] El término "maduro GDF-8" se refiere a la proteína que se escinde del dominio carboxi-terminal de la proteína precursora de GDF-8. El GDF-8 maduro puede estar presente como un monómero, homodímero, o en un GDF-8 complejo latente. Dependiendo de las condiciones, GDF-8 maduro podrá establecer el equilibrio entre cualquiera o todas estas formas diferentes. En su forma biológicamente activa, el GDF-8 maduro también se refiere como "activo GDF-8."

[0039] El término "GDF-8 propéptido" se refiere al polipéptido que se escinde del dominio amino-terminal de la proteína precursora de GDF-8. El GDF-8 propéptido es capaz de unirse al dominio de unión del propéptido en el GDF-8 maduro.

[0040] El término "GDF-8 complejo latente" se refiere al complejo de proteínas formadas entre el GDF-8 maduro y el homodímero de GDF-8 propéptido. Se cree que dos propéptidos de GDF-8 se asocian con dos moléculas de GDF-8 maduro en el homodímero para formar un complejo tetramérico inactivo. El complejo latente puede incluir otros inhibidores de GDF en lugar de o además de uno o más de los propéptidos de GDF-8.

[0041] El término "GDF-8 actividad" se refiere a una o más de las actividades reguladoras del crecimiento o morfogenéticas fisiológicamente activo asociados con la proteína de GDF-8. Por ejemplo, activo GDF-8 es un regulador negativo de la masa muscular esquelética. Activo GDF-8 también puede modular la producción de enzimas específicas del músculo (por ejemplo, la creatina quinasa), estimular la proliferación de mioblastos, y modular la diferenciación de preadipocitos a adipocitos. Ejemplos de procedimientos para la medición de GDF-8 actividad *in vivo* e *in vitro* se exponen en los Ejemplos 2, 3, 6, y 13.

5 [0042] El término "inhibidor de GDF-8" incluye cualquier agente capaz de inhibir la actividad, expresión, procesamiento, o secreción de GDF-8. Tales inhibidores incluyen proteínas, anticuerpos, péptidos, peptidomiméticos, ribozimas, oligonucleótidos antisentido, ARN de doble cadena, y otras moléculas pequeñas, que inhiben específicamente GDF-8. Tales inhibidores se dice que "inhibir", "neutralizar" o "reducir" la actividad biológica de GDF-8.

10 [0043] Los términos "neutralizar", "neutralizantes", "inhibidores", y sus cognados se refieren a una reducción en la actividad de GDF-8 por un inhibidor de GDF-8, relativa a la actividad de GDF-8 en ausencia del mismo inhibidor. La reducción en actividad es preferiblemente al menos aproximadamente 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o superior.

15 [0044] El término "tratamiento" se usa aquí de forma intercambiable con el término "método terapéutico" y se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas / preventivas. Los que están en necesidad de tratamiento pueden incluir las personas que ya tienen un trastorno médico particular, así como los que en última instancia puede adquirir la enfermedad (es decir, los que necesitan medidas preventivas).

20 [0045] El término "aislado" se refiere a una molécula que es sustancialmente libre de su entorno natural. Por ejemplo, una proteína aislada está sustancialmente libre de material celular u otras proteínas de la fuente de células o tejido del que se deriva. El término se refiere a preparaciones donde la proteína aislada es suficientemente pura para ser administrada como una composición terapéutica, o al menos 70% a 80% (w / w) pura, más preferiblemente, al menos 80% -90% (w / w) pura, incluso más preferiblemente, 90-95% pura; y, lo más preferiblemente, al menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% (w / w) pura.

25 [0046] El término "mamífero" se refiere a cualquier animal clasificado como tal, incluyendo humanos, animales domésticos y de granja, parque zoológico, deportivos o de los animales de compañía, como perros, caballos, gatos, ovejas, cerdos, vacas, etc.

30 [0047] El término "dosis efectiva" o "cantidad eficaz" se refiere a aquella cantidad del compuesto que se traduce en mejoría 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 debería ser suficiente para reducir la actividad de GDF-8 asociada con la regulación negativa de masa del músculo esquelético y la densidad ósea. La cantidad eficaz puede ser determinada como se describe en las secciones siguientes.

35 II. Anticuerpos contra GDF-8 y fragmentos de unión antígenos

A. anticuerpos humanos Myo29, Myo28 y Myo22

40 [0048] La presente descripción proporciona nuevos anticuerpos contra GDF-8, y fragmentos de unión a antígeno de los mismos. Realizaciones ilustrativas no limitativas de tales anticuerpos se denominan Myo29, Myo28 y Myo22. Estos ejemplos de realización se proporcionan en forma de humanos IgG 1 anticuerpos.

45 [0049] Los anticuerpos de la invención poseen características únicas y beneficiosas. En primer lugar, estos anticuerpos son capaces de unirse a GDF-8 maduro con alta afinidad. En segundo lugar, los anticuerpos de la invención pueden inhibir la actividad de GDF-8 *in vitro* e *in vivo* como se demuestra, por ejemplo, por inhibición de la unión a ActRIIB y ensayos de gen reportero. Los anticuerpos de la presente invención también son capaces de unirse específicamente y / o inhibir la actividad de BMP-11 como se ha demostrado, por ejemplo, por inhibición de la unión a ActRIIB y ensayos de gen reportero. En tercer lugar, los anticuerpos dados a conocer pueden inhibir GDF-8 actividad asociada con la regulación negativa de masa del músculo esquelético y la densidad ósea.

50 [0050] En un ejemplo de realización, los anticuerpos descritos en la presente son capaces de unirse específicamente tanto a GDF-8 y BMP-11. Se contempla que los anticuerpos también pueden reaccionar con otras proteínas, por ejemplo, los que pertenecen a la superfamilia de TGF- β como sustancia inhibidora de mullerian, factor neurotrófico derivado de la glía, o factores de crecimiento y diferenciación distintos de GDF-8. En ciertas realizaciones, Myo29 reacciona con una proteína que comprende una secuencia idéntica a los aminoácidos 72 a 88 de la SEQ ID NO: 49. En realizaciones adicionales, Myo29 une a una proteína que comprende la secuencia Lys-Xaa1-Xaa2-Xaa3-Pro-Asn (SEQ ID NO: 54), en la que Xaa1, Xaa2, Xaa3 y cada uno es cualquier aminoácido. En otras realizaciones, al menos una de las siguientes condiciones se cumple: (1) Xaa1 = Met, (2) Xaa2 = Ser, y (3) Xaa3 = Ile; todos independientemente uno de otro. En otras realizaciones, Myo22 reconoce un epítipo dentro de los primeros 44 aminoácidos N-terminales de la secuencia madura de GDF-8 (aminoácidos 1 a 44 de la SEQ ID NO: 49).

60 [0051] Un experto ordinario en la técnica reconocerán que los anticuerpos de la invención pueden ser utilizados para detectar, medir, e inhibir proteínas que difieren de los indicados anteriormente. En general, los anticuerpos de la invención se pueden utilizar con cualquier proteína que comprende una secuencia que es al menos aproximadamente 70%, 80%, 90%, 95%, o más idéntica a cualquier secuencia de al menos 100, 80, 60, 40 o 20 de

los aminoácidos contiguos en la secuencia de la forma madura de GDF-8 se expone SEQ ID NO: 49. Ejemplos no limitantes de tales proteínas incluyen secuencias de GDF-8 derivadas de diversas especies, que se describen en la presente memoria. El porcentaje de identidad se determina por algoritmos de alineación estándar tales como, por ejemplo, Basic Local Alignment Tool (BLAST) descrito en Altschul y colaboradores. (1990) J. Mol. Biol., 215: 403-410, el algoritmo de Needleman y colaboradores. (1970) J. Mol. Biol., 48: 444-453, o el algoritmo de Meyers y colaboradores. (1988) Comput. Appl. Biosci., 4: 11-17.

B. Dominios Variables

10 [0052] Anticuerpos intactos, también conocidos como inmunoglobulinas, son típicamente proteínas glicosiladas tetraméricas compuestas por dos cadenas (L) de luz de aproximadamente 25 kDa cada uno y dos (H) cadenas pesadas de aproximadamente 50 kDa cada una. Dos tipos de cadena ligera, denominados λ y κ , se encuentran en anticuerpos. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de las cadenas pesadas, las inmunoglobulinas pueden asignarse a cinco clases principales: A, D, E, G y M, y varias de estas pueden dividirse además en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG 1, IgG 2, IgG 3, IgG 4, IgA 1 e IgA 2. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de las 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 colaboradores, 1988. Brevemente, cada cadena ligera se compone de una variable N-terminal (V) dominio (V L) y una (C) dominio constante (C L). Cada cadena pesada se compone de una V dominio N-terminal, tres o cuatro dominios C, y una región bisagra. El C H dominio más próximo al V H se designa como C H 1. El V H y V L de dominio consta de cuatro regiones de secuencia conservada llamadas regiones marco relativas (FR1, FR2, FR3, y FR4), que forman un armazón para tres regiones de secuencia hipervariable (regiones determinantes de complementariedad, CDRs). Las CDR contienen la mayor parte de los residuos responsables de interacciones específicas con el antígeno. CDRs se refieren como CDR1, CDR2, y CDR3. Por consiguiente, los componentes de CDR en la cadena pesada se conocen como H1, H2, y H3, mientras que los constituyentes de CDR en la cadena ligera se conocen como L1, L2, y L3. CDR3 es la mayor fuente de diversidad molecular en el sitio de unión de anticuerpos. H3, por ejemplo, puede ser tan corto como dos residuos de aminoácidos o mayor que 26. El fragmento de unión al antígeno más pequeño es el Fv, que consisten en los V H y V L dominios. El fragmento Fab (fragmento de unión a antígeno) consiste en los V H -C H 1 y V L -C L dominios unidos covalentemente por un enlace disulfuro entre las regiones constantes. Para superar la tendencia de no covalentemente V H y V L dominios en el Fv de disociar cuando se co-expresan en una célula huésped, lo que se denomina una sola cadena fragmento (Sc) Fv (scFv) se puede construir, en la que unos enlaces polipeptídicos flexibles y adecuadamente largos o bien el C-terminal de la V H a la N-terminal de la V L o el C-terminal de la V L a la N-terminal de la V H. El enlazador más comúnmente utilizado ha sido uno de los 15 residuos (Gly 4 Ser) 3 péptido, pero otros enlazadores son también conocidos en la técnica.

40 [0053] La diversidad de anticuerpos se crea mediante el uso de múltiples genes de la línea germinal que codifican regiones variables y una variedad de eventos somáticos. Los eventos somáticos incluyen la recombinación de segmentos de genes variables con diversidad (D) y uniendo segmentos de genes (J) para hacer una completa región V H y la recombinación de variable y de unión segmentos de genes para hacer una completa V L región. El proceso de recombinación en sí es imprecisa, lo que resulta en la pérdida o adición de aminoácidos en la uniones de V (D) J. Estos mecanismos de diversidad se producen en la célula B en desarrollo antes de la exposición al antígeno. Después de la estimulación antigénica, los genes de anticuerpos expresados en las células B se someten a mutación somática. Con base en el número estimado de segmentos de genes de la línea germinal, la recombinación aleatoria de estos segmentos, y aleatorios V H -V L emparejamiento, hasta $1,6 \times 10^7$ anticuerpos diferentes pueden ser producidos (*Fundamental Immunology*, 3ª ed., ed. Pablo, Raven Press, Nueva York, NY, 1993). Cuando se tienen en cuenta otros procesos que contribuyen a la diversidad de anticuerpo (tal como la mutación somática), se cree se podrían generar más del 1×10^{10} anticuerpos diferentes (genes de inmunoglobulina, 2ª ed., eds. Jonio y colaboradores, Academic Press, San Diego, Calif., 1995). Debido a los muchos procesos implicados en la generación de diversidad de anticuerpos, es poco probable que los anticuerpos monoclonales derivados de forma independiente con la misma especificidad de antígeno tengan secuencias de aminoácidos idénticas.

55 [0054] Así, la presente invención proporciona además nuevos CDRs derivados de bibliotecas de genes de inmunoglobulina humanos. La estructura para la realización de una CDR de la invención será generalmente una secuencia de anticuerpo de cadena pesada o ligera o una porción sustancial de la misma, en la cual el CDR está situado en una localización correspondiente a la CDR de origen natural V H y V L. Las estructuras y las ubicaciones de los dominios variables de inmunoglobulina pueden determinarse como se describe en *Secuencias de Proteínas de Interés Inmunológico*, Departamento de Salud y Servicios Humanos, eds. Kabat y colaboradores, 1991.

60 [0055] Secuencias de ADN y de aminoácidos (AA) de los anticuerpos descritos en la presente, su fragmento scFv, V H y V L dominios y CDRs se exponen en las secuencias de venta y se enumeran como se indica en la Tabla 1. Para una mayor comodidad, las posiciones de cada uno CDR en V H y V L dominios se enumeran en la Tabla 2. Las secuencias de cadenas pesadas y ligeras excluyendo los V H y V L dominios son idénticas en Myo29, Myo28 y Myo22.

TABLA 1: ADN y secuencias de aminoácidos de scFv_H y V_L Dominios, y CDR

	Myo29	Myo28	Myo22
Secuencia de ADN de scFv	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 1
Secuencia de AA de scFv	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 2
Secuencia de ADN de VH	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 3
Secuencia de AA de VH	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 4
Secuencia de ADN de VL	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 5
AA secuencia de VL	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 6
Ss ADN a la línea germinal. de scFv	SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 19	
Ss AA a la línea germinal. de scFv	SEQ ID NO: 26	SEQ ID NO: 20	
Ss ADN a la línea germinal. VH	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 21	
Ss AA a la línea germinal. de VH	SEQ ID NO: 28	SEQ ID NO: 22	
Ss ADN a la línea germinal. de VL	SEQ ID NO: 29	SEQ ID NO: 23	
Ss AA a la línea germinal. de VL	SEQ ID NO: 30	SEQ ID NO: 24	
Secuencia de AA de H1	SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 37	SEQ ID NO: 43
Secuencia de AA de H2	SEQ ID NO: 32	SEQ ID NO: 38	SEQ ID NO: 44
Secuencia de AA de H3	SEQ ID NO: 33	SEQ ID NO: 39	SEQ ID NO: 45
AA secuencia de L1	SEQ ID NO: 34	SEQ ID NO: 40	SEQ ID NO: 46
Secuencia de AA de L2	SEQ ID NO: 35	SEQ ID NO: 41	SEQ ID NO: 47
Secuencia de AA de L3	SEQ ID NO: 36	SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 48

TABLA 2: Las posiciones de los CDRs dentro de scFv

CDR	Myo29 (SEQ ID NO: 26)	Myo28 (SEQ ID NO: 20)	Myo22 (SEQ ID NO: 2)
H1	31-35	31-35	31-35
H2	50-66	50-66	50-66
H3	99-106	99-110	99-113
L1	157-167	160-173	163-176
L2	183-189	189-195	192-198
L3	222-228	228-233	231-242

5 [0056] Actualmente presentan anticuerpos pueden comprimir regiones constantes de anticuerpos o partes de los mismos. Por ejemplo, una V_L de dominio puede estar unido en su extremo C-terminal a dominios constantes de la cadena ligera de anticuerpo incluyendo cadenas humanas C_k o C_λ, preferiblemente cadenas C_λ. Del mismo modo, un fragmento de unión a antígeno específico basado en una V_H dominio puede estar unido en su extremo C-terminal a la totalidad o parte de una cadena pesada de inmunoglobulina derivada de cualquier isotipo de anticuerpo, por ejemplo, IgG, IgA, IgE e IgM, y cualquiera de las subclases de isotipo, particularmente IgG₁ e IgG₄. En realizaciones de ejemplo, los anticuerpos comprenden fragmentos C-terminales de las cadenas pesadas y ligeras de IgG humana _{1λ}. El ADN y secuencias de aminoácidos para el fragmento C-terminal de la cadena ligera λ se exponen en la SEQ ID NO: 50 y SEQ ID NO: 51, respectivamente. El ADN y secuencias de aminoácidos para el fragmento C-terminal de IgG₁ de cadena pesada se exponen en la SEQ ID NO: 52 y SEQ ID NO: 53, respectivamente.

15 [0057] Ciertas realizaciones de la invención comprenden la V_H y / o V_L dominio del fragmento Fv de Myo29, Myo28, Myo22 u otras realizaciones comprenden uno o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) de cualquiera de estos V_H y V_L dominios. Una forma de realización comprende un fragmento de H3 de la V_H dominio de Myo29, Myo28, o Myo22. Los V_H y V_L dominios de la invención, en ciertas realizaciones, están a la línea germinal, es decir, las regiones marco (FR) de estos dominios se cambió por medio de técnicas de biología molecular convencionales para que coincida con las secuencias de aminoácidos consenso de los productos génicos de línea germinal humana. En otras realizaciones, las secuencias estructurales permanecen divergieron de la línea germinal.

C. Anticuerpos modificados y sus fragmentos.

5 [0058] Un aspecto adicional de la invención proporciona un método para obtener un dominio de unión a antígeno del anticuerpo específico para GDF-8. El experto en la técnica apreciará que los anticuerpos de la invención no se limitan a las secuencias específicas de V_H y V_L como se indica en la Tabla 1, pero incluyen variantes de estas secuencias que conservan la capacidad de unión a antígeno. Tales variantes se pueden derivar de las secuencias proporcionadas utilizando técnicas conocidas en la técnica. La sustitución de aminoácido, deleciones, o adiciones, se pueden hacer en cualquiera de las FR o en las CDRs. Aunque los cambios en las regiones de marco
10 generalmente están diseñados para mejorar la estabilidad y reducir la inmunogenicidad del anticuerpo, los cambios en las CDR se diseñan generalmente para aumentar la afinidad del anticuerpo por su diana. Tales cambios de afinidad mayor se determinan empíricamente mediante la alteración de la región CDR y prueba del anticuerpo. Tales alteraciones pueden hacerse de acuerdo a los métodos descritos en Antibody Engineering, segunda. ed., ed. Borrebaeck, Oxford University Press, 1995.

15 [0059] El método para hacer un V_H dominio que es una variante de secuencia de aminoácidos de la V_H dominio establecido en el presente documento comprende una etapa de añadir, eliminar, sustituir o insertar uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la actualmente descrito V_H dominio, combinando opcionalmente la V_H dominio así proporcionado con uno o más V_L dominios, y prueba de la V_H dominio o V_H / V_L combinación o
20 combinaciones para la unión específica a GDF-8, opcionalmente, poniendo a prueba la capacidad de dicho antígeno dominio de unión para neutralizar la actividad GDF-8. El V_L de dominio puede tener una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente tal como se establece en el presente documento.

25 [0060] Un método análogo se puede emplear en el que uno o más variantes de la secuencia de un V_L dominio descrito en la presente se combinan con uno o más V_H dominios.

[0061] Un aspecto adicional de la invención proporciona un método de preparación de un fragmento de unión a antígeno que reacciona específicamente con GDF-8. El método comprende:

- 30 (A) proporcionar un repertorio a partir de los ácidos nucleicos que codifican un V_H de dominio que, o bien incluir una CDR3 que se sustituye o carecen de una región que codifica CDR3;
 (B) combinar el repertorio con un ácido nucleico donante que codifica una secuencia de aminoácidos sustancialmente como se establece en el presente documento para un V_H CDR3 (es decir, H3) de tal manera que el ácido nucleico donante se inserta en la región CDR3 en el repertorio para proporcionar un repertorio de productos de ácidos nucleicos que codifican una V_H de dominio;
 35 (C) expresar los ácidos nucleicos del repertorio de productos;
 (D) seleccionar un fragmento específico de unión a antígeno específico para GDF-8; y
 (E) recuperar el fragmento de unión al antígeno específico o ácido nucleico que lo codifica.

40 [0062] Una vez más, un método análogo se puede emplear en el que un V_L CDR3 (es decir, L3) de la invención se combina con un repertorio de ácidos nucleicos que codifican una V_L de dominio, que, o bien incluir una CDR3 que se sustituye o carecen de una región que codifica CDR3.

45 [0063] Una secuencia de codificación de CDR de la invención (por ejemplo, CDR3) puede introducirse en un repertorio de dominios variables que carecen de un CDR (por ejemplo, CDR3), usando tecnología de ADN recombinante. Por ejemplo, Marks et al. (Bio / Technology (1992) 10: 779-783) describen métodos para producir repertorios de dominios variables de anticuerpo en el que los cebadores consenso dirigidos a o adyacentes al extremo 5 de la zona de dominio variable se usan conjuntamente con cebadores consenso para la tercera marco región de V humanos H genes para proporcionar un repertorio de V_H dominios variables que carecen de una CDR3. El repertorio se puede combinar con una CDR3 de un anticuerpo particular. Usando técnicas análogas, las secuencias derivadas de CDR3 de la presente invención pueden ser mezcladas con repertorios de V_H o V_L dominios que carecen de una CDR3, y los V completos barajados H o V_L dominios combinan con un cognado V_L V o H de dominio a proporcionar fragmentos específicos de unión a antígeno de la invención. El repertorio puede entonces ser representada en un sistema huésped adecuado tal como el sistema de presentación de fagos de WO 92/01047 de modo que los fragmentos de unión a antígeno adecuados pueden ser seleccionados.
50

55 [0064] Una estructura análogo o técnicas combinatorias se describen también por Stemmer (Nature (1994) 370: 389-391), que describe la técnica en relación a un gen β-lactamasa, pero observa que el enfoque puede ser utilizado para la generación de anticuerpos.

60 [0065] Una alternativa adicional es generar innovadoras regiones V_H o V_L que llevan un secuencias derivadas de CDR de la invención usando mutagénesis aleatoria de uno o más seleccionados V_H y / o V_L genes para generar mutaciones dentro de todo el dominio variable. Tal técnica es descrita por Gram et al. (Proc Nat Acad Sci EE.UU. (1992) 89: 3.576 a 3580), que utilizó la PCR propensa a errores.

[0066] Otro método que puede usarse es dirigir la mutagénesis a regiones CDR de V H o V L genes. Tales técnicas se describen en Barbas y colaboradores. (Proc Nat Acad Sci EE.UU. (1994) 91:.... 3.809-3.813) y Schier y colaboradores. (J. Mol Biol (1996) 263: 551-567).

5 **[0067]** Del mismo modo, una o más, o los tres CDRs pueden injertarse en un repertorio de V H o V L dominios que luego se proyectó para una pareja de unión específica o fragmentos de unión específicos para GDF-8.

10 **[0068]** Una parte sustancial de un dominio variable de inmunoglobulina comprenderá al menos las regiones CDR y, opcionalmente, sus regiones estructurales intermedios de la SCF V fragmentos que figuran en este documento. La porción también incluirá al menos aproximadamente 50% de uno o ambos de FR1 y FR4, el 50% siendo el C-terminal de 50% de FR1 y el N-terminal de 50% de FR4. Residuos adicionales en el extremo N-terminal o C-terminal de la parte sustancial del dominio variable pueden ser aquellos no asociado normalmente con regiones de origen natural del dominio variable. Por ejemplo, la construcción de fragmentos específicos de unión a antígeno de la presente invención realizada mediante técnicas de ADN recombinante puede resultar en la introducción de N- o
15 residuos C-terminal codificados por enlazadores introducidos para facilitar la clonación u otras etapas de manipulación. Otras etapas de manipulación incluyen la introducción de enlazadores para unir dominios variables de la invención a otras secuencias de proteínas, incluyendo cadenas pesadas de inmunoglobulina, otros dominios variables (por ejemplo, en la producción de diacuerpos) o etiquetas de proteínas como se discute en más detalles a continuación.

20 **[0069]** Aunque las realizaciones ilustradas en los Ejemplos comprenden un "juego" par de V H y V L dominios, la invención también abarca fragmentos que contienen un único dominio variable derivada de V ya sea vinculante H o V L de dominio secuencias, especialmente V H dominios. En el caso de cualquiera de los dominios de unión específicos de cadena sencilla, estos dominios pueden ser utilizados para la detección de dominios complementarios capaces de formar un dominio de unión al antígeno específico de dos dominios capaz de unirse a GDF-8. Esto se puede lograr por métodos de cribado de presentación en fagos utilizando el denominado enfoque combinatorio dual jerárquico como se describe en el documento WO 92/01047 en la que una colonia individual que contiene ya sea un H o de la cadena L clon se utilizó para infectar una biblioteca completa de clones que codifica la otra se selecciona cadena (L o H) y el dominio de unión al antígeno específico de dos cadenas resultante de acuerdo con las técnicas de presentación en fagos tales como las descritas en esa referencia. Esta técnica también se describe en Marks et al., *Supra*.

25 **[0070]** Los anticuerpos pueden ser conjugados por métodos químicos con radionucleidos, fármacos, macromoléculas, u otros agentes o pueden prepararse como proteínas de fusión que comprenden una o más CDR de la invención.
35

[0071] Una proteína de fusión anticuerpo contiene un V H -V L par donde una de estas cadenas (por lo general V H) y otra proteína se sintetizan como una sola cadena polipeptídica. Estos tipos de productos difieren de anticuerpos en que por lo general tienen un elemento funcional adicional; la fracción activa de una molécula pequeña o la característica estructural molecular principal de la macromolécula conjugado o fusionado.
40

[0072] Además de los cambios en la secuencia de aminoácidos descrito anteriormente, los anticuerpos pueden ser glicosilados, pegilados, o unidos a la albúmina o un polímero no proteico. Por ejemplo, los anticuerpos descritos en la presente pueden estar unidos a uno de una variedad de polímeros no proteicos, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol, o polioxialquilenos, de la manera expuesta en la patente US. Nos. 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192; o 4.179.337. Los anticuerpos se modifican químicamente por conjugación covalente a un polímero para aumentar su vida media en circulación, por ejemplo. Ejemplos de polímeros, y los métodos para la fijación a péptidos también se muestran en la Patente de Estados Unidos. Nos. 4.766.106; 4.179.337; 4.495.285; y 4.609.546.
45
50

[0073] En otras realizaciones, el anticuerpo puede ser modificado para tener un patrón de glicosilación alterado (es decir, alterado a partir del patrón de glicosilación original o nativo). Como se usa aquí, "alterado" significa que tiene uno o más restos de hidratos de carbono eliminados, y / o que tienen uno o más sitios de glicosilación añadidos a anticuerpo original. La adición de sitios de glicosilación a los anticuerpos descritos en la presente conseguirse alterando la secuencia de aminoácidos para contener secuencias de consenso del sitio de glicosilación son bien conocidos en la técnica. Otro medio de aumentar el número de grupos carbohidrato en los anticuerpos es mediante acoplamiento químico o enzimático de glicósidos a los residuos de aminoácidos del anticuerpo. Estos métodos se describen en el documento WO 87/05330, y en Aplin y Wriston (1981) *CRC Crit. Rev. Biochem.*, 22: 259-306. La eliminación de cualquier resto carbohidrato presentes en los anticuerpos puede conseguirse química o enzimáticamente como se describe por Hakimuddin et al. (1987) *Arch. Biochem. Biophys.*, 259: 52; y Edge et al. (1981) *Anal. Biochem.*, 118: 131 y por Thotakura et al. (1987) *Meth. Enzymol.*, 138: 350.
55
60

[0074] Los anticuerpos de la invención también se pueden etiquetar con una etiqueta detectable o funcional. Los marcadores detectables incluyen radiomarcadores tales como ¹³¹I o ⁹⁹Tc, que pueden asociarse a los anticuerpos de la invención utilizando la química convencional conocida en la técnica. Las etiquetas también incluyen etiquetas
65

de enzimas tales como peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina. Las etiquetas incluyen además restos químicos tales como biotina, que pueden detectarse mediante la unión a un resto detectable cognado específico, por ejemplo, avidina marcada.

5 **[0075]** Los anticuerpos, en la que las secuencias de CDR difieren sólo insustancialmente de los expuestos en la SEQ ID NO: n, donde n es 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40,
10 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, o 48, se incluyen dentro del alcance de esta invención. Diferencias no sustanciales incluyen cambios de aminoácidos de menor importancia, tales sustituciones de 1 o 2 de los 5 aminoácidos en la
15 secuencia de un CDR. Típicamente, un aminoácido es sustituido por un aminoácido relacionado que tenga carga similar, hidrófobo, o las características estereoquímicas. Dichas sustituciones serían dentro de las habilidades
20 ordinarias de un artesano. A diferencia de CDRs, los cambios más sustanciales en regiones de marco de estructura (FR) se pueden hacer sin afectar adversamente las propiedades de unión de un anticuerpo. Los cambios en las FR
25 incluyen, pero no se limitan a, la humanización de un marco no humana derivada o de ingeniería ciertos restos de marco que son importantes para el contacto con el antígeno o para estabilizar el sitio de unión, por ejemplo, el
30 cambio de la clase o subclase de la región constante, cambiando específica residuos de aminoácidos que podrían alterar una función efectora tal como unión al receptor Fc (Lund et al (1991) J. Immun 147:.. 2657 a 2662 y Morgan
35 et al (1995) Immunology 86:.. 319-324), o cambiando el especie de la que se deriva la región constante. Los anticuerpos pueden tener mutaciones en el C H región 2 de la cadena pesada que reducen o alteran la función
40 efectora, por ejemplo, unión al receptor Fc y la activación del complemento. Por ejemplo, los anticuerpos pueden tener mutaciones tales como los descritos en la patente US. Nos. 5.624.821 y 5.648.260. En la IgG 1 o IgG 2 de la
45 cadena pesada, por ejemplo, tales mutaciones se pueden hacer en los residuos de aminoácidos 117 y 120 de la SEQ ID NO: 53, que representa la porción Fc de IgG 1 (estos residuos corresponden a los aminoácidos 234 y 237
50 en la secuencia de longitud completa de IgG 1 o IgG 2). Los anticuerpos también pueden tener mutaciones que estabilizan el enlace disulfuro entre las dos cadenas pesadas de una inmunoglobulina, tales como mutaciones en la
55 región bisagra de IgG 4, como se describe en Angal et al. (1993) Mol. Immunol. 30: 105-108.

D. Ácidos Nucleicos, Clonación y Expresión de Sistemas

30 **[0076]** La presente invención proporciona además un ácido nucleico aislado que codifica los anticuerpos o fragmentos de unión de la presente invención. El ácido nucleico de acuerdo con la presente invención puede comprender ADN o ARN y puede ser total o parcialmente sintético. La referencia a una secuencia de nucleótidos como la expuesta en este documento abarca una molécula de ADN con la secuencia especificada, y abarca una molécula de ARN con la secuencia especificada en la que U es sustituida por T, a menos que el contexto requiera lo contrario.

35 **[0077]** El ácido nucleico de la invención comprende una secuencia codificante de un CDR o V H o V L dominio de la invención tal como se expone en el presente documento.

40 **[0078]** La presente invención también proporciona construcciones en forma de plásmidos, vectores, la transcripción o casetes de expresión que comprenden al menos un ácido nucleico de la invención como anteriormente.

45 **[0079]** La presente invención también proporciona una célula huésped, que comprende una o más construcciones como anteriormente. Un ácido nucleico que codifica cualquier CDR (H1, H2, H3, L1, L2, o L3), V H o V L de dominio, o fragmento de unión a antígeno específica prevista en el presente documento constituye un aspecto de la presente invención, al igual que un método de la producción del producto codificado. El método comprende la expresión del ácido nucleico que codifica. La expresión puede lograrse mediante el cultivo en condiciones apropiadas células huésped recombinantes que contienen el ácido nucleico. Después de la producción mediante la expresión de una V H o V L de dominio, o fragmento de unión a antígeno específica pueden aislarse y / o purificarse usando cualquier técnica adecuada, a continuación, se utiliza según sea apropiada.

50 **[0080]** Fragmentos específicos de unión a antígeno, V H y / o V L dominios, y que codifican moléculas de ácido nucleico y vectores de acuerdo con la presente invención pueden proporcionarse aislados y / o purificado, por ejemplo, de su ambiente natural, en forma sustancialmente pura u homogénea, o, en el caso del ácido nucleico, libre o sustancialmente libre de ácido nucleico o genes de origen distintos de la secuencia que codifica un polipéptido con la función requerida.

55 **[0081]** Los sistemas para la clonación y expresión de un polipéptido en una variedad de diferentes células huésped son bien conocidos. Las células huésped adecuadas incluyen bacterias, células de mamífero, y levadura y sistemas de baculovirus. Líneas celulares de mamífero disponibles en la técnica para la expresión de un polipéptido heterólogo incluyen células de ovario de hámster chino, células HeLa, potros de riñón de cría de hámster, células de melanoma de ratón NS0 y muchos otros. Un huésped bacteriana común es E. coli . Para las células adecuadas para la producción de anticuerpos, consulte Sistemas de Gene Expression, eds. Fernandez et al., Academic Press, 1999. Cualquier celular compatible con la presente invención se puede usar para producir los anticuerpos descritos en la presente.

65

[0082] Los vectores adecuados se pueden elegir o construir, conteniendo secuencias reguladoras apropiadas, incluyendo secuencias promotoras, secuencias terminadoras, secuencias de poliadenilación, secuencias potenciadoras, genes marcadores y otras secuencias según sea apropiado. Los vectores pueden ser plásmidos o virales, por ejemplo, fago, o fagémido, según proceda. Para más detalles véase, por ejemplo, Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 2ª ed., Sambrook et al, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. Muchas técnicas y protocolos conocidos para la manipulación de ácido nucleico, por ejemplo, en la preparación de nucleico. Construcciones de ácido, mutagénesis, secuenciación, introducción de ADN en células y expresión génica, y análisis de proteínas, se describen en detalle en Current Protocols in Molecular Biology, segunda ed., Ausubel et al. Eds., John Wiley & Sons, 1992.

[0083] Por lo tanto, un aspecto adicional de la presente invención proporciona una célula huésped que comprende el ácido nucleico como se describe aquí. Un aspecto adicional proporciona un método que comprende introducir dicho ácido nucleico en una célula huésped. La introducción puede emplear cualquier técnica disponible. Para las células eucariotas, las técnicas adecuadas pueden incluir transfección con fosfato de calcio, DEAE-dextrano, electroporación, transfección mediada por liposomas y transducción usando retrovirus u otros virus, por ejemplo, vaccinia o, para células de insectos, baculovirus. Para las células bacterianas, las técnicas adecuadas pueden incluir transformación con cloruro de calcio, electroporación y transfección usando bacteriófagos.

[0084] La introducción puede ser seguida causando o permitiendo la expresión a partir del ácido nucleico, por ejemplo, mediante el cultivo de células huésped en condiciones para la expresión del gen.

Depósitos Biológicos E.

[0085] E. coli cultivos transformados de forma individual con la codificación pCANTAB6 vector fagémido nongerminal de scFv Myo29, Myo28 o Myo22 fueron depositados el 2 de octubre de 2002 en American Tissue Culture Collection (ATCC) bajo respectivos números de depósito PTA-4741, PTA-4740, y PTA-4739. La dirección de la depositaria es 10801 University Blvd, Manassas, Va. 20110, EE.UU.

II. Métodos de Tratamiento de la Enfermedad y Otros Usos

[0086] 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, o una proteína relacionada. Lo más preferiblemente, los anticuerpos inhiben o reducen una o más de las actividades de GDF-8 en relación con el GDF-8 que no está unida por un anticuerpo. En ciertas realizaciones, la actividad de GDF-8, cuando se une por uno o más de los anticuerpos descritos en la presente, se inhibe al menos 50%, preferiblemente al menos 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 72, 76, 78, 80, 82, 84, 86, o 88%, más preferiblemente al menos 90, 91, 92, 93, o 94%, e incluso más preferiblemente al menos 95% a 100% con respecto a una proteína madura de GDF-8 que no está unida por uno o más de los anticuerpos descritos en la presente. La inhibición de la actividad de GDF-8 se puede medir en pGL3 (CAGA) 12 ensayos de gen reportero (RGA) como se describe en Thies et al. (factores de crecimiento (2001) 18: 251-259) y como se ilustra en los Ejemplos 2 y 9, o en ensayos de receptores de ActRIIB como se ilustra en los Ejemplos 3 y 6.

[0087] El trastorno médico que se diagnostica, trata o impide por los anticuerpos descritos en esta memoria es un músculo o un trastorno neuromuscular; un trastorno de tejido adiposo tal como obesidad; la diabetes tipo 2; intolerancia a la glucosa; síndromes metabólicos (por ejemplo, síndrome X); resistencia a la insulina inducida por trauma tales como quemaduras o desequilibrio de nitrógeno; o enfermedad degenerativa ósea tales como osteoporosis.

[0088] Otros trastornos médicos están diagnosticando, tratadas o prevenidas por los anticuerpos descritos en la presente son los trastornos asociados con la pérdida de hueso, que incluyen la osteoporosis, especialmente en las mujeres de edad avanzada y/o posmenopáusicas, la osteoporosis inducida por glucocorticoides, la osteopenia, la osteoartritis, y con la osteoporosis fracturas relacionadas. Otro objetivo enfermedades óseas metabólicas y trastornos incluyen una baja masa ósea debido a la terapia crónica con glucocorticoides, insuficiencia gonadal prematura, la supresión androgénica, deficiencia de vitamina D, hiperparatiroidismo secundario, deficiencias nutricionales, y anorexia nerviosa. Los anticuerpos se utilizan preferentemente para prevenir, diagnosticar, o tratar dichos trastornos médicos en mamíferos, especialmente, en los seres humanos.

[0089] Los anticuerpos o composiciones de anticuerpos de la presente invención se administran en cantidades terapéuticamente eficaces. Generalmente, una cantidad terapéuticamente eficaz puede variar con la edad del sujeto, condición, y sexo, así como la gravedad de la condición médica en el sujeto. La dosificación se puede determinar por un médico y ajustar, según sea necesario, para adaptarse a los efectos observados del tratamiento. La toxicidad y la eficacia terapéutica de dichos compuestos se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar el LD 50 (la dosis letal para el 50% de la población) y la ED 50 (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población). La relación de

dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación LD 50/ED 50. Se prefieren los anticuerpos que exhiben índices terapéuticos grandes.

5 **[0090]** Los datos obtenidos a partir de ensayos de cultivo celular y estudios en animales pueden usarse para formular un intervalo de dosificación para uso en seres humanos. La dosificación de dichos compuestos se encuentra preferentemente dentro de una gama de concentraciones que incluye la ED de circulación 50 con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. Para cualquier anticuerpo utilizado en la presente invención, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Una dosis puede formularse en modelos animales para conseguir un intervalo de concentración de plasma circulante que incluye la IC 50 (es decir, la concentración del anticuerpo de prueba que logra una inhibición media-máxima de los síntomas) según se determina en cultivo celular. Los niveles en plasma se pueden medir, por ejemplo, por cromatografía líquida de alta resolución. Los efectos de cualquier dosificación particular se pueden monitorizar mediante un bioensayo adecuado. Ejemplos de bioensayos adecuados incluyen ensayos de replicación de ADN, ensayos basados en la transcripción, GDF-8 / proteína ensayos de unión del receptor, ensayos de creatina quinasa, ensayos basados en la diferenciación de pre-adipocitos, ensayos basados en la captación de glucosa en adipocitos, y ensayos inmunológicos.

20 **[0091]** Generalmente, las composiciones se administran de modo que los anticuerpos o sus fragmentos de unión se dan a una dosis de 1 g / kg y 150 mg / kg, 1 g / kg y 100 mg / kg, 1 mg / kg a 50 mg / kg, 1 mg / kg a 20 mg / kg, 1 mg / kg a 10 mg / kg, 1 mg / kg a 1 mg / kg, 10 mg / kg a 1 mg / kg, 10 mg / kg a 100 mg / kg, 100 g hasta 1 mg / kg, y 500 g / kg a 1 mg / kg. Preferiblemente, los anticuerpos se dan como una dosis en bolo, para maximizar los niveles circulantes de anticuerpos para el mayor período de tiempo después de la dosis. La infusión continua también se puede utilizar después la dosis en bolo.

25 **[0092]** Los métodos de tratar, diagnosticar, o prevenir las afecciones médicas anteriores con los anticuerpos descritos en la presente también se pueden utilizar en otras proteínas en la superfamilia de TGF- β . Muchas de estas proteínas están relacionadas en estructura a GDF-8, tal como BMP-11. En consecuencia, otra forma de realización proporciona métodos de tratamiento de los trastornos mencionados anteriormente mediante la administración a un sujeto un anticuerpo capaz de inhibir la BMP-11 o activina, ya sea solo o en combinación con otros inhibidores de TGF- β , tal como un anticuerpo neutralizante contra GDF-8. Los anticuerpos de la invención también pueden usarse para tratar una enfermedad o condición asociada con o mediada por BMP-11. Véase, por ejemplo, US Pat. Nos. 5.639.638 y 6.437.111.

35 **[0093]** Los anticuerpos de la presente invención pueden usarse para detectar la presencia de proteínas que pertenecen a la superfamilia de TGF- β , tales como BMP-11 y GDF-8, in vivo o in vitro. Al correlacionar la presencia o nivel de estas proteínas con una afección médica, un experto en la técnica puede diagnosticar la condición médica asociada. Las condiciones médicas que pueden ser diagnosticadas por los anticuerpos descritos en la presente se establecen anteriormente.

40 **[0094]** Tales métodos de detección son bien conocidos en la técnica e incluyen ELISA, radioinmunoensayo, inmunotransferencia, Western blot, inmunofluorescencia, inmunoprecipitación, y otras técnicas comparables. Los anticuerpos pueden además ser proporcionados en un kit de diagnóstico que incorpora una o más de estas técnicas para detectar una proteína (por ejemplo, GDF-8). Dicho kit puede contener otros componentes, embalaje, instrucciones, u otro material para ayudar a la detección de la proteína y el uso del kit.

45 **[0095]** Cuando los anticuerpos están destinados para fines de diagnóstico, puede ser deseable modificarlos, por ejemplo, con un grupo ligando (tal como biotina) o un grupo marcador detectable (tal como un grupo fluorescente, un radioisótopo o una enzima). Si se desea, los anticuerpos (ya sean policlonales o monoclonales) se pueden marcar usando técnicas convencionales. Los marcadores adecuados incluyen fluoróforos, cromóforos, átomos radiactivos, reactivos densos en electrones, enzimas, y ligandos que tienen parejas de unión específicas. Las enzimas se detectan normalmente por su actividad. Por ejemplo, peroxidasa de rábano picante se puede detectar por su capacidad para convertir tetrametilbencidina (TMB) en un pigmento azul, cuantificable con un espectrofotómetro. Otros marcadores adecuados pueden incluir biotina y avidina o estreptavidina, IgG y proteína A, y las numerosas parejas de receptor-ligando conocidos en la técnica. Otras permutaciones y posibilidades serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica, y se consideran como equivalentes dentro del alcance de la presente invención.

50 **[0096]** Aún otro aspecto de la invención proporciona un método de identificación de agentes terapéuticos útiles en el tratamiento de trastornos musculares y óseos. Ensayos apropiados de selección, por ejemplo, ensayos basados en ELISA, se conocen en la técnica. En tal ensayo de detección, una primera mezcla de enlace se forma combinando un anticuerpo de la invención y un ligando, por ejemplo, GDF-8, BMP-11, activina; y la cantidad de unión entre el ligando y el anticuerpo en la primera mezcla de enlace (M 0 se mide). Una segunda mezcla de enlace también se forma combinando el anticuerpo, el ligando, y un compuesto o agente a cribar, y la cantidad de unión entre el ligando y el anticuerpo en la segunda mezcla de unión (M 1 se mide). Las cantidades de unión en la primera y segunda mezclas de unión se comparan entonces, por ejemplo, mediante el cálculo de la M 1 / M 0 ratio. El compuesto o

65

agente se considera que es capaz de inhibir la actividad de GDF-8 si se observa una disminución en la unión en la segunda mezcla de unión en comparación con la primera mezcla de unión. La formulación y optimización de mezclas de enlace está dentro del nivel de habilidad en la técnica, tales mezclas de unión también puede contener tampones y sales necesarias para mejorar o para optimizar la unión, y los ensayos de control adicionales pueden ser incluidos en el ensayo de cribado de la invención.

[0097] Los compuestos encontrados para reducir el anticuerpo-ligando de unión en al menos aproximadamente 10% (es decir, $M1/M0 < 0,9$), preferiblemente mayor que aproximadamente 30%, por lo que se puede identificar y luego, si se desea, en segundo lugar examinados para la capacidad de inhibir la actividad de GDF-8 en otros ensayos tales como el ensayo de unión a ActRIIB (Ejemplo 2), y otros ensayos *in vivo* basados en células y en cómo se describe en los Ejemplos 13, 15 y 16.

III. Composiciones farmacéuticas y métodos de administración

[0098] La presente invención proporciona composiciones que comprenden los anticuerpos descritos en la presente. Tales composiciones pueden ser adecuadas para uso farmacéutico y administración a los pacientes. Las composiciones comprenden típicamente uno o más anticuerpos de la presente invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable. Como se usa aquí, la frase "excipiente farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes retardantes de la isotónicos y de absorción, y similares, que son compatibles con la administración farmacéutica. 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 mejoradas. Las composiciones farmacéuticas también pueden incluirse en un recipiente, paquete, o dispensador junto con instrucciones para la administración.

[0099] Una composición farmacéutica de la invención se formula para ser compatible con su vía de administración prevista. Métodos para llevar a cabo la administración son conocidos por los de experiencia ordinaria en la técnica. También puede ser posible obtener composiciones que pueden administrarse por vía tópica o por vía oral, o que puedan ser capaces de transmisión a través de las membranas mucosas. La administración puede, por ejemplo, ser intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intracavitaria, subcutánea o transdérmica.

[0100] Las soluciones o suspensiones utilizadas para aplicación intradérmica o subcutánea incluyen típicamente uno o más de los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o parabenos de metilo; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes tales como ácido etilendiaminotetraacético quelante; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos; y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. Tales preparaciones se pueden encerrar en ampollas, jeringas desechables o viales de múltiples dosis hechos de vidrio o plástico.

[0101] 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 la administración intravenosa, los vehículos adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ) o tampón fosfato salino (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una fácil inyectabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe preservarse contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, por el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y por el uso de tensioactivos. Prevención de la acción de microorganismos puede lograrse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, y cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede provocarse incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

[0102] Las composiciones orales generalmente incluyen un diluyente inerte o un vehículo comestible. Se pueden encerrar en cápsulas de gelatina o comprimirse en tabletas. Para el propósito de la administración terapéutica oral, los anticuerpos pueden ser incorporados con excipientes y usarse en forma de comprimidos o cápsulas. Agentes de unión farmacéuticamente compatibles, y/o materiales adyuvantes pueden incluirse como parte de la composición. Los comprimidos, píldoras, cápsulas y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes o compuestos de naturaleza similar; un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa; un agente desintegrante tal como ácido alginico, Primogel™, o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o Sterotes™ un deslizante tal como dióxido de silicio coloidal;

un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente aromatizante tal como menta, salicilato de metilo o aroma de naranja.

5 [0103] Para la administración por inhalación, los anticuerpos se entregan en forma de un spray aerosol desde un recipiente o dispensador presurizado, que contiene un propelente adecuado, por ejemplo, un gas tal como dióxido de carbono, o un nebulizador.

10 [0104] La administración sistémica también puede ser por vía transmucosa o transdérmica. Por ejemplo, en el caso de los anticuerpos que comprenden la porción Fc, las composiciones pueden ser capaces de transmisión a través de las membranas mucosas (por ejemplo, intestino, boca, o pulmones) vía la ruta mediada por el receptor FcRn (US Pat. No. 6, 030,613). La administración transmucosa se puede lograr, por ejemplo, mediante el uso de pastillas, aerosoles nasales, inhaladores, o supositorios. Para la administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en pomadas, ungüentos, geles, o cremas como se conoce generalmente en la técnica. Para transmucosal o transdérmica, penetrantes apropiados para la barrera a ser permeada se utilizan en la formulación. Tales penetrantes son generalmente conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, detergentes, sales biliares y derivados de ácido fusídico.

20 [0105] Los anticuerpos revelados en la actualidad se pueden preparar con vehículos que protegerán el compuesto contra la eliminación rápida del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de suministro microencapsulados. Polímeros biodegradables, biocompatibles se pueden utilizar, tales como etileno vinil acetato, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Los métodos para la preparación de tales formulaciones serán evidentes para los expertos en la técnica. Las suspensiones liposomales que contienen los anticuerpos descritos en la presente también se pueden utilizar como vehículos farmacéuticamente aceptables. Estos se pueden preparar de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, como se describe en la patente US. No. 4.522.811.

30 [0106] Puede ser ventajoso formular composiciones orales o parenterales en forma de unidad de dosificación para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. La forma unitaria de dosificación como se usa aquí, se refiere a unidades físicamente discretas 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 unitarias de dosificación de la invención están dictadas por y dependen directamente de las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular a conseguir, y las limitaciones inherentes en la técnica de formular tal compuesto activo para el tratamiento de los individuos.

35 [0107] Los siguientes ejemplos proporcionan realizaciones ilustrativas de la invención.

EJEMPLOS

40 Ejemplo 1: Purificación de GDF-8

45 [0108] El medio condicionado de una línea celular seleccionada que expresa la proteína recombinante humana de GDF-8 (madura GDF-8 y GDF-8 propéptido) se acidificó a pH 6,5 y se aplicaron a una 50 mm columna de intercambio aniónico POROS 80 HQ × TM en tándem para un 80 × columna de 50 mm POROS TM SP de intercambio catiónico (PerSeptive Biosystems, Foster City, Calif.). El flujo a través se ajustó a pH 5,0 y se aplicó a una columna de intercambio catiónico 75 × 20 mm POROS TM SP (PerSeptive Biosystems) y se eluyó con un gradiente de NaCl. Las fracciones que contienen el GDF-8 complejo latente, como se confirmó por SDS-PAGE, se agruparon, se acidificó con ácido trifluoroacético (TFA) a pH 2-3, después se llevó hasta 200 ml con 0,1% de TFA para bajar la viscosidad. La piscina entonces se aplicó a un 250 × 21,2 mm C 5 columna (Phenomenex, Torrance, Calif.) precedida por una columna de guarda 60 × 21,2 mm (Phenomenex) y se eluyó con un gradiente TFA / acetonitrilo, para separar madurar GDF-8 de GDF-8 propéptido. Se añadieron fracciones reunidas que contienen madura de GDF-8 se concentraron por liofilización para eliminar el acetonitrilo y 20 ml de TFA al 0,1%. La muestra se aplicó a un 250 mm × 10 C 5 columna (Phenomenex) calentada a 60 ° C para ayudar a la separación. Esto se repitió hasta que ya no pudo lograrse una separación adicional. Las fracciones que contenían GDF-8 maduro se reunieron y se llevó a continuación hasta 40% de acetonitrilo y se aplicó a una BioSep TM S-3000 columna de 600 × 21,2 de exclusión por tamaño (Phenomenex) precedida por una columna de 60 × 21,2 guardia. Las fracciones que contenían purificados madura GDF-8 se reunieron y se concentra para su uso en experimentos posteriores.

60 [0109] En la página de SDS, maduro purificado GDF-8 migró como una banda ancha a 25 kDa en condiciones no reductoras y 13 kDa bajo condiciones reductoras. Un perfil de SDS-PAGE similar ha sido reportado para murino GDF-8 por McPherron et al. (Proc Nat Acad Sci EE.UU. (1997) 94: 12457-12461) y refleja la naturaleza dimerica de la proteína madura. La activa madura de BMP-11 dímero se purificó a partir de medio condicionado de una línea celular que expresa BMP-11 humana recombinante de una manera similar.

[0110] Activa madura de BMP-11 se purificó a partir de medio condicionado de una línea celular humana que expresa GDF-8 propéptido / proteína quimérica madura de BMP-11 recombinante. El medio condicionado se cargó en una columna de 10 ml TALON™ (Clonotech, Palo Alto, Calif.) En 50 mM Tris pH 8,0, NaCl 1 M a 1 ml / min. La proteína unida se eluyó con un mM Tris 50 pH 8,0, NaCl 1 M, imidazol 500 mM. Las fracciones reunidas que contienen el GDF-8 propéptido / BMP-11 complejo latente se acidificó con TFA al 10% a un pH de 3. A continuación, la piscina se aplicó a una columna de 4,6 mm x 250 Jupiter C4 (Phenomenex, Torrance, Calif.) Que estaba caliente a 60 ° C durante una mejor separación de BMP-11 madura y GDF-8 propéptido, y se eluyó con un gradiente TFA / acetonitrilo. Las fracciones reunidas que contienen proteína BMP-11 se concentraron por liofilización. En SDS-PAGE, purificada madura de BMP-11 migró a 25 kDa en condiciones no reductoras y en 12 kDa en condiciones reductoras.

Ejemplo 2: Actividad Biológica de Purificada Recombinante Humana GDF-8

[0111] Para demostrar la actividad de GDF-8, un ensayo de gen informador (RGA) se desarrolló utilizando un reportero pGL3 vector (CAGA) 12 luciferasa que expresa. La secuencia de CAGA se informó anteriormente a ser una secuencia sensible a TGF-β en el promotor del TGF-β inducida gen PAI-1 (Denner et al (1998) EMBO J., 17: 3091-3100).

[0112] Un reportero vector que contiene 12 cajas CAGA se realizó utilizando el plásmido informador de luciferasa pGL3 básico (Promega, Madison, Wis.). Se insertó el sitio de iniciación de la transcripción y la caja TATA del promotor posterior principal de adenovirus (-35 / + 10) entre los sitios BglII y HindIII., Oligonucleótidos que contienen 12 repeticiones de las cajas CAGA AGCCAGACA se hibridaron y se clonó en el sitio XhoI. La línea celular de rhabdomiosarcoma A204 humano (ATCC HTB-82) se transfectaron transitoriamente con pGL3 (CAGA) 12 usando FuGENE™ 6 reactivo de transfección (Boehringer Mannheim, Alemania). Después de la transfección, las células se cultivaron en placas de 48 pocillos en medio 5A de McCoy suplementado con glutamina 2 mM, 100 U / ml de estreptomycin, 100 g / ml de penicilina y 10% de suero de ternero fetal durante 16 horas. Las células fueron tratadas con o sin 10 ng / ml de GDF-8 en medios de McCoy 5A con glutamina, estreptomycin, penicilina, y 1 mg / ml de albúmina de suero bovino durante 6 horas a 37 ° C. La luciferasa se cuantificó en las células tratadas utilizando el Luciferase Assay System (Promega).

[0113] FIG. 4 muestra que GDF-8 máximamente activa la construcción informadora de 10 veces, con una DE50 de 10 ng / ml, lo que indica que GDF-8 recombinante purificado fue biológicamente activo. BMP-11 y activina provocó una respuesta biológica similar.

Ejemplo 3: Propiedades de Enlace de GDF- 8 Purificada en el Ensayo de Unión ActRIIB

[0114] El GDF-8 complejo latente fue biotinilado en una proporción de 20 moles de EZ-link sulfo-NHS-Biotina (Pierce, Rockford, Ill., Cat No. 21217). Para 1 mol del complejo GDF-8 durante 2 horas en hielo. La reacción se terminó por dejar caer el pH utilizando 0,5% de TFA y el complejo se sometió a cromatografía en una columna C 4 mm columna Jupiter 250 x 4,6 (Phenomenex) para separar madura de GDF-8 de GDF-8 propéptido. Biotinilada madura de GDF-8 fracciones eluidas con una TFA / CH 3 CN gradiente se agruparon, se concentraron y se cuantifica por la proteína MicroBCA™ Kit Reactivo de Ensayo (Pierce, Rockford, Ill., Cat. No. 23235).

[0115] Biotinilada madura de BMP-11 se preparó a partir BMP-11 complejo latente de la misma manera como se describió anteriormente. Recombinante ActRIIB-Fc quimera (R & D Systems, Minneapolis, Minn., Cat. No. 339-RB / CF) se aplicó sobre placas de 96 pocillos de ensayo de fondo plano (Costar, Nueva York, Cat. No. 3590) a 1 mg / ml en 0,2 M tampón de carbonato de sodio durante la noche a 4 ° C. Las placas se bloquearon entonces con 1 mg / ml de albúmina de suero bovino y se lavó siguiendo el protocolo estándar de ELISA. 100 ml de alícuotas de biotinilado GDF-8 o BMP-11 a diversas concentraciones se añadieron a la placa de ELISA bloqueada, se incubaron durante 1 hr, se lava, y la cantidad de límite GDF-8 o BMP-11 se detectó por peroxidasa de rábano picante (estreptavidina-SA-HRP, BD PharMingen, San Diego, Calif., Cat. No. 13047E), seguido por la adición de TMB (KPL, Gaithersburg, Md., Cat. No. 50-76-04). Mediciones colorimétricas se realizaron a 450 nm en un lector de microplacas Molecular Devices.

[0116] Como se muestra en FIG. 1, Biotinilado GDF-8 y BMP-11 unido a ActRIIB, el putativo GDF-8 receptor de tipo II con un ED 50 de 15 y 40 ng / ml; respectivamente, lo que indica que el ensayo de unión ActRIIB es un sensible en ensayo de unión in vitro para GDF-8 y BMP11.

Ejemplo 4: Aislamiento de Myo22 por Panorámica de scFv Bibliotecas de GDF-8

[0117] Una biblioteca de fagémido scFv, que es una versión ampliada del 1,38 x 10¹⁰ biblioteca descrito (Vaughan et al (1996) Nature Biotech., 14: 309-314), se utilizó para seleccionar anticuerpos específicos para GDF-8. Soluble proteína GDF-8 (a 10 mg / ml en tampón carbonato de sodio 50 mM, pH 9,6) se revistió sobre los pocillos de una placa de microtitulación durante la noche a 4 ° C. Los pocillos se lavaron en PBS y se bloquearon durante 2 horas a 37 ° C. en MPBS (3% Marvel™ leche desnatada en polvo en PBS). De fagos purificados (10 12 unidades de

transducción (UT)) en 100 l de MPBS al 3% se añadieron a los pocillos bloqueados y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Los pocillos se lavaron 10 veces con PBST (PBS que contiene 0,1% v / v de Tween TM 20), luego 10 veces con PBS. Partículas de fago unidas se eluyeron con 100 l de trietilamina 100 mM durante 10 minutos a temperatura ambiente, luego se neutralizaron inmediatamente con 50 l de 1 M Tris-HCl pH 7,4. El fago eluido se utilizó para infectar 10 ml de crecimiento exponencial E. coli TG1. Las células infectadas se cultivaron en caldo 2TY durante 30 minutos a 37 °C. estacionario, seguido de 30 minutos a 37 °C con aireación, luego sembró en placas 2TYAG y se incubaron durante la noche a 30 °C. Las colonias fueron raspadas de las placas a 10 ml 2TY caldo y el 15% de glicerol añadido para el almacenamiento a -70 °C.

5 [0118] Culturas glicerol del stock de la primera selección paneo ronda fueron superinfectaron con fago auxiliar y rescataron a dar scFv partículas de fagos de anticuerpos que expresan para la segunda ronda de selección. Un total de tres rondas de cribado se llevaron a cabo de esta manera.

15 **Ejemplo 5: Selección de Myo28 y Myo29 a partir de bibliotecas de scFv**

15 [0119] Selecciones solubles se llevaron a cabo utilizando la proteína biotinilada (bioGDF-8) GDF-8. Se utilizó BioGDF-8 a una concentración de 1 mg / ml. Una biblioteca de scFv, como se describe en el Ejemplo 4, se utilizó. Purificada scFv de fago (10 12 TU) en 100 l 3% MPBS fueron bloqueadas durante 30 minutos, después se añadió el antígeno biotinilado y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Los fagos / antígeno se añade a 50 l de perlas magnéticas de estreptavidina Dynal TM M280 que habían sido bloqueadas durante 1 hora a 37 ° C en 1 ml de MPBS al 3% y se incubaron durante otros 15 minutos a temperatura ambiente. Las perlas se capturaron con una gradilla magnética y se lavaron cuatro veces en 1 ml de MPBS al 3% con 0,1% (v / v) de Tween 20 TM seguido de tres lavados en PBS. Después del último lavado PBS, perlas se resuspendieron en 100 l de PBS y se usaron para infectar 5 ml crecimiento exponencial E. coli TG-1 células. Las células y los fagos se incubaron durante 1 hora a 37 ° C. (30 minutos estacionarios, 30 minutos con agitación a 250 rpm), y después se extendieron sobre placas 2TYAG. Las placas se incuban a 30 ° C durante la noche y las colonias visualizaron al día siguiente. Colonias de salida se rasparon de las placas y los fagos rescatados como se describe anteriormente. Una segunda ronda de selección soluble se llevó a cabo como se describe anteriormente.

30 **Ejemplo 6: ActRIIB Receptor Ensayo de Inhibición y de la Pantalla**

30 [0120] Colonias de salida, obtenidos como se describe en los Ejemplos 4 y 5, se recogieron en placas de 96 pocillos que contienen 100 l de 2TYAG. La producción de scFv se indujo por adición de IPTG 1 mM a cultivos creciendo exponencialmente e incubación durante la noche a 30 ° C. crudo scFv que contienen sobrenadantes de cultivo fueron seleccionados por su capacidad para inhibir la unión de bioGDF-8 a ActRIIB esencialmente como se describe en el Ejemplo 3. El ensayo se modificó ligeramente en que la unión de bioGDF-8 se detectó con estreptavidina marcado con europio y utilizando el kit de reactivos DELFIA TM (PerkinElmer Life Sciences, Boston, Mass.) en ensayos fluorométricos con resolución temporal (TRF). Los clones positivos, que muestra la inhibición de la señal de una mayor unión de clones irrelevantes, se recogieron y analizaron para confirmar la actividad.

40 [0121] ScFv purificado a partir de clones positivos identificados a partir de la pantalla de la inhibición del receptor se ensayó en el ensayo de inhibición como anteriormente. Una valoración de las concentraciones de scFv se utilizó para establecer la potencia clon medida por IC 50 valores en el ensayo. Los resultados de los experimentos se muestran en FIG. 2. Como se determinó en estos ensayos, IC 50 para scFv de de Myo29, Myo28, y Myo22 son 2,4 nM, 1,7 nM, y 60 nM, respectivamente. Por lo tanto, estos anticuerpos son potentes inhibidores de GDF-8 actividad.

45 **Ejemplo 7: Especificidad de Caracterización mediante ELISA de Fagos**

50 [0122] Para determinar la especificidad de los anticuerpos, un fago ELISA se realizó para los clones positivos de la pantalla de ActRIIB contra GDF-8 y proteínas no relacionadas. Individual E. coli colonias que contienen fagómidos se inocularon en placas de 96 pocillos que contienen medio 2TYAG 100 l por pocillo. El fago auxiliar M13K07 se añadió a una multiplicidad de infección (moi) de 10 a creciendo exponencialmente la cultura y las placas se incubaron 1 hora más a 37 ° C. Las placas se centrifugaron en una centrifuga de sobremesa a 2000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se retiró y los sedimentos celulares se resuspendieron en 100 l 2TYAK y se incubaron a 30 ° C durante la noche con agitación. Al día siguiente, las placas se centrifugaron a 2000 rpm durante 10 minutos y 100 l sobrenadante que contiene el fago de cada pocillo se transfirió a un placa de 96 fresco. Muestras de fagos se bloquearon en una concentración final de 3% MPBS durante 1 hora a temperatura ambiente, antes de ELISA.

60 [0123] GDF-8 o proteína irrelevante se recubrieron durante la noche a 4 ° C. en placas de microtitulación de 96 pocillos a 1 mg / ml. Después del recubrimiento, las soluciones se retiraron de los pocillos, y las placas se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente en MPBS 3%. Las placas se enjuagaron con PBS y luego 50 l de fago pre-bloqueado añadieron a cada pocillo. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora y después se lavaron con 3 cambios de PBST seguido de 3 cambios de PBS. A cada pocillo, 50 l de un 1: se añadió y las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora dilución 5000 de anti-M13-HRP (Pharmacia). Cada placa se lavó tres veces con PBST y luego 3 veces con PBS. Cincuenta microlitros de sustrato de TMB se añadieron

a cada pocillo y se incubaron hasta que el desarrollo de color. La reacción se detuvo mediante la adición de 25 l de 0,5 M H₂SO₄. La señal generada se midió por lectura de la absorbancia a 450 nm usando un lector de placa de microtitulación. La unión específica a GDF-8 se confirmó.

5 Ejemplo 8: Secuenciación de los scFv, la Conversión a IgG, y Germlining

10 [0124] Neutralizante scFv E. coli clones se sembraron en estrías sobre placas 2TYAG y se incubaron durante la noche a 30 ° C. colonias por triplicado a partir de estas placas fueron secuenciados utilizando pCANTAB6 secuencia del vector oligos para amplificar la V H y V L regiones del clon de scFv. Secuencias de ADN de los fragmentos scFv utilizados para hacer Myo29, Myo28, y Myo22 IgG de están representados por SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 1, respectivamente.

15 [0125] Regiones V de cadena pesada y ligera a partir de clones de scFv fueron amplificados utilizando PCR y cebadores específicos de clon. Los productos de PCR fueron digeridos con enzimas de restricción apropiadas y se subclonaron en vectores que contienen IgG humana 1 dominio constante de cadena pesada (por V H dominios) o vectores que contienen el dominio constante de cadena ligera lambda humana como apropiado (por V L dominios). La inserción correcta de dominios de la región V en plásmidos fue verificada por secuenciación del ADN del plásmido de individuo E. coli colonias. Los plásmidos se prepararon a partir de E. coli culturas mediante técnicas estándar y construcciones de cadena pesada y ligera co-transfectaron en células COS utilizando técnicas estándar. Secretada IgG se purificó usando Proteína A Sepharose (Pharmacia, Peapack, NJ) y se intercambió el tampón en PBS.

25 [0126] Se utilizaron los datos de secuencia para los clones de scFv para identificar la secuencia de la línea germinal más cercana para la cadena pesada y ligera de cada clon. Mutaciones apropiadas se hacen usando técnicas de mutagénesis estándar dirigida al sitio con los cebadores mutagénicos apropiados. La mutación de las secuencias de scFv se confirmó mediante análisis de secuencia. La línea germinal de scFv y V H y V L secuencias de dominio para Myo28 y Myo29 se exponen en la SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 25, respectivamente.

30 Ejemplo 9: Actividad Biológica de los Anticuerpos

[0127] FIG. 3^a muestra que la preincubación de Myo29 con GDF-8 biotinilado a 10 ng / ml inhibió GDF-8 unión a ActRIIB en el ensayo de unión a ActRIIB, como se describe en el Ejemplo 3, con una CI 50 de 0,2-0,4 nM. Del mismo modo en FIG. 3B, Myo29 inhibida biotinilado BMP-11 de unión a ActRIIB con el mismo IC 50.

35 [0128] Myo29 también bloqueó GDF-8 actividad en un bioensayo in vitro. A modo de ejemplo, cuando GDF-8 se preincubó con Myo29 durante 1 hora a temperatura ambiente, la actividad biológica de GDF-8 se redujo como se determina en ensayos de RGA realizó esencialmente como se describe en el Ejemplo 2. FIG. 4C muestra la inducción de pGL3 (CAGA) 12 reportero de la actividad en el servicio de urgencias 50 de GDF-8, 20 ng / ml, en presencia de Myo29. Myo29 redujo el GDF-8 de inducción de una manera sensible a la dosis, con un IC 50 de 15-30 ng / ml (0,1-0,2 nM). Myo29 también inhibió la actividad biológica de BMP-11 en la misma medida (FIG. 4B). En contraste, la actividad de activina en este ensayo no se vio afectada por Myo29 (FIG. 4D), Presumiblemente debido a la homología relativamente baja entre GDF-8 y la activina, en comparación con GDF-8 y BMP-11.

45 [0129] Myo22 y Myo28 también fueron probados en los ensayos de unión RGA y ActRIIB. Ambos anticuerpos bloquean GDF-8 y BMP-11 actividad. El IC 50 para Myo28, por ejemplo, es 0,2-0,35 nM.

Ejemplo 10: Mapeo de Epítomos para Myo22, Myo28 y Myo29

50 [0130] Con el fin de mapear el epítomo exacto de los anticuerpos, 48 péptidos solapantes de 13 residuos que representan toda la secuencia madura de GDF-8 se exponen en SEQ ID NO: 49 se sintetizaron directamente sobre papel de celulosa utilizando la técnica de la síntesis in situ (Molina et al. (1996) Peptide Research, 9: 151-155; Frank et al (1992) Tetrahedron, 48: desde 9217 hasta 9232).. La superposición de los péptidos era 11 aminoácidos. En esta matriz, los residuos de cisteína fueron reemplazados por serina con el fin de reducir las complicaciones químicas que son causados por la presencia de cisteínas. Membranas de celulosa modificada con polietilenglicol y aminoácidos protegidos con Fmoc se adquirieron de Abimed (Lagenfeld, Alemania). La matriz se definió en la membrana por acoplamiento de un β-alanina espaciador y péptidos se sintetizaron utilizando el estándar DIC (diisopropilcarbodiimida) / HOBt (hidroxibenzotriazol) química de acoplamiento como se describió previamente (Molina et al (1996) Peptide Research, 9: 151-155; Frank et al (1992) Tetrahedron, 48: 9217 a 9232).

60 [0131] Aminoácidos activados fueron vistos usando un robot de 222 Abimed ASP. Las etapas de lavado y desprotección se realizaron manualmente y los péptidos fueron acetilados 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 (solución salina TBST (Tris-tamponado con 0,1% (v / v) de Tween 20™) y 1% (w / v) de caseína) durante 10 minutos. La membrana se incubó con 2,5 mg / ml de un anticuerpo anti-GDF-8 en bloqueador durante 1 hora con agitación suave. Después de lavar con bloqueador de 3 veces durante 10 minutos, la membrana se incubó con el

anticuerpo secundario marcado con HRP (0,25 mg / ml en bloqueador) durante 30 minutos. La membrana se lavó tres veces durante 10 minutos cada uno con bloqueador y 2 veces durante 10 minutos cada vez con TBST. El anticuerpo unido se visualizó utilizando SuperSignal West™ reactivo (Pierce) y una cámara digital (Alphananotech Fluoromager). Los resultados se muestran en la FIG. 5. En particular, como se ve desde FIG. 5, El epítipo para Myo29 fue asignada entre los aminoácidos 72 y 88 de madura GDF-8. Myo22, por otra parte, reconoce un epítipo dentro de los primeros 44 aminoácidos N-terminales de la secuencia madura de GDF-8 (aminoácidos 1 a 44 de la SEQ ID NO: 49). Finalmente, el epítipo para Myo28 comprende los residuos situados dentro de los primeros 98 aminoácidos N-terminales de maduro GDF-8.

5 [0132] Con el fin de caracterizar adicionalmente el epítipo Myo29, los análisis de delección y de sustitución se realizaron utilizando la síntesis in situ. En el análisis de la sustitución, cada residuo de este péptido fue reemplazado individualmente con cada uno de los 20 aminoácidos naturales, excepto cisteína. Síntesis y ensayos de unión se realizaron como se ha descrito anteriormente. Los resultados se muestran en la FIG. 6, En el que la primera fila, primera dos columnas y tres últimas columnas representan los controles de péptidos de tipo salvaje. Los resultados demuestran que cuando Lys-78, Pro-81, y Asn-83 son cada uno mutado individualmente a otro aminoácido, la afinidad de unión de Myo29 al péptido se reduce significativamente. Por lo tanto, Myo29 reconoce una secuencia que comprende Lys-Xaa1-Xaa2-Xaa3-Pro-Asn (SEQ ID NO: 54), en la que Xaa1, Xaa2, Xaa3 y cada uno es cualquier aminoácido, o Xaa1 = Met, Xaa2 = Ser, y Xaa3 = Ile, independientemente uno de otro.

20 **Ejemplo 11: La inmuno-precipitación de GDF-8**

[0133] Con el fin de evaluar la unión de Myo29 y Myo28 para madurar GDF-8 y GDF-8 complejos, se llevó a cabo un estudio de inmunoprecipitación. Células CHO que expresan GDF-8 se marcaron con 35 S-metionina y 35 S-cisteína. 100 l medios condicionados a partir de estas células, que contienen GDF-8 proteínas (madurar GDF-8 y complejo latente) se incubó con 20 mg / ml Myo29 o Myo28 durante 1 hora a 4 ° C. Proteína A-Sepharose™ y se incubó durante la noche a 4 ° C. Se recogió el inmunoprecipitado, se resuspendieron en tampón de muestra reductor y se analizaron por SDS-PAGE. El gel se fijó, mejorado con solución de potenciador de la autorradiografía, se seca, y la autorradiografía se desarrolló. FIG. 7 muestra que tanto Myo29 y Myo28 pueden inmunoprecipitar madurar GDF-8, el GDF-8 complejo latente y sin procesar GDF-8. Ambos anticuerpos se unen a GDF-8 dímero en condiciones no reductoras tal como se determina por transferencia de Western.

Ejemplo 12: Farmacocinética

35 [0134] La farmacocinética (PK) de Myo29 se evaluó en C57B6 / SCID a una dosis de 1 mg / kg después de una sola (IV) o intraperitoneal administración (IP) por vía intravenosa. Los animales recibieron una mezcla de marcado y 125 Myo29 marcado con I a la dosis enumeradas anteriormente y las concentraciones en suero se determinaron sobre la base de 125 l radiactividad en el suero y la actividad específica de la dosis inyectada. FIG. 8 muestra un gráfico de la concentración sérica frente al tiempo para Myo29 administrado ya sea IV o IP.

40 [0135] Myo29 mostraron una semivida de eliminación prolongada de alrededor de una semana y liquidación baja alrededor de 1 ml / h / kg. Volumen inicial de distribución fue de alrededor de 83 ml / kg. El volumen aparente de distribución fue de aproximadamente 227 ml / kg. Myo29 alcanza una concentración pico en aproximadamente 6 horas después de la inyección. Fracción absorbida después de la inyección IP fue de un 77%.

45 **Ejemplo 13: Efecto *in vivo* de Myo29 en la Masa Muscular y Fuerza**

[0136] Con el fin de determinar si Myo29 bloques de GDF-8 actividad in vivo, Myo29 fue probado en ratones SCID adultos. Ratones SCID sufren de una deficiencia inmune combinada severa, y por lo tanto no generan una reacción inmunológica después de las inyecciones de anticuerpos humanos, tales como Myo29. La masa muscular se utilizó como indicador de la actividad de GDF-8 en ratones tratados con Myo29.

55 [0137] Ratones machos 057B6 SCID con ocho semanas de edad se pesaron y se distribuyen de manera uniforme con respecto al peso corporal en grupos de ocho. Myo29 en tampón PBS se inyectó en los ratones por vía intraperitoneal a diferentes dosis (60, 10, y 1 mg / kg) semanalmente. A dosis doble se le dio la primera semana. Vehículo (PBS) o tratados con los ratones no tratados se utilizaron como controles. Los tratamientos continuaron durante cuatro semanas. La masa muscular se evaluó mediante la disección y un peso de los gemelos y cuádriceps después del tratamiento. Después de cuatro semanas de tratamiento, la masa muscular se incrementó en todos los grupos tratados con Myo29, que van desde 10% a 23%, con los grupos tratados con las dosis más altas que alcanzan niveles significativos (FIG. 9, P <0,01).

60 [0138] En otro experimento, los ratones CB17 SCID hembra se trataron con Myo29 semanal a diversas dosis (10, 5, 2,5 y 1 mg / kg) durante 4 o 12 semanas. Una vez más, los tratamientos con Myo29 durante 4 semanas dio lugar a un aumento en gastrocnemio y cuádriceps peso que varía de 10% a 20% (Figs. 10A y 10B). El tratamiento a largo (12 semanas) dio lugar a un mayor aumento en la masa muscular (12% a 28%), con todos los grupos tratados con Myo29 alcanzan niveles estadísticamente significativos (Figs. 11A y 11B).

65

[0139] Con el fin de determinar si el aumento de la masa muscular conduce a músculos más fuertes, la fuerza muscular de las extremidades frontal se midió con un medidor de fuerza de agarre (modelo 1027 CSX, Columbus Instruments, Columbus, Ohio). Después de 12 semanas de tratamiento, la fuerza de las extremidades frente era 17% y 23% mayor en los ratones tratados con 5 mg / kg o 10 mg / kg de Myo29, respectivamente, en comparación con el control de vehículo ($p < 0,01$, FIG. 12). Los resultados de este estudio demuestran que Myo29 inhibe GDF-8 actividad in vivo dando como resultado aumentos significativos en la masa muscular y la fuerza muscular.

Ejemplo 14: Tratamiento de Trastornos Metabólicos

[0140] Los inhibidores de GDF-8, tal como, por ejemplo, anticuerpos inhibidores, son útiles para el tratamiento de trastornos metabólicos como la diabetes tipo 2, la tolerancia alterada a la glucosa, síndrome metabólico (por ejemplo, síndrome X), resistencia a la insulina inducida por trauma (por ejemplo, quemaduras o desequilibrio de nitrógeno), y el tejido adiposo trastornos (por ejemplo, obesidad). Los anti-GDF-8 anticuerpos de la invención se utilizan para tratar un tema en la aparición de enfermedades o tener una enfermedad metabólica establecida.

[0141] La eficacia de los anti-GDF-8 anticuerpos para el tratamiento de trastornos metabólicos, por ejemplo, diabetes tipo 2 y / o la obesidad, se confirma utilizando modelos murinos bien establecidos de la obesidad, resistencia a la insulina y la diabetes tipo 2, incluyendo ob / ob, db / db, y las cepas que llevan la mutación de color amarillo letal. Resistencia a la insulina también puede ser inducida por alto contenido de grasa o alto de alimentación calórico de ciertas cepas de ratones, incluyendo C57BL / 6J. De manera similar a los humanos, estos roedores desarrollan resistencia a la insulina, hiperinsulinemia, dislipidemia, y deterioro de la homeostasis de la glucosa lo que resulta en hiperglucemia. Evaluaciones de los resultados se basan en mediciones en suero de glucosa, insulina y lípidos. Las medidas de mejora de la sensibilidad a la insulina se pueden determinar por pruebas de tolerancia a la insulina y pruebas de tolerancia a la glucosa. Técnicas más sensibles incluirían el uso de abrazaderas-euglucémico hiperinsulinémico para evaluar las mejoras es el control glicémico y la sensibilidad a la insulina. Además, las técnicas de fijación permitirían una evaluación cuantitativa de la función de la glucosa importante disponer tejidos, (músculo, tejido adiposo, y el hígado), en la mejora del control glucémico.

[0142] En un estudio, el tratamiento con un anticuerpo anti-GDF-8 tales como Myo29 (inyección IP) o vehículo se lleva a cabo por una semana a seis meses. El protocolo de tratamiento puede variar, con la prueba de diferentes dosis y regímenes de tratamiento (por ejemplo, las inyecciones diarias, semanales o quincenales). Se prevé que los ratones tratados con el anticuerpo anti-GDF-8 tendrían mayor absorción de glucosa, aumento de la glucólisis y síntesis del glucógeno, ácidos grasos libres inferiores y triglicéridos en el suero en comparación con ratones que reciben tratamiento con placebo.

[0143] Los anticuerpos inhibidores contra GDF-8 también se utilizan para prevenir y / o para reducir la severidad y / o los síntomas de la enfermedad. Se prevé que los GDF-8-anticuerpos anti serían administrados como una inyección subcutánea tan frecuentemente como una vez por día y con tan poca frecuencia como una vez por mes. La duración del tratamiento podría oscilar entre un mes y varios años.

[0144] Para probar la eficacia clínica de anti-GDF-8 en los seres humanos, sujetos que sufren de o en riesgo de diabetes tipo 2 se identifican y se asignaron al azar a un grupo de tratamiento. Los grupos de tratamiento incluyen un grupo de placebo y uno a tres grupos que reciben anticuerpos (dosis diferentes). Los individuos son seguidos de forma prospectiva durante un mes a tres años para evaluar los cambios en el metabolismo de la glucosa. Se prevé que los individuos que reciben tratamiento exhibirían una mejora.

[0145] Los anticuerpos se administran como el compuesto activo solo o en combinación con otro compuesto o composición. Cuando se administra como el compuesto activo solo o en combinación con otro compuesto o composición, la dosificación es preferiblemente de aproximadamente 1 g / kg y 20 mg / kg, dependiendo de la severidad de los síntomas y la progresión de la enfermedad. La dosis efectiva apropiada se selecciona por un médico tratante de los siguientes rangos: 1 g / kg y 20 mg / kg, 1 mg / kg a 10 mg / kg, 1 mg / kg a 1 mg / kg, 10 g / kg y 1 mg / kg, 10 mg / kg a 100 mg / kg, 100 mg a 1 mg / kg y 500 mg / kg a 1 mg / kg. Regímenes de tratamiento ejemplares y los resultados se resumen en la Tabla 3.

TABLA 3: Ejemplos de Casos Clínicos

Paciente No.	Estado antes de tratamiento	Régimen tratamiento	Resultado
Paciente 1	No hay signos clínicos, antecedentes familiares de diabetes tipo 2	0,01-1 mg / kg cada 4 semanas por 48 semanas	Prevención diabetes de tipo 2
Paciente 2	Leve clínica signos de síndrome X	0,01-20 mg / kg por semana por más de 4 semanas	Mejor tolerancia de la insulina y glucosa metabolismo, y baja presión arterial
Paciente 3	Etapa avanzada de tipo 2 diabetes	0,01-20 mg / kg dos veces semana durante 6 o más semanas	Mejora de los signos clínicos, reducción en la severidad de los síntomas y / o aumentar el ratio de masa muscular /grasa corporal
Paciente 4	Resistencia insulina severa y / obesidad	0,01-20 mg / kg al día por 6 o más semanas	Mejora de los signos clínicos, reducción en la severidad de los síntomas y / o disminución de la grasa corporal

LISTADO DE SECUENCIA

5

[0146]

<110> Wyeth Cambridge Antibody Technology

<120> Anticuerpos neutralizantes contra GDF-8 Y USOS PARA ELLO

10

<130> 8702.020-304

<160> 54

<170> Versión patente 3.1

<210> 1

<211> 786

15

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

gagggtgcagc tgttgaggtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc      60
tccctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgcca tgagctgggt ccgccaggct      120
ccaggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggtg gtggtggtag cacatactac      180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat      240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtga gagaatgggg      300
ccctgtactg gtggaagctg ctacgacacc cttggcaact ggggccgggg caccctggtc      360
accgtctcga gtggaggcgg cggttcaggc ggaggtggct ctggcggtgg cggaagtgca      420
cagtctgtgc tgacgcagcc gccctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc      480
tccctgactg ggagcagctc caacatcggg gcaggttatg atgtactctg gtaccagcaa      540
cttccaggcg cggcccccac actcctcctc aggggtaatg gcaatcggcc ctgaggggtc      600
cctgaccgat tctctgtctc caagtctggc tactcagcct ccctggccat cactgggctg      660
cagcctgccg atgagggtgt ttattactgc cagtcctatg acagcagctc gagtggttcg      720
aagggtttcg gccaaaggac caagctgacc gtccctaggtg cggccgcaca tcatcatcac      780
catcac
    
```

catcac

<210> 2

20

<211> 262

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 535 872 T3

<400> 2

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 Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala 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

Glu Arg Met Gly Pro Cys Thr Gly Gly Ser Cys Tyr Asp Thr Leu Gly
 100 105 110

Asn Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
 115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Gln Ser Val Leu
 130 135 140

Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile
 145 150 155 160

Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp Val His
 165 170 175

Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Ala Ala Pro Lys Leu Leu Ile Arg Gly
 180 185 190

Asn Gly Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Val Ser Lys
 195 200 205

Ser Gly Tyr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln Pro Ala Asp
 210 215 220

Glu Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Ser
 225 230 235 240

Lys Val Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Ala Ala Ala
 245 250 255

His His His His His
 260

<210> 3

5 <211> 372

ES 2 535 872 T3

<212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 3
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcagc cctctggatt caccttttagc agctatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccaggaaggg ggctggagtg ggtctcagct attagtggtg gtggtggtag cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtga gagaatgggg 300
 ccctgtactg gtggaagctg ctacgacacc cttggcaact ggggccgggg caccctggtc 360
 accgtctcga gt 372

5 <210> 4
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 4
 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 Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala 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
 Glu Arg Met Gly Pro Cys Thr Gly Gly Ser Cys Tyr Asp Thr Leu Gly
 100 105 110
 Asn Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

10 <210> 5
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 5
 cagtctgtgc tgacgcagcc gccctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
 tcctgcactg ggagcagctc caacatcggg gcaggttatg atgtacactg gtaccagcaa 120
 cttccaggcg cggcccccaa actcctcatc aggggtaatg gcaatcggcc ctcaggggtc 180
 cctgaccgat tctctgtctc caagtctggc tactcagcct ccctggccat cactgggctg 240
 cagcctgccg atgaggggtg ttattactgc cagtcctatg acagcagtct gagggttcg 300
 aaggtgttcg gccaaaggac caagctgacc gtccta 336

15 <210> 6
 <211> 112
 <212> PRT

ES 2 535 872 T3

<213> Homo sapiens

<400> 6

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

<210> 7

<211> 774

<212> ADN

30 <213> Homo sapiens

<400> 7

caggtcacct tgaaggagtc tgggggagggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttagt agatatgtca tcaactgggt ccgccaggct 120
 ccaggggaagg ggctggaatg ggtctcagct attagtggtta ctgggtggtag cacggcctac 180
 gcagactccg tgagggggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ttgcaaatga atagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtac gaaaggacag 300
 tgggaacggg gaagtacta ctttgactac tggggccggg gaaccctggt caccgtctcg 360
 agtggaggcg gcggttcagg cggagggtggc tctggcggtg gcggaagtgc acagtctgtg 420
 ctgacgcagc cgccctcagt gtctggggcc ccagggcaga gggtcaccat ctctgcact 480
 gggagcagct ccaacatcgg ggacggttat gatgtacact ggtatcagca gcttccagga 540
 acagccccc aactcctcat ctatggtaac agtcatcggc cctcaggggt ccctgaccga 600
 ttctctggct ccaagtctga cacctctgcc tccctggcca tcaactgggt ccagggtgag 660
 gatgaggctg attatctctg ccaactcctat gacggcagtg tgagtggctg gattttcggc 720
 ggagggacca agctgaccgt cctaggtgcg gccgcacatc atcatcacca tcac 774

<210> 8

35 <211> 258

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

ES 2 535 872 T3

Gln Val Thr Leu Lys 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 Arg Tyr
 20 25 30

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

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

Arg 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

Thr Lys Gly Gln Trp Glu Arg Gly Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro
 130 135 140

Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr
 145 150 155 160

Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asp Gly Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln
 165 170 175

Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Asn Ser His
 180 185 190

Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Asp Thr
 195 200 205

Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln Val Glu Asp Glu Ala Asp
 210 215 220
 Tyr Phe Cys His Ser Tyr Asp Gly Ser Val Ser Gly Trp Ile Phe Gly
 225 230 235 240

Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Ala Ala Ala His His His His
 245 250 255

His His
 <210> 9
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 9

5

ES 2 535 872 T3

caggtcacct tgaaggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttagt agatatgtca tcaactgggt cgcaggct 120
 ccaggaagg ggctggaatg ggtctcagct attagtgtta ctggtggtag cacggcctac 180
 gcagactccg tgaggggccc gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ttgcaaatga atagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtac gaaaggacag 300
 tgggaacggg gaagttacta ctttgactac tggggccggg gaaccctggt caccgtctcg 360
 agt 363

<210> 10
 <211> 121
 <212> PRT

5 <213> Homo sapiens
 <400> 10

Gln Val Thr Leu Lys 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 Arg Tyr
 20 25 30

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

Ser Ala Ile Ser Val Thr Gly Gly Ser Thr Ala Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Arg 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

Thr Lys Gly Gln Trp Glu Arg Gly Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

10 <210> 11
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 11

ES 2 535 872 T3

cagtctgtgc tgacgcagcc gccctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
 tcttgactg ggagcagctc caacatcggg gacggttatg atgtacactg gtatcagcag 120
 cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc tatgtaaca gtcacggcc ctcaggggctc 180
 cctgaccgat tctctggctc caagtetgac acctctgctt ccttgccat cactgggctc 240
 caggttgagg atgaggctga ttattctgct cactcctatg acggcagtgt gagtggctgg 300
 attttcggcg gagggaccaa gctgaccgtc ctagggt 336

<210> 12
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 12

5

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asp Gly
 20 25 30

Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
 35 40 45
 Leu Ile Tyr Gly Asn Ser His Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Asp Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Val Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys His Ser Tyr Asp Gly Ser
 85 90 95

Val Ser Gly Trp Ile Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

10

<210> 13
 <211> 747
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 13

ES 2 535 872 T3

caggtgcagc tggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaagggt 60
 tcttgcaagg catctggata caccttcacc agctactata tgcactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggaata atcaacccta gtggtggtag cacaagctac 180
 gcacagaagt tccagggcag agtcaccatg accagggaca cgtccacgag cacagtctac 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagacgag 300
 aactgggggt tgcaccctg gggccagga accctgggtca cgtctcgag tggaggcggc 360
 ggttcaggcg gaggtggctc tggcgggtggc ggaagtgcac tttcctatga gctgactcag 420
 ccaccctcag tgtccgtgtc tccaggacag acagccacca ttacctgctc tggacatgca 480
 ctgggggaca aatttgtttc ctggtatcag cagggatcag gccagtcccc tgtattggtc 540
 atctatgacg ataccagcg gcctcaggg atccctgggc gattctctgg ctccaactct 600
 gggaacacag ccactctgac catcagcggg acccaggcta tggatgagge tgactatfff 660
 tgtcaggcgt gggacagcag cttcgtattc ggcggaggga ccaaggtcac cgtcctaggt 720
 gcggccgcac atcatcatca ccatcac 747
 <210> 14
 <211> 249
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens
 <400> 14

ES 2 535 872 T3

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

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

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

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Glu Asn Trp Gly Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
 115 120 125

Gly Gly Gly Ser Ala Leu Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val
 130 135 140

Ser Val Ser Pro Gly Gln Thr Ala Thr Ile Thr Cys Ser Gly His Ala
 145 150 155 160

Leu Gly Asp Lys Phe Val Ser Trp Tyr Gln Gln Gly Ser Gly Gln Ser
 165 170 175

Pro Val Leu Val Ile Tyr Asp Asp Thr Gln Arg Pro Ser Gly Ile Pro
 180 185 190

Gly Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile
 195 200 205

Ser Gly Thr Gln Ala Met Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Ala Trp
 210 215 220

Asp Ser Ser Phe Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
 225 230 235 240

Ala Ala Ala His His His His His His
 245

5

<210> 15
 <211> 351
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 15

10

ES 2 535 872 T3

cagggtgcagc tgggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60
 tcctgcaagg catctggata caccttcacc agctactata tgcactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggaata atcaacccta gtggtggtag cacaagctac 180
 gcacagaagt tccagggcag agtcaccatg accagggaca cgtccacgag cacagtctac 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagacgag 300
 aactgggggt tgcaccctg gggccagga accctgggtca cegtctcgag t 351

5 <210> 16
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 16

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

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

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

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

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

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Glu Asn Trp Gly Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

10 <210> 17
 <211> 315
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 17

ES 2 535 872 T3

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

5 <210> 18
 <211> 105
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 18

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

Thr Ala Thr Ile Thr Cys Ser Gly His Ala Leu Gly Asp Lys Phe Val
 20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Gly Ser Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45

Asp Asp Thr Gln Arg Pro Ser Gly Ile Pro Gly Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Ala Trp Asp Ser Ser Phe Val Phe
 85 90 95

Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105

10 <210> 19
 <211> 774
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 19

ES 2 535 872 T3

```

gagggccagt tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttagt agatatgtca tcaactgggt cgcgccaggt      120
ccaggggaagg ggctggaatg ggtctcagct attagtgtta ctggtggtag cacggcctac      180
gcagactccg tgagggggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat      240
ttgcaaatga atagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggacag      300
tgggaacggg gaagtacta ctttgactac tggggccggg gaaccctggt caccgtctcg      360
agtggaggcg gcggttcagg cggaggtggc tctggcggtg gcggaagtgc acagtctgtg      420
ctgacgcagc cgccctcagt gtctggggcc ccagggcaga gggtcaccat ctctgcact      480
gggagcagct ccaacatcgg ggacggttat gatgtacact ggtatcagca gcttccagga      540
acagcccca aactcctcat ctatggtaac agtcatcggc cctcaggggt ccctgaccga      600
ttctctggct ccaagtctgg tacctctgcc tccctggcca tcaactgggct ccaggctgag      660
gatgaggtg attattactg ccactcctat gacggcagtg tgagtggctg gatthtcggc      720
ggagggacca agctgaccgt cctaggtgcg gccgcacatc atcatcacca tcac          774

```

<210> 20
 <211> 258
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 20

5

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 Arg Tyr
 20 25 30

ES 2 535 872 T3

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

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

Arg 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 Gly Gln Trp Glu Arg Gly Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro
 130 135 140

Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr
 145 150 155 160

Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asp Gly Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln
 165 170 175

Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Asn Ser His
 180 185 190

Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr
 195 200 205

Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp
 210 215 220

Tyr Tyr Cys His Ser Tyr Asp Gly Ser Val Ser Gly Trp Ile Phe Gly
 225 230 235 240

Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Ala Ala Ala His His His His
 245 250 255

His His

ES 2 535 872 T3

<211> 363
 <212>ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 21
 gaggtccagt tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttagt agatatgtca tcaactgggt cgcaggct 120
 ccaggggaagg ggctggaatg ggtctcagct attagtgtta ctggtggtag cacggcctac 180
 gcagactccg tgagggggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ttgcaaatga atagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggacag 300
 tgggaacggg gaagttacta ctttgactac tggggccggg gaaccctggt caccgtctcg 360
 5 agt 363

<210> 22
 <211> 121
 <212> PRT
 10 <213> Homo sapiens
 <400> 22
 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 Arg Tyr
 20 25 30
 Val Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Val Thr Gly Gly Ser Thr Ala Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Arg 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 Gly Gln Trp Glu Arg Gly Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

15 <210> 23
 <211> 333
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 20 <400> 23

ES 2 535 872 T3

cagtctgtgc tgaagcagcc gcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
 tcttgactg ggagcagctc caacatcggg gacggttatg atgtacactg gtatcagcag 120
 cttccaggaa cagcccccaa actcctcctc tatggtaaca gtcacatcgcc ctcaggggctc 180
 cctgaccgat tctctggctc caagtctggg acctctgcct ccctggccat cactgggctc 240
 caggctgagg atgaggctga ttattactgc cactcctatg acggcagtggt gagtggctgg 300
 attttcggcg gagggaccaa gctgaccgtc cta 333

<210> 24
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 24
 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asp Gly
 20 25 30

Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Leu Ile Tyr Gly Asn Ser His Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys His Ser Tyr Asp Gly Ser
 85 90 95

Val Ser Gly Trp Ile Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

10

<210> 25
 <211> 747
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

15

<400> 25

ES 2 535 872 T3

cagggtgcagc tgggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60
 tcttgcgaagg catctggata caccttcacc agctactata tgcactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggaata atcaacccta gtggtggtag cacaagctac 180
 gcacagaagt tccagggcag agtcaccatg accagggaca cgtccacgag cacagtctac 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagacgag 300
 aactgggggt tcgaccctg gggccagga accctgggtca cegtctcgag tggaggcggc 360
 ggttcaggcg gaggtggctc tggcgggtggc ggaagtgcac tttcctatga gctgactcag 420
 ccaccctcag tgtccgtgtc tccaggacag acagccagca ttacctgctc tggacatgca 480
 ctgggggaca aatttgtttc ctggtatcag cagaagccag gccagtcccc tgtattggtc 540
 atctatgacg ataccagcg gccctcaggg atccctgagc gattctctgg ctccaactct 600
 gggaacacag ccactctgac catcagcggg acccaggcta tggatgaggc tgactattac 660
 tgtcaggcgt gggacagcag ctctgtattc ggcggagggg ccaaggtcac cgtcctaggt 720
 gcggccgcac atcaccatca ccatcac 747

<210> 26
 <211> 249
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 26
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

ES 2 535 872 T3

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Glu Asn Trp Gly Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 115 120 125

Gly Gly Gly Ser Ala Leu Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val
 130 135 140

Ser Val Ser Pro Gly Gln Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly His Ala
 145 150 155 160

Leu Gly Asp Lys Phe Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 165 170 175

Pro Val Leu Val Ile Tyr Asp Asp Thr Gln Arg Pro Ser Gly Ile Pro
 180 185 190

Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile
 195 200 205

Ser Gly Thr Gln Ala Met Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp
 210 215 220

Asp Ser Ser Phe Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
 225 230 235 240

Ala Ala Ala His His His His His His
 245

- <210> 27
- <211> 351
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens

5

ES 2 535 872 T3

<400> 27

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

5 <210> 28
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 28

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

15 <210> 29
 <211> 315
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 29

ES 2 535 872 T3

tcctatgagc tgactcagcc accctcagtg tccgtgtctc caggacagac agccagcatt 60
 acctgctctg gacatgcact gggggacaaa tttgtttctt ggtatcagca gaagccaggg 120
 cagtcccctg tattggatcat ctatgacgat acccagcggc cctcagggat ccctgagcga 180
 ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc actctgacca tcagcggggac ccaggctatg 240
 gatgaggctg actattactg tcagggcgtgg gacagcagct tcgtattcgg cggagggacc 300
 aaggtcaccg tccta 315

<210> 30
 <211> 105
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 30
 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly His Ala Leu Gly Asp Lys Phe Val
 20 25 30
 Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45
 Asp Asp Thr Gln Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Ser Phe Val Phe
 85 90 95
 Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105

10

<210> 31
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15

<400> 31
 Ser Tyr Tyr Met His
 1 5

20

<210> 32
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 32

Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 33

5 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 33

Asp Glu Asn Trp Gly Phe Asp Pro
 1 5

10

<210> 34

15 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 34

Ser Gly His Ala Leu Gly Asp Lys Phe Val Ser
 1 5 10

20

<210> 35
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25

<400> 35
 Asp Asp Thr Gln Arg Pro Ser
 1 5

<210> 36

30 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 36

Gln Ala Trp Asp Ser Ser Phe
 1 5

35

<210> 37
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

40

<400> 37
 Arg Tyr Val Ile Asn
 1 5

<210> 38

45 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 38

Ala Ile Ser Val Thr Gly Gly Ser Thr Ala Tyr Ala Asp Ser Val Arg
 1 5 10 15

Gly

5 <210> 39
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 39
 Gly Gln Trp Glu Arg Gly Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

10 <210> 40
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <400> 40
 Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asp Gly Tyr Asp Val His
 1 5 10

20 <210> 41
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 41
 Gly Asn Ser His Arg Pro Ser
 1 5

25 <210> 42
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 42
 His Ser Tyr Asp Gly Ser
 1 5

30 <210> 43
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

35 <400> 43
 Ser Tyr Ala Met Ser
 1 5

40 <210> 44
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 44

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

Gly

5 <210> 45
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 45
 Met Gly Pro Cys Thr Gly Gly Ser Cys Tyr Asp Thr Leu Gly Asn
 1 5 10 15

15 <210> 46
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20 <400> 46
 Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp Val His
 1 5 10

25 <210> 47
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30 <400> 47
 Gly Asn Gly Asn Arg Pro Ser
 1 5

35 <210> 48
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

40 <400> 48
 Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Ser Lys Val
 1 5 10

45 <210> 49
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 49

ES 2 535 872 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> 50
- <211> 320
- <212> DNA
- <213> Homo sapiens

<400> 50
 gtcagcccaa ggctgcccc tcggtcactc tgttcccgcc ctctctgag gagcttcaag 60

ccaacaaggc cacactggtg tgtctcataa gtgacttcta cccgggagcc gtgacagtgg 120

cctggaaggc agatagcagc cccgtcaagg cgggagtgga gaccaccaca ccctccaaac 180

aaagcaacaa caagtaacgc gccagcagct atctgagcct gacgcctgag cagtggaagt 240

cccacagaag ctacagctgc caggtcacgc atgaaggag caccgtggag aagacagtgg 300

10 cccctacaga atgttcatag 320

- <210> 51
- <211> 106
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- 15 <400> 51

ES 2 535 872 T3

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

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

Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro
 35 40 45

Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
 50 55 60
 Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
 65 70 75 80

Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
 85 90 95

Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 100 105

<210> 52

<211> 992

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 52

ES 2 535 872 T3

cctccaccaa gggcccatcg gtcttcccc tggcaccctc ctccaagagc acctctgggg 60
gcacagcggc cctgggctgc ctgggtcaagg actacttccc cgaaccggtg acggtgtcgt 120
ggaactcagg cgccttgacc agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta cagtcctcag 180
gactctactc cctcagcagc gtgggtgaccg tgcctccag cagcttgggc acccagacct 240
acatctgcaa cgtgaatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaaa gttgagccca 300
aatcttgtga caaaactcac acatgcccac cgtgcccagc acctgaactc ctggggggac 360
cgtcagtctt cctcttcccc caaaaccca aggacaccct catgatctcc cggaccctg 420
aggtcacatg cgtgggtggtg gacgtgagcc acgaagacc tggaggtcaag ttcaactggt 480
acgtggacgg cgtggagggtg cataatgcc aagacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca 540
gcacgtaccg tgtggtcagc _gtcctcaccg tcttgacca ggactggctg aatggcaagg 600
agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca 660
aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc cgggaggaga 720
tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctatccc agcgacatcg 780
ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc 840
tggactccga cggctccttc ttcctctata gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc 900
agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcattgaggc tctgcacaac cactacacgc 960
agaagagcct ctccctgtcc ccgggtaaat ga 992

<210> 53
<211> 330
5 <212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 53

ES 2 535 872 T3

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 Leu Leu Gly Gly 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

ES 2 535 872 T3

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

<210> 54
 <211> 6
 <212> PRT
 5 <213> ALGÚN

<220>
 <221> MISC_CARACTERÍSTICA
 <222> (2)..(3)
 10 <223> algún amino ácido

<220>
 <221> MISC_CARACTERÍSTICA
 <222> (5)..(5)
 15 <223> algún amino ácido

<400> 54

Lys Xaa Xaa Pro Xaa Asn
 1 5

20

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado o fragmento del mismo que específicamente se une GDF-8, comprende:

5 un (VH) de anticuerpo de dominio de región variable, donde VH CDR1 comprime SEQ ID NO: 31, VH CDR2 comprime SEQ ID NO: 32, y CDR3 comprime SEQ ID NO: 33; y un (VL) de anticuerpo de dominio de región liviana, donde VH CDR1 comprime SEQ ID NO: 34, VH CDR2 comprime SEQ ID NO: 35, y CDR3 comprime SEQ ID NO: 36.

10 2. Un anticuerpo aislado o fragmento del mismo de la reivindicación 1, que comprende un dominio VH y un dominio VL, donde es seleccionado de un grupo de secuencia de amino ácidos que consiste en SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 28 y una secuencia de amino ácido de dominio de VH codificado para que el vector fagémido depositado en ATCC bajo el número de depósitos PTA-4741, y
15 Donde dicho dominio VL es seleccionado de un grupo de secuencias de amino ácidos que consiste en SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 30 y la secuencia de amino ácido del dominio VL codificado por el vector fagémido depositado en ATCC bajo el número de depósito PTA-4741.

3. Un anticuerpo aislado de la reivindicación 1, consiste en:

20 dos cadenas pesadas, cada uno que consiste esencialmente en el dominio VH de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28 y el dominio constante de cadena pesada de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53; y dos cadenas ligeras, cada uno que consiste esencialmente en el dominio VL de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30 y el dominio constante de cadena ligera de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51.

25 4. El anticuerpo o fragmento antigénico unido de la reivindicación 1, que específicamente une GDF-8, a dichos anticuerpos o fragmentos que comprimen:

un (VH) de anticuerpo de dominio de región variable, donde VH CDR1 comprime SEQ ID NO: 37, VH CDR2 comprime SEQ ID NO: 38, y CDR3 comprime SEQ ID NO: 39; y

30 un (VL) de anticuerpo de dominio de región liviana, donde VH CDR1 comprime SEQ ID NO: 40, VH CDR2 comprime SEQ ID NO: 41, y CDR3 comprime SEQ ID NO: 42.

5. El anticuerpo o fragmento de la reivindicación 4, que comprende un dominio VH y uno VL,
35 Donde dicho dominio VH es seleccionado de un grupo de secuencias de amino ácidos que consiste en SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 22 y la secuencia de amino ácido del dominio VH codificado por el vector fagémido depositado en ATCC bajo el número de depósito PTA-4740; y.
Donde dicho dominio VL es seleccionado de un grupo de secuencias de amino ácidos que consiste en SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 24 y la secuencia de amino ácido del dominio VL codificado por el vector fagémido depositado en ATCC bajo el número de depósito PTA-4740.

40 6. El anticuerpo o fragmento de reivindicación 4 que consiste en:

dos cadenas pesadas, cada uno que consiste esencialmente en el dominio VH de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 y el dominio constante de cadena pesada de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53; y
45 dos cadenas ligeras, cada uno que consiste esencialmente en el dominio VL de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 y el dominio constante de cadena ligera de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51.

7. El anticuerpo o antigénico o fragmento del mismo, que específicamente une GDF-8, dicho anticuerpo o fragmento comprime:

50 un (VH) de anticuerpo de dominio de región variable, donde VH CDR1 comprime SEQ ID NO: 43, VH CDR2 comprime SEQ ID NO: 44, y CDR3 comprime SEQ ID NO: 45; y

un (VL) de anticuerpo de dominio de región liviana, donde VH CDR1 comprime SEQ ID NO: 46, VH CDR2 comprime SEQ ID NO: 47, y CDR3 comprime SEQ ID NO: 48.

55 8. El anticuerpo o fragmento de la reivindicación 7, comprime un dominio VH y uno VL,
Donde dicho dominio VH es seleccionado de un grupo de secuencias de amino ácidos que consiste en SEQ ID NO: 4 y la secuencia de amino ácido del dominio VH codificado por el vector fagémido depositado en ATCC bajo el número de depósito PTA-4739; y.
Donde dicho dominio VL es seleccionado de un grupo de secuencias de amino ácidos que consiste en SEQ ID NO:
60 6, y la secuencia de amino ácido del dominio VL codificado por el vector fagémido depositado en ATCC bajo el número de depósito PTA-4739.

9. El anticuerpo de la reivindicación 7, que consiste en:

65 dos cadenas pesadas, cada uno que consiste esencialmente en el dominio VH de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 y el dominio constante de cadena pesada de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53; y

dos cadenas ligeras, cada uno que consiste esencialmente en el dominio VL de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 y el dominio constante de cadena ligera de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51.

- 5 10. El anticuerpo o fragmento que específicamente une GDF-8, donde dicho anticuerpo es un scFV que comprime una secuencia de amino ácidos seleccionado de una secuencia de amino ácidos que consiste en: SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 26, la secuencia de amino ácido codificado por un vector fagémido depositado en ATCC bajo el número de depósito PTA-4741, SEQ ID, NO: 8, SEQ ID NO: 20, la secuencia de amino ácidos codificada por un vector fagémido depositado en ATCC bajo el número de depósito PTA-4740, SEQ ID NO: 2 y la secuencia de amino ácido codificada por el vector fagémido en la ATCC bajo el número de depósito PTA-4739.
- 10 11. El anticuerpo o fragmento de la reivindicación 1, 2, 4, 5 y 7-9, además comprime un anticuerpo de cadenas pesadas de dominio constante de un humano de un subtipo de inmunoglobina seleccionado de un grupo que consiste IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgE y IgM.
- 15 12. El anticuerpo, o fragmento de la reivindicación 11, donde dichas cadenas de dominio constante es modificado para alterar la función de constante dominio.
- 20 13. El anticuerpo o fragmento de la reivindicación 1-9, además comprime un anticuerpo humano liviano de un dominio constante seleccionado de un grupo que consiste en una cadena liviana kappa de dominio constante y una cadena liviana lambda de dominio constante.
- 25 14. Un anticuerpo de la reivindicación 3, 6 o 9, donde la secuencia de amino ácido de SEQ ID NO: 53 es modificado al menos de los sobrantes 117 o 120 para alterar la función de la región Fc.
- 30 15. Un anticuerpo o fragmento de las reivindicaciones 1-9, donde dichos anticuerpos o fragmentos son parcialmente o completamente humanizados.
- 35 16. Un anticuerpo o fragmentos de las reivindicaciones 1-9, donde dicho anticuerpo o fragmentos están neutralizados.
- 40 17. Una composición farmacéutica que comprime un anticuerpo o fragmentos de las reivindicaciones 1-9 y un excipiente aceptable.
- 45 18. Uso de anticuerpos o fragmentos de las reivindicaciones 1-9 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de desorden mamario seleccionado de un grupo que consiste en un desorden muscular, uno neuromuscular, u hueso degenerativo y un desorden de tejido.
- 50 19. Uso de anticuerpos o fragmentos de las reivindicaciones 1-9 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de desorden mamario seleccionado de un grupo que consisten en una distrofia muscular. Una distrofia muscular Dúchenne, una atrofia muscular, sarcopenia, caquexia, síndrome de pérdida muscular, esclerosis lateral amiotrofia, osteoartritis, intolerancia a la glucosa, trauma inducido por la resistencia de la insulina, diabetes de tipo 2, obesidad.
- 55 20. Uso de un anticuerpo o fragmento de las reivindicaciones 1-9 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una distrofia muscular.
- 60 21. Uso del anticuerpo o fragmento de las reivindicaciones 1-9 en la preparación de un medicamento para incrementar la masa muscular de un mamario.
- 65 22. Un poli nucleótido aislado comprime una secuencia de ácido nucleico codifica que anticuerpo o fragmentos de las reivindicaciones 1-9.
23. El poli nucleótido de la reivindicación 22, donde dicho poli nucleótido comprime una secuencia de ácido nucleico seleccionado de una grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27,y SEQ ID NO: 29.
24. Un vector de expresión que comprime un poli nucleótido de las reivindicaciones de la 1-9.
25. Una célula de huéspedes aislados que expresan el anticuerpo o fragmentos de las reivindicaciones 1-9.
26. Un método de producción de anticuerpo o fragmentos, que comprime el paso de cultivar la célula huésped de la reivindicación 25 y recuperar el anticuerpo o fragmentos producidos.
27. El anticuerpo o fragmentos producidos por un método de la reivindicación 26.

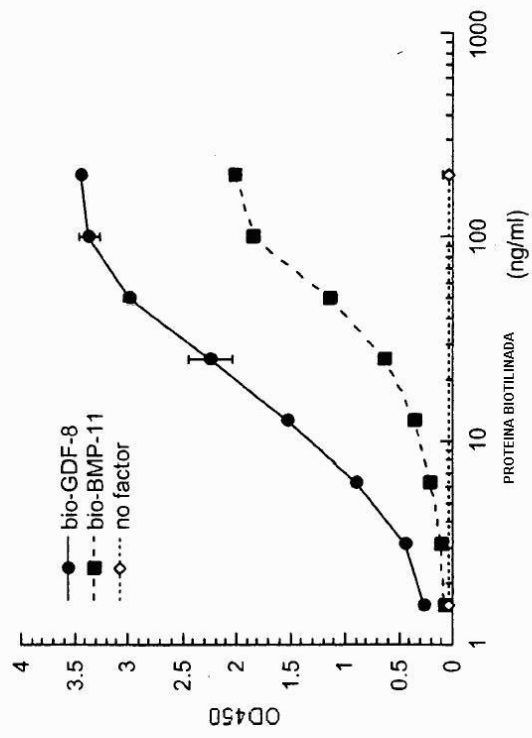


Fig. 1

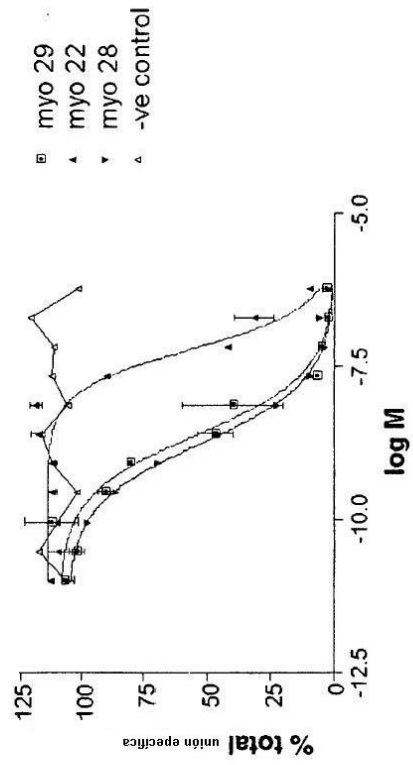


Fig. 2

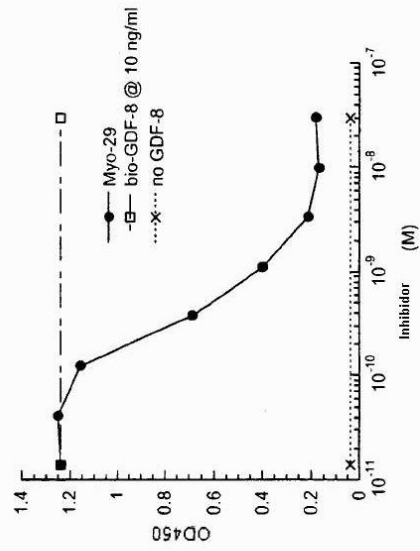


FIG. 3A

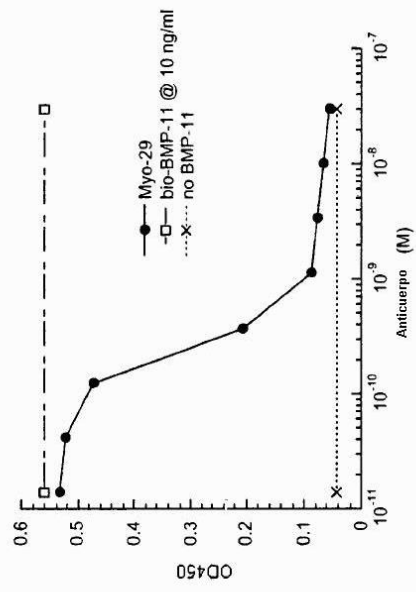


FIG 3B

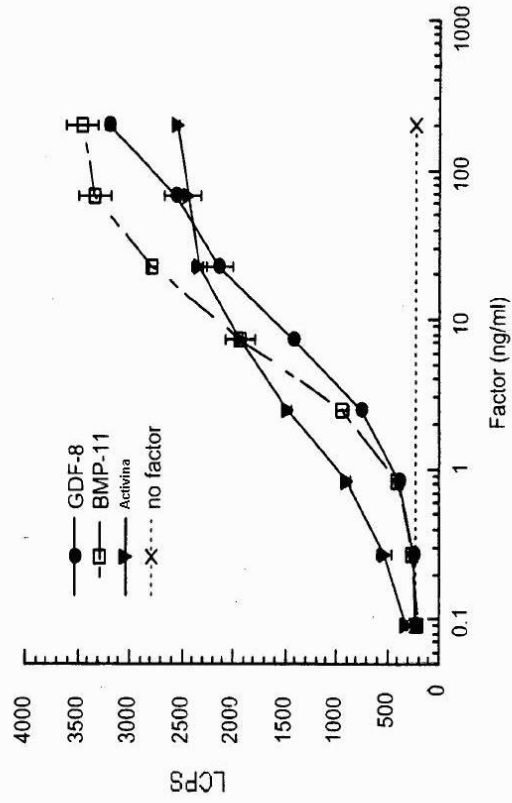


Fig. 4A

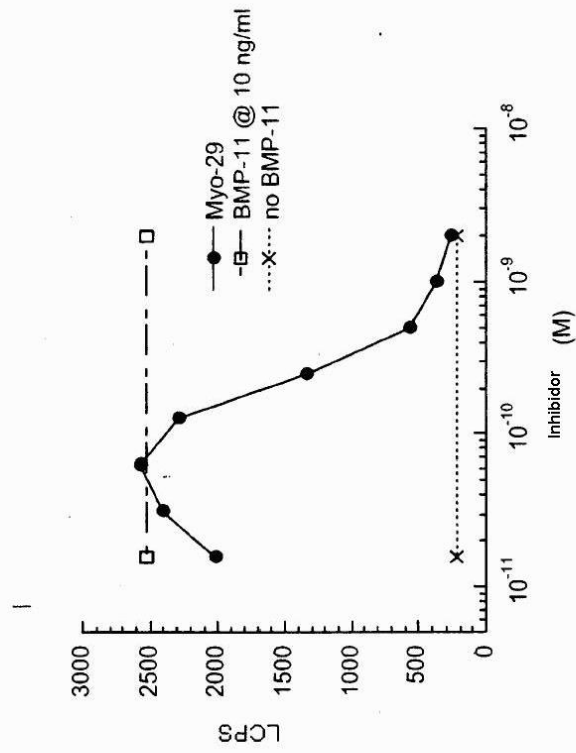


Fig. 4B

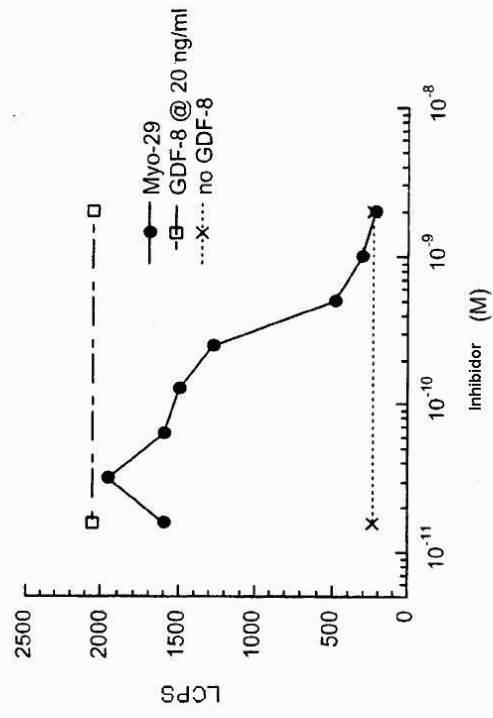


Fig. 4C

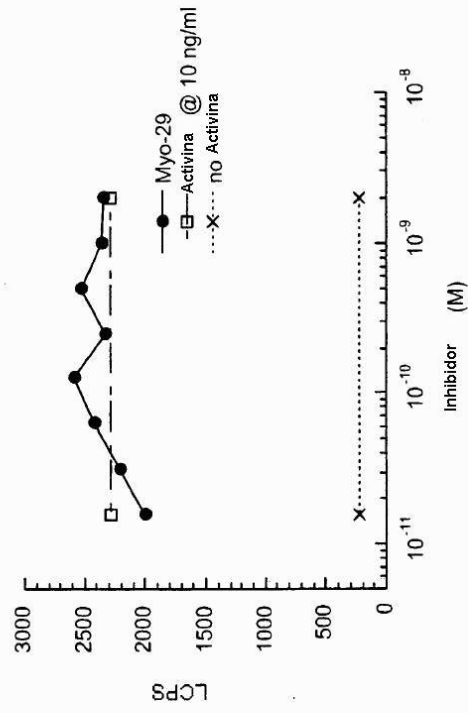


Fig. 4D

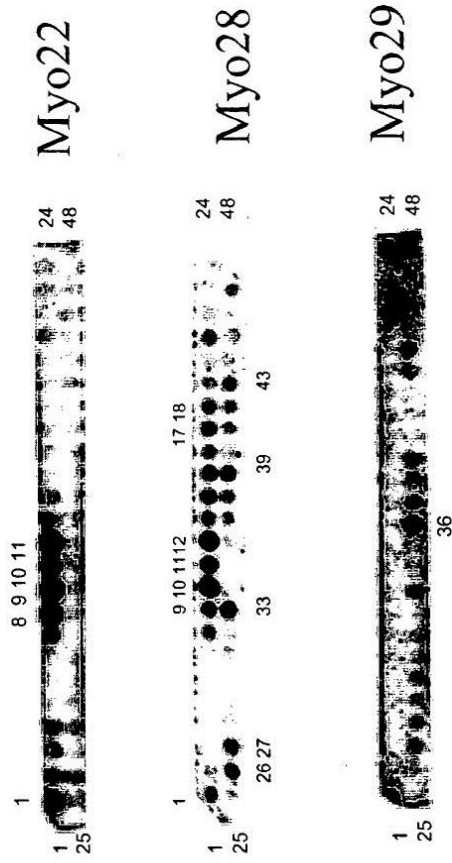


Fig. 5

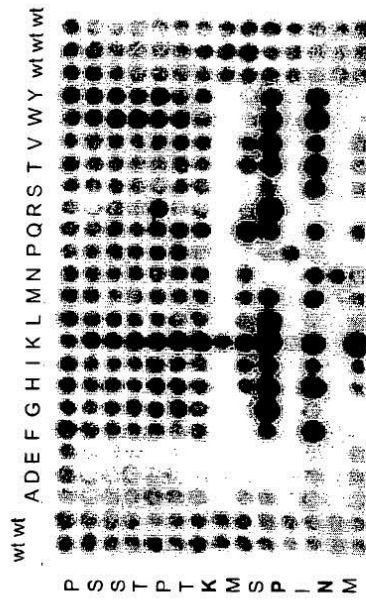


Fig. 6

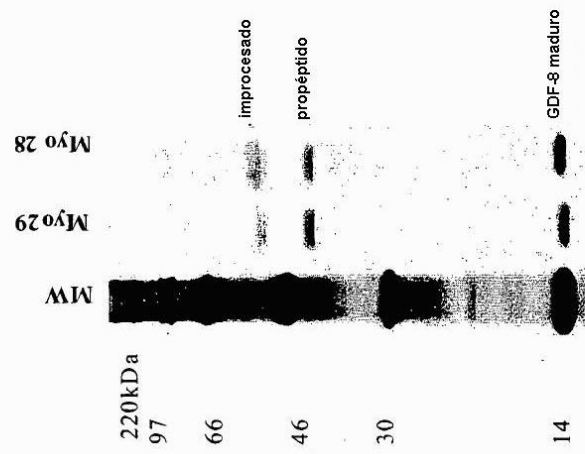
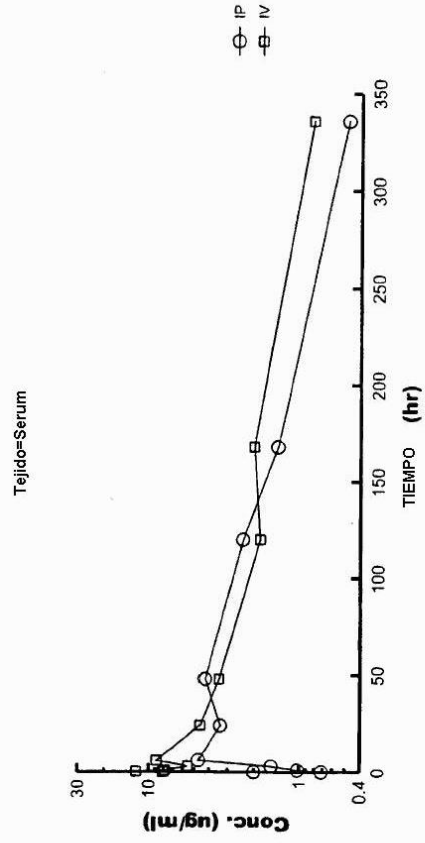


Fig. 7



P

Fig. 8

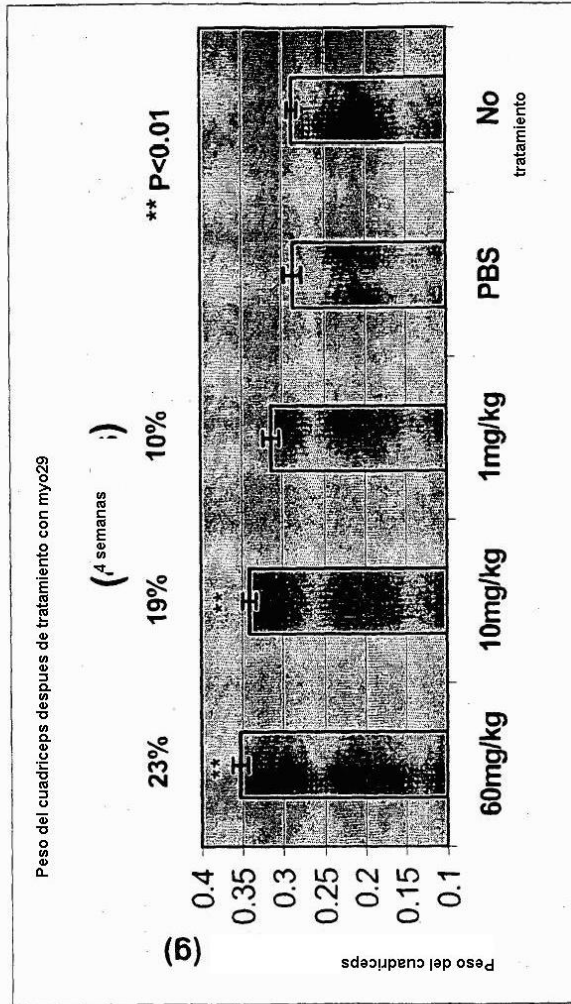


Fig. 9

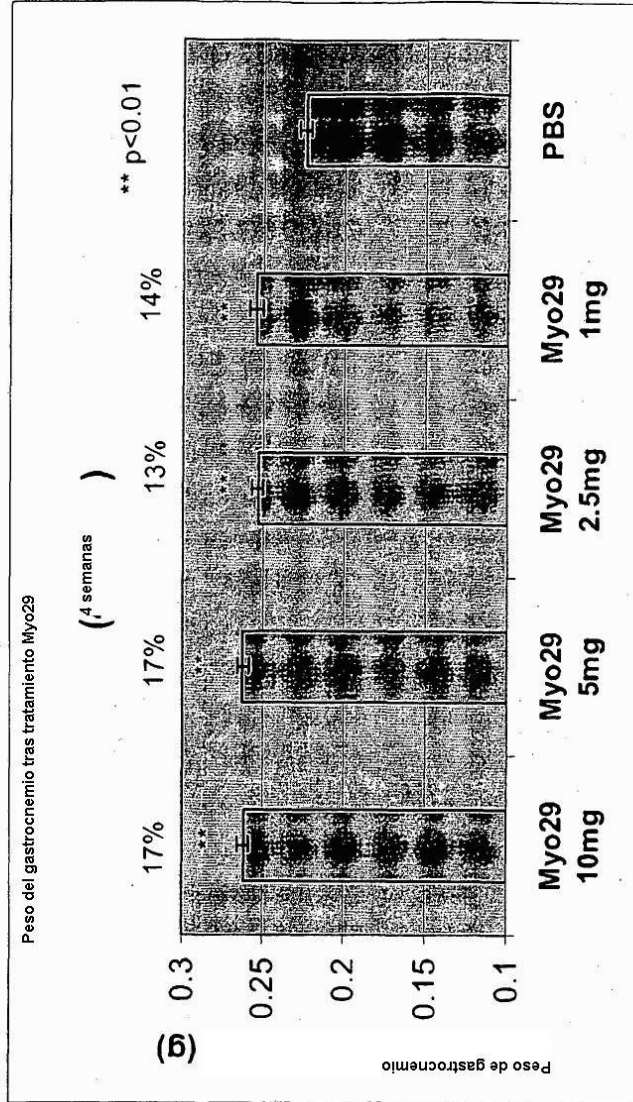


FIG. 10A

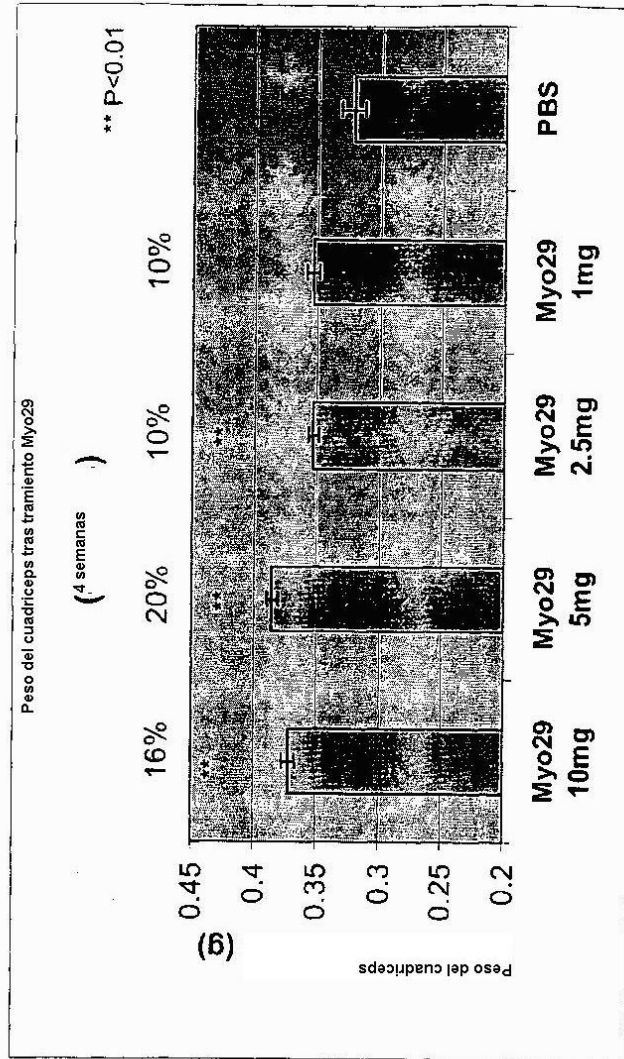


FIG. 10B

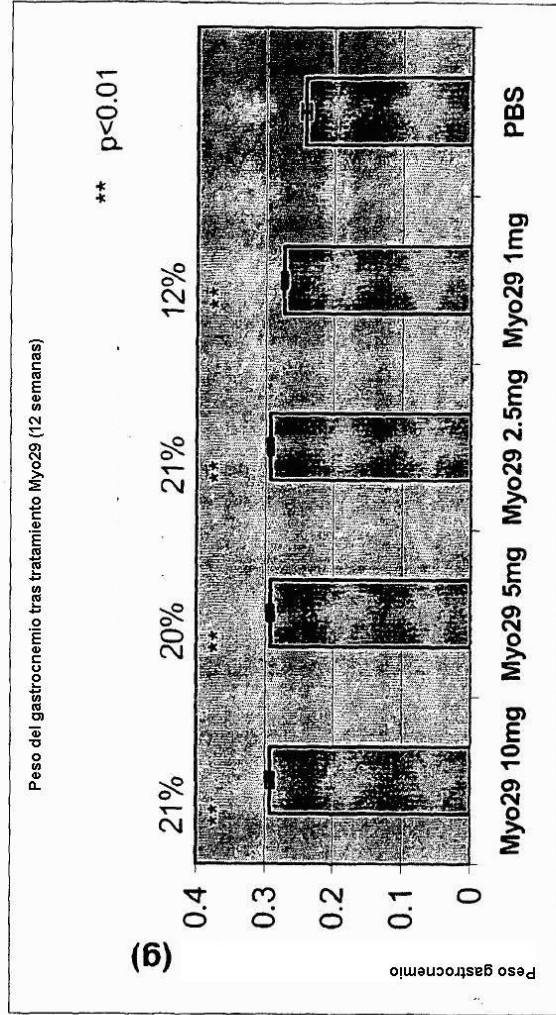


FIG. 11A

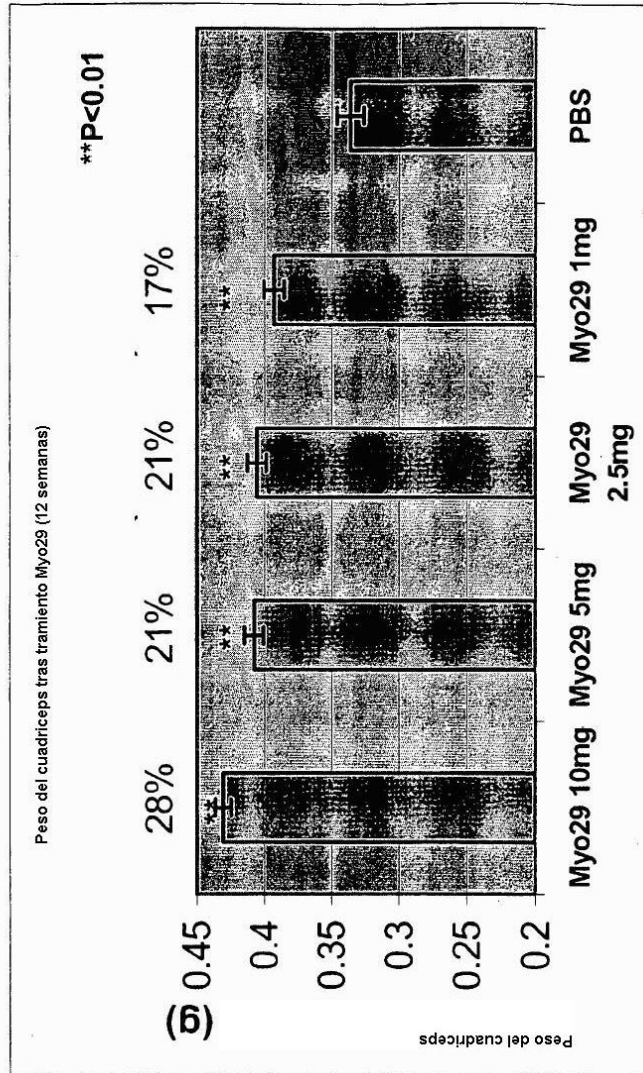


FIG. 11B

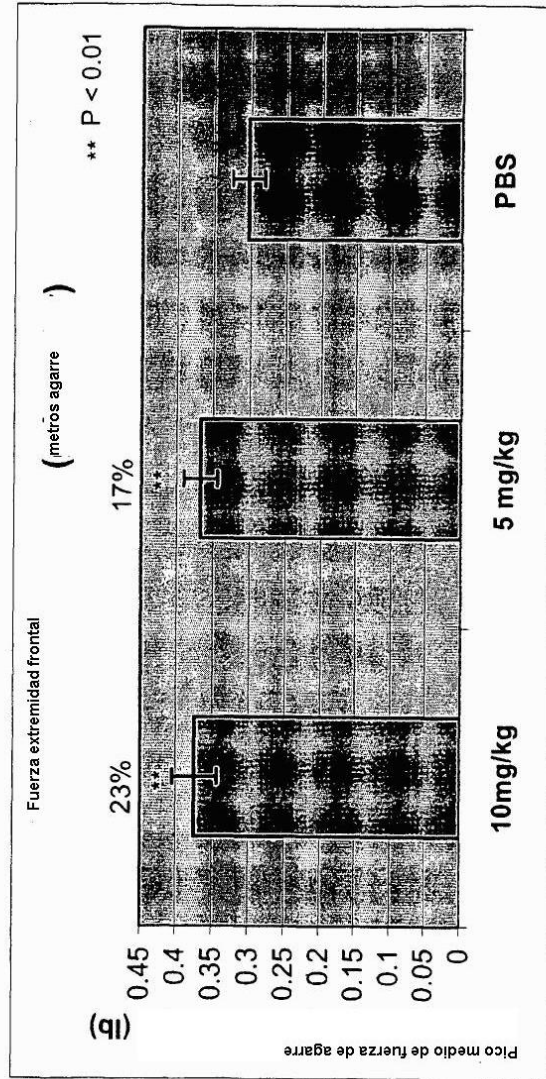


Fig. 12