

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 659 114**

51 Int. Cl.:

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.08.2006 E 11161564 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.11.2017 EP 2407486**

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

30 Prioridad:

**19.08.2005 US 709704 P**

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

**13.03.2018**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**TEMIÑO CENICEROS, Ignacio**

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 659 114 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Anticuerpos antagonistas contra GDF-8 y usos en el tratamiento de ALS y otros trastornos asociados con GDF-8

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos No. 60/709.704, presentada el 19 de agosto de 2005.

Antecedentes de la invención

10 Campo de la invención

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

20 Estado de la técnica relacionado

25 El factor 8 de crecimiento y diferenciación (GDF-8), también conocido como miostatina, es una proteína secretada y miembro de la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) de factores de crecimiento estructuralmente relacionados. Los miembros de esta superfamilia poseen propiedades morfogenéticas y reguladoras del crecimiento (Kingsley et al., (1994) Genes Dev. 8: 133-46; Hoodless et al., (1998) Curr. Topics Microbiol. Immunol., 228: 235-72). El GDF-8 humano se sintetiza como una proteína precursora de 375 aminoácidos que forma un complejo homodímero. Durante el procesamiento, el propéptido amino terminal, conocido como el "péptido asociado a la latencia" (LAP), se escinde y puede permanecer unido no covalentemente al homodímero, formando un complejo inactivo designado como "pequeño complejo latente" (Miyazono et al., (1988) J. Biol. Chem. 263: 6407-15; Wakefield et al., (1988) J. Biol. Chem. 263: 7646-54; Brown et al. (1999) Growth Factors 3: 35-43; Thies et al., (2001) Growth Factors 18: 251-59; Gentry et al., (1990) Biochemistry 29: 6851-57; Derynck et al. (1995) Nature 316: 701-05; Massague (1990) Ann. Rev. Cell. Biol. 12: 597-641). Las proteínas tales como folistatina y sus parientes también se unen a los homodímeros de GDF-8 maduros e inhiben la actividad biológica de GDF-8 (Gamer et al. (1999) Dev. Biol. 208: 222-32).

35 Una alineación de la secuencia de aminoácidos deducida de GDF-8 de varias especies demuestra que GDF-8 está altamente conservada (McPherron et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94: 12457-61). Las secuencias de GDF-8 humano, de ratón, de rata, de porcino y de pollo son 100% idénticas en la región del extremo terminal C, mientras que las de babuino, bovino y ovino difieren en solo 3 aminoácidos en el extremo terminal C. El alto grado de conservación de GDF-8 en todas las especies sugiere que GDF-8 tiene una función fisiológica esencial.

40 Se ha demostrado que GDF-8 juega un papel importante en la regulación del desarrollo muscular y la homeostasis al inhibir tanto la proliferación como la diferenciación de mioblastos y células satélite (Lee y McPherron (1999) Curr. Opin Genet. Dev. 9: 604-07; McCroskery et al. (2003) J. Cell. Biol. 162: 1135-47). Se expresa temprano en el desarrollo del músculo esquelético, y continúa expresándose en el músculo esquelético adulto, preferentemente en los tipos de contracción rápida. Además, GDF-8 sobreexpresado en ratones adultos da como resultado una pérdida muscular significativa (Zimmers et al., (2002) Science 296: 1486-88). Además, se ha demostrado que las mutaciones naturales que hacen que el gen de GDF-8 sea inactivo causan tanto hipertrofia como hiperplasia tanto en animales como en humanos (Lee y McPherron (1997) citado más arriba). Por ejemplo, los ratones transgénicos con inactivación de GDF-8 se caracterizan por una marcada hipertrofia e hiperplasia del músculo esquelético y una estructura ósea cortical alterada (McPherron et al., (1997) Nature 387: 83-90; Hamrick et al., (2000) Bone 27: 343-49). Aumentos similares en la masa del músculo esquelético son evidentes en las mutaciones naturales de GDF-8 en el ganado (Ashmore et al. (1974) Growth 38: 501-07; Swatland et al. (1994) J. Anim. Sci. 38: 752-57; McPherron et al., citado más arriba, Kambadur et al. (1997) Genome Res. 7: 910-15). Además, diversos estudios indican que la mayor expresión de GDF-8 está asociada con la pérdida muscular inducida por VIH (González-Cadavid et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 95: 14938-43). También se ha implicado a GDF-8 en la producción de enzimas específicas de músculo (por ejemplo, creatina quinasa) y proliferación de mioblastos (WO 00/43781).

60 Además de sus propiedades morfogenéticas y de regulación del crecimiento, se cree que GDF-8 participa en numerosos otros procesos fisiológicos, incluida la homeostasis de la glucosa durante el desarrollo de la diabetes tipo 2, la tolerancia alterada a la glucosa, síndromes metabólicos (es decir, un síndrome tal como por ejemplo, síndrome X, que implica la aparición simultánea de un grupo de condiciones de salud, que pueden incluir resistencia a la insulina, obesidad abdominal, dislipidemia, hipertensión, inflamación crónica, un estado protrombótico, etc., que pone a una persona en alto riesgo de diabetes tipo 2 y/o enfermedad cardíaca), resistencia a la insulina (por ejemplo, resistencia inducida por traumas como quemaduras o desequilibrio de nitrógeno) y trastornos del tejido adiposo (por ejemplo,

obesidad, dislipidemia, enfermedad hepática grasa no alcohólica, etc.) (Kim et al. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 281: 902-06).

Una serie de trastornos de humanos y animales están asociados con tejido muscular funcionalmente debilitado, por ejemplo, esclerosis lateral amiotrófica ("ALS"), distrofia muscular ("MD", que incluye distrofia muscular de Duchenne), atrofia muscular, atrofia de órganos, fragilidad, enfermedad pulmonar obstructiva congestiva (EPOC), sarcopenia, caquexia y síndromes de desgaste muscular causados por otras enfermedades y afecciones. Actualmente, existen pocas terapias confiables o efectivas para tratar estos trastornos. La patología de estas enfermedades indica un papel potencial para la señalización de GDF-8 como objetivo en el tratamiento de estas enfermedades.

La ALS es una enfermedad neurodegenerativa mortal y de inicio tardío caracterizada por la degeneración del sistema nervioso central y atrofia muscular. La ALS generalmente se inicia con anomalías en la forma de andar y la pérdida de la destreza, y luego progresa a la parálisis de las extremidades y el diafragma. Si bien la mayoría de los casos de ALS son esporádicos y de etiología desconocida, se ha demostrado que el 5-10% de los casos son el resultado de la herencia familiar dominante (FALS). Aproximadamente el 10-20% de los casos de FALS se atribuyen a mutaciones en el gen de la superóxido dismutasa (SOD1) de Cu/Zn (revisado en Bruijn et al. (2004) *Ann. Rev. Neurosci.*, 27: 723-49). SOD1 es una metaloproteína heterodimérica que cataliza la reacción del superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno diatómico, y como la pérdida de SOD1 no da lugar a la enfermedad de la neurona motora (Reaume et al. (1996) *Nat. Genet.* 13: 43-47), se cree que induce la enfermedad por ganancia de función tóxica (revisado en Bruijn et al., citado más arriba). Los mecanismos específicos de muerte celular neuronal inducida por SOD1 no son claros, y pueden implicar alteraciones en el transporte axonal, respuestas celulares a proteínas mal plegadas, disfunción mitocondrial y excitotoxicidad (Bruijn et al., citado más arriba).

La degeneración de las neuronas motoras observada en ALS puede producirse a través de múltiples mecanismos, que incluyen la absorción o la interrupción del transporte de factores tróficos por neuronas motoras (revisado en Holzbaur (2004) *Trends Cell Biol.* 14: 233-40). Por lo tanto, ALS podría tratarse con terapias que rejuvenecen una neurona degenerativa al proporcionar un entorno de supervivencia óptimo. El entorno de un nervio incluye células no neuronales como la glía y las células musculares inervadas por la neurona motora. Este entorno proporciona factores tróficos y de crecimiento que son endocitados por la neurona y transportados a través del transporte axonal retrógrado hacia el cuerpo celular (Chao (2003) *Neuron* 39: 1-2, Holzbaur, citado más arriba).

Se ha modelado FALS tanto en ratón como en rata mediante la sobreexpresión de SOD1 mutante (Howland et al. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 1604-09). Los ratones transgénicos que sobreexpresan la forma G93A de SOD1 mutante muestran debilidad y atrofia muscular a los 90 y 100 días de edad, y típicamente mueren cerca de los 130 días de edad (Gurney et al. (1994) *Science* 264: 1772-75). Sin embargo, la patología subyacente inducida por SODG93A, que incluye debilidad de la fuerza de agarre y pérdida de uniones neuromusculares, es significativa tan pronto como a los 50 días de edad (Frey et al. (2000) *J. Neurosci.* 20: 2534-42; Fisher et al. (2004) *Exp. Neuro.* 185: 232-40; Ligon et al. (2005) *NeuroReport* 16: 533-36; Wooley et al. (2005) *Muscle Nerve* 32: 43-50). Las ratas transgénicas que expresan la mutación SODG93A siguen un curso temporal similar de degeneración (Howland et al., citado más arriba). Trabajos recientes han sugerido que el desarrollo de patología no es autónomo de las células, consistente con la hipótesis de que la degeneración de neuronas motoras observada en ALS ocurre a través de múltiples mecanismos, incluyendo la interrupción de la captación y el transporte de factores tróficos por la neurona motora (ver más arriba). Clement y colaboradores han usado ratones quiméricos para mostrar que las células no neuronales de tipo silvestre pueden extender la supervivencia de neuronas motoras que expresan SOD1 mutante (Clement et al. (2003) *Science* 302: 113-17). Estas observaciones han conducido a la investigación de terapias que pueden ralentizar la degeneración neuronal al proporcionar un microambiente óptimo para la supervivencia. Por ejemplo, el tratamiento del ratón SODG93A mediante inyección intramuscular directa de factores de crecimiento expresados viralmente (que incluyen IGF-1, GDNF y VEGF) prolonga la supervivencia del animal (Kaspar et al. (2003) *Science* 301: 839-42; Azzouz et al. (2004) *Nature* 429: 413-17, Wang et al. (2002) *J. Neurosci.* 22: 6920-28). Además, la expresión específica del músculo de una isoforma específica de IGF-1 local (mIGF-1) estabiliza las uniones neuromusculares, aumenta la supervivencia de la neurona motora y retrasa el inicio y la progresión de la enfermedad en el modelo de ratón transgénico SODG93A, lo que indica que los efectos directos sobre el músculo pueden impactar el inicio y la progresión de la enfermedad en animales SOD1 transgénicos (Dobrowolny et al. (2005) *J. Cell Biol* 168: 193-99). Los vínculos entre el hipermetabolismo muscular y la vulnerabilidad de la neurona motora también se han informado en ratones con ALS, lo que respalda la hipótesis de que los defectos en el músculo pueden contribuir a la etiología de la enfermedad (Dupois et al. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 11159-64). Por lo tanto, la mejora del crecimiento muscular debería proporcionar un soporte local mejorado para las neuronas motoras y, por lo tanto, producir beneficios terapéuticos.

La inhibición de la expresión de miostatina conduce tanto a hipertrofia muscular como a hiperplasia (Lee y McPherron, citado más arriba, McPherron et al., citado más arriba). La miostatina regula negativamente la regeneración muscular después de la lesión, y la falta de miostatina en ratones nulos en GDF-8 da como resultado una regeneración muscular acelerada (McCroskery et al., (2005) *J. Cell. Sci.* 118: 3531-41). Los anticuerpos neutralizantes de miostatina aumentan el peso corporal, la masa de músculo esquelético y el tamaño y la fuerza muscular en el músculo esquelético de ratones de tipo silvestre (Whittemore et al. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 300: 965-71) y el ratón *mdx*, un modelo para distrofia muscular (Bogdanovich et al., (2002) *Nature* 420: 418-21; Wagner et al. (2002) *Ann. Neurol.* 52: 832-36). Además, el anticuerpo de miostatina en estos ratones disminuyó el daño al diafragma, un músculo que también se ve

5 comprometido durante la patogénesis de ALS. Se ha formulado la hipótesis de que la acción de los factores de crecimiento, tal como el HGF, sobre el músculo puede deberse a la inhibición de la expresión de miostatina (McCroskery et al., (2005), véase más arriba), ayudando así a cambiar el "vaivén" o el equilibrio, entre la regeneración y la degeneración en una dirección positiva. Por lo tanto, la inhibición de GDF-8 se presenta como un potencial objetivo farmacológico para el tratamiento de ALS, distrofia muscular (MD) y otros trastornos asociados con GDF-8, por ejemplo, trastornos neuromusculares para los cuales es deseable aumentar la masa muscular, su fuerza y tamaño, etc. Con la disponibilidad de modelos animales (ratón y rata) de ALS, es posible probar la terapéutica en dos especies diferentes, aumentando así la confianza de los efectos terapéuticos en humanos *in vivo*.

10 Además de los trastornos neuromusculares en humanos, también existen afecciones relacionadas con el factor de crecimiento asociadas con una pérdida de hueso, tales como osteoporosis y osteoartritis, que afectan predominantemente a las mujeres ancianas y/o posmenopáusicas. Además, las enfermedades y trastornos óseos metabólicos incluyen baja masa ósea debido a la terapia crónica con glucocorticoides, insuficiencia gonadal prematura, supresión de andrógenos, deficiencia de vitamina D, hiperparatiroidismo secundario, deficiencias nutricionales y anorexia nerviosa. Aunque muchas terapias actuales para estas afecciones funcionan inhibiendo la resorción ósea, una terapia que promueva la formación ósea sería un tratamiento alternativo útil. Debido a que GDF-8 juega un papel en el desarrollo óseo y en el desarrollo muscular, la regulación de GDF-8 también es un objetivo farmacológico excelente para el tratamiento de trastornos degenerativos óseos.

20 La solicitud internacional de patente WO2004/037861 A2 describe anticuerpos humanos contra GDF-8 y su uso para tratar trastornos degenerativos de músculo o hueso

25 Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar compuestos y métodos de tratamiento que contribuyan a un aumento general de la masa muscular y/o la resistencia y/o la densidad ósea, etc., particularmente en humanos, y particularmente en aquellos que sufren de ALS y otras enfermedades debilitantes de los músculos, así como trastornos degenerativos de los huesos. La generación de anticuerpos neutralizantes y otras moléculas pequeñas con mayor afinidad por GDF-8 es un excelente enfoque farmacológico para tratar estos trastornos.

30 Sumario de la invención

35 La invención es como se define en las reivindicaciones adjuntas a la misma. Los antagonistas de GDF-8 de la invención son anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos intactos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos), que se denominan aquí "anticuerpos anti-GDF-8" o "anticuerpos contra GDF-8". Como se describe en este documento, un anticuerpo anti-GDF-8 puede reducir, neutralizar y/o antagonizar al menos una actividad asociada a GDF-8 (es decir, "actividad de GDF-8"). La presente invención proporciona así composiciones que comprenden estos anticuerpos contra GDF-8 para uso para tratar diversos trastornos óseos, musculares, de glucosa y adiposos asociados con la actividad de GDF-8. La presente divulgación describe que los antagonistas de GDF-8, por ejemplo, anticuerpos contra GDF-8, son terapéuticos altamente eficaces cuando se usan para tratar animales que padecen ALS, y que la administración de tales anticuerpos reduce el desgaste de los músculos específicos durante la patología de ALS, por ejemplo, diafragma, gastrocnemio, etc. Además, la presente invención describe que estos antagonistas son altamente eficaces para aumentar la masa muscular y la fuerza de agarre en animales afectados por ALS. Como resultado, la descripción enseña que los anticuerpos anti-GDF-8 son composiciones eficaces para tratar trastornos asociados a GDF-8, por ejemplo, ALS, trastornos de desgaste muscular u otros trastornos que resultan de la desregulación de GDF-8.

45 Se describe aquí en un aspecto un método para tratar (por ejemplo, curar, suprimir), mejorar o prevenir (por ejemplo, retrasar o prevenir el inicio, la recurrencia o la recaída de) un trastorno asociado a GDF-8 en un sujeto. El método incluye: administrar al sujeto un antagonista de GDF-8, por ejemplo, un anticuerpo anti-GDF-8, en una cantidad suficiente para tratar o prevenir el trastorno asociado a GDF-8. El antagonista de GDF-8, por ejemplo, el anticuerpo anti-GDF-8, se puede administrar al sujeto solo o en combinación con otras modalidades terapéuticas como se describe en este documento. El anticuerpo contra GDF-8 se puede administrar de forma terapéutica, profiláctica o ambas. En una realización, el sujeto es un mamífero, por ejemplo, un ser humano que padece un trastorno asociado a GDF-8, que incluye, por ejemplo, trastornos óseos y musculares. Preferiblemente, el sujeto es un ser humano. Más preferiblemente, el sujeto es un ser humano que padece un trastorno asociado a GDF-8 como se describe en este documento.

55 Se proporcionan en este documento métodos terapéuticos seguros y eficaces para diagnosticar, pronosticar, monitorizar, cribar, tratar, mejorar y/o prevenir trastornos asociados a GDF-8, por ejemplo, trastornos musculares, trastornos neuromusculares, trastornos degenerativos óseos, metabólicos o trastornos óseos inducidos, trastornos adiposos, trastornos del metabolismo de la glucosa o trastornos relacionados con la insulina que incluyen, pero no se limitan a, homeostasis de la glucosa, diabetes tipo 2, tolerancia alterada a la glucosa, síndrome metabólico (es decir, un síndrome que implica la aparición simultánea de un grupo de condiciones de salud, que pueden incluir resistencia a la insulina, obesidad abdominal, dislipidemia, hipertensión, inflamación crónica, un estado protrombótico, etc., que coloca a una persona en alto riesgo de diabetes tipo 2 y/o enfermedad cardíaca), resistencia a la insulina (por ejemplo, resistencia inducida por trauma, como quemaduras o desequilibrio de nitrógeno), trastornos del tejido adiposo (por ejemplo, obesidad, dislipidemia, enfermedad del hígado graso no alcohólico, etc.), pérdida muscular inducida por VIH, distrofia muscular (incluida la distrofia muscular de Duchenne), esclerosis lateral amiotrófica ("ALS"), atrofia muscular, atrofia de órganos, fragilidad, enfermedad pulmonar obstructiva congestiva, sarcopenia, caquexia, síndromes de pérdida

5 muscular, osteoporosis, osteoartritis, enfermedades óseas metabólicas y trastornos metabólicos óseos (incluida baja masa ósea debido a terapia crónica con glucocorticoides, insuficiencia gonadal prematura, supresión androgénica, deficiencia de vitamina D, hiperparatiroidismo secundario, deficiencias nutricionales y anorexia nerviosa). También se proporcionan métodos terapéuticos seguros y eficaces para diagnosticar, pronosticar, monitorizar, cribar, tratar, mejorar y/o prevenir un trastorno asociado a GDF-8, por ejemplo, un trastorno muscular en vertebrados, particularmente mamíferos, y más particularmente seres humanos. Lo más preferido como trastorno asociado a GDF-8, por ejemplo, trastorno muscular que se diagnostica, pronostica, monitoriza, criba, trata, mejora y/o previene es ALS.

10 También se proporcionan en el presente documento métodos para inhibir la función de GDF-8 *in vivo* o *in vitro*. Estos métodos son útiles para tratar trastornos asociados a GDF-8, por ejemplo, trastornos degenerativos musculares y óseos, particularmente trastornos musculares tales como ALS, y para aumentar la masa muscular y/o la resistencia y/o densidad ósea. Los métodos también son útiles para aumentar la masa muscular y la densidad ósea en animales normales, incluidos, entre otros, los humanos. Los presentes métodos se pueden usar *in vitro* (por ejemplo, en un sistema libre de células, en cultivo, etc.), *ex vivo* o *in vivo*. Por ejemplo, las células que expresan al receptor de GDF-8 pueden cultivarse *in vitro* en un medio de cultivo y ponerse en contacto, por ejemplo, con uno o más anticuerpos anti-GDF-8, por ejemplo, como se describe en este documento. Alternativamente, el método puede realizarse en células presentes dentro de un sujeto, por ejemplo, como parte de un protocolo *in vivo* (por ejemplo, terapéutico o profiláctico).

20 En consecuencia, en un aspecto, la invención presenta un anticuerpo antagonista de GDF-8, que interactúa con, por ejemplo, se une a, y neutraliza y/o inhibe a GDF-8. En particular, la proteína GDF-8 unida por el anticuerpo GDF-8 es GDF-8 de mamífero, por ejemplo, de humano, ovino y no humano. En otra realización, la invención proporciona anticuerpos que se unen a GDF-8 con alta afinidad, por ejemplo, con una Kd de al menos  $10^{-7}$  M, preferiblemente  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-10}$ , más preferiblemente,  $10^{-11}$  M o mayor. La afinidad y la cinética de unión del anticuerpo anti-GDF-8 pueden probarse usando varios métodos bien conocidos, por ejemplo, tecnología de biosensores (Biacore, Piscataway, NJ).

25 En una realización, el anticuerpo anti-GDF-8 (por ejemplo, un anticuerpo intacto o un fragmento de anticuerpo (por ejemplo, un fragmento Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fv o Fv de cadena simple)) es un anticuerpo monoclonal. El anticuerpo puede ser un anticuerpo humano, humanizado, quimérico o generado *in vitro*. El anticuerpo anti-GDF-8 de la invención es un anticuerpo humanizado.

30 Estos anticuerpos anti-GDF-8 pueden usarse para diagnosticar, pronosticar, monitorizar, cribar, tratar, mejorar y/o prevenir trastornos relacionados con el metabolismo muscular, óseo, adiposo y de la glucosa. Un ejemplo no limitante de un anticuerpo anti-GDF-8 se denomina en este documento "RK35" e incluye anticuerpos tanto de ratón como modificados, por ejemplo, formas quiméricas o humanizadas. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos para la región variable de cadena pesada de RK35 de ratón se exponen aquí como la SEQ ID NO: 2 y la SEQ ID NO: 3, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos para la región variable de cadena pesada de RK35 humanizado se exponen aquí como SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 7, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos para la región variable de cadena ligera de RK35 de ratón se exponen aquí como la SEQ ID NO: 4 y la SEQ ID NO: 5, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos para la región variable de cadena ligera de RK35 humanizado se exponen aquí como la SEQ ID NO: 8 y la SEQ ID NO: 9, respectivamente.

40 El anticuerpo de la invención es un anticuerpo humanizado para GDF-8. En una realización más preferida de la invención, el anticuerpo está compuesto por el dominio VH (variable pesado) expuesto en la SEQ ID NO: 7 y el dominio VL (variable ligero) expuesto en la SEQ ID NO: 9. También se describen en la presente memoria realizaciones adicionales que contienen uno o más dominios VH o VL enumerados en la Tabla 1.

45 Otras realizaciones de la presente divulgación comprenden un fragmento H3 de RK35, es decir, la secuencia expuesta como la SEQ ID NO: 12. En otra realización más de la presente divulgación, un antagonista de GDF-8 comprende uno, dos o tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) de una región variable de cadena pesada de un anticuerpo descrito en la presente memoria con secuencias seleccionadas de las SEQ ID NOs: 10-12 y 20-22. En otra realización adicional de la presente descripción, un antagonista comprende una, dos o tres CDR de una región variable de cadena ligera de un anticuerpo descrito en la presente con secuencias seleccionadas de las SEQ ID NOs: 13-15 y 23-25. En aún otra realización descrita y/o reivindicada en la presente memoria, el anticuerpo comprende una, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR con secuencias seleccionadas de las SEQ ID NOs: 10-15 y 20-25.

50 Las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo anti-GDF-8 de la invención pueden ser de longitud completa (por ejemplo, un anticuerpo puede incluir al menos una, y preferiblemente dos, cadenas pesadas completas, y al menos una, y preferiblemente dos, cadenas ligeras completas) o pueden incluir un fragmento de unión a antígeno (por ejemplo, un fragmento Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fv o Fv de cadena simple ("scFv")). En otras realizaciones, la región constante de cadena pesada del anticuerpo se elige, por ejemplo, de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD e IgE, particularmente se elige, por ejemplo, de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, más particularmente, IgG1 (por ejemplo, IgG1 humana). En otra realización, la región constante de cadena ligera del anticuerpo se selecciona, por ejemplo, de kappa o lambda, particularmente kappa (por ejemplo, kappa humana). En una realización, la región constante está alterada, por ejemplo, mutada, para modificar las propiedades del anticuerpo (por ejemplo, para aumentar o disminuir uno o más de: la unión al receptor de Fc, glicosilación del anticuerpo, la cantidad de residuos de cisteína, la función de la célula efectora, o la función del complemento). Por ejemplo, la región constante de IgG1 humana puede mutarse en uno o más residuos, por

ejemplo, uno o más de los residuos 117 y 120 de la SEQ ID NO: 19. En una realización, el anticuerpo anti-GDF-8 comprende la región constante de IgG1 humana mostrada en la SEQ ID NO: 19. En otra realización, el anticuerpo anti-GDF-8 comprende una secuencia kappa humana, por ejemplo, la secuencia mostrada como la SEQ ID NO: 17.

5 En otra realización, la invención proporciona anticuerpos contra GDF-8 como nuevos fragmentos de anticuerpos que se unen a GDF-8 y retienen la capacidad de neutralizar o reducir la actividad de GDF-8. En una realización preferida, pero no limitante, de la invención, el fragmento de anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en un diacuerpo, un fragmento Fab, un fragmento F(ab')<sub>2</sub>, un fragmento scFV y un fragmento Fv. En una realización más preferida descrita y/o reivindicada en la presente memoria, el fragmento de anticuerpo está codificado por un polinucleótido seleccionado de las SEQ ID NOs: 2, 4, 6 u 8. El fragmento de anticuerpo puede comprender una secuencia de aminoácidos seleccionada de un conjunto de secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NOs: 10-15 y 20-25. En otra realización preferida descrita y/o reivindicada en el presente documento, se proporcionan nuevos fragmentos de anticuerpo que difieren en secuencia (por ejemplo, debido a la redundancia del código genético) de las secuencias enumeradas en la Tabla 1, pero retienen la capacidad de unirse a GDF-8 y neutralizar o reducir la actividad de GDF-8.

15 En otra realización, el anticuerpo anti-GDF-8 puede comprender al menos una, dos, tres o cuatro regiones de unión a antígeno, por ejemplo, regiones variables, que tienen una secuencia de aminoácidos como se enumera en la Tabla 1 (SEQ ID NOs: 3 o 7 para VH, y/o SEQ ID NO: 5 o 9 para VL), o una secuencia sustancialmente idéntica a la misma (por ejemplo, una secuencia de al menos aproximadamente 85%, 90%, 95%, 99% o más idéntica a la misma, o que difiere en no más de 1, 2, 5, 10 o 15 residuos de aminoácidos de la SEQ ID NOs: 3, 5, 7 o 9). El anticuerpo puede incluir un dominio VH y/o VL codificado por un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos como se enumera en la Tabla 1 (SEQ ID NOs: 2 o 6 para VH, y/o SEQ ID NOs: 4 u 8 para VL), o una secuencia sustancialmente idéntica a la misma (por ejemplo, una secuencia de al menos aproximadamente 85%, 90%, 95%, 99% o más idéntica a la misma, o que difiera en no más de 3, 6, 15, 30 o 45 nucleótidos de las SEQ ID NOs: 2, 4, 6 u 8). El anticuerpo puede comprender una, dos o tres CDR de una región variable de cadena pesada que tiene secuencias de aminoácidos enumeradas en la Tabla 1 (SEQ ID NOs: 10-12 y 20-22), o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma (por ejemplo, una secuencia al menos aproximadamente 85%, 90%, 95%, 99% o más idéntica a la misma, y/o que tiene una o más sustituciones, por ejemplo, sustituciones conservadas). Además, el anticuerpo puede comprender al menos una, dos o tres CDR de una región variable de cadena ligera que tiene secuencias de aminoácidos enumeradas en la Tabla 1 (SEQ ID NOs: 13-15 y 23-25), o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma (por ejemplo, una secuencia de al menos aproximadamente 85%, 90%, 95%, 99% o más idéntica a la misma, y/o que tiene una o más sustituciones, por ejemplo, sustituciones conservadas). El anticuerpo también puede comprender una, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR de regiones variables de cadena pesada y ligera que tienen secuencias de aminoácidos como se enumeran en la Tabla 1 (SEQ ID NOs: 10-12 y 20-22 para las CDR de VH; y las SEQ ID NOs: 13-15 y 23-25 para las CDR de VL), o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma (por ejemplo, una secuencia al menos aproximadamente 85%, 90%, 95%, 99% o más idéntica a la misma, y/o una o más sustituciones, por ejemplo, sustituciones conservadas).

40 El anticuerpo anti-GDF-8 descrito y/o reivindicado en la presente memoria puede comprender una región constante de IgG1 humana que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 19 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma (por ejemplo, una secuencia al menos aproximadamente 85%, 90%, 95%, 99% o más idéntica a la misma, o que difiere en no más de 1, 2, 5, 10, 50 o 100 residuos de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19). El anticuerpo anti-GDF-8 también puede comprender una cadena constante kappa humana, por ejemplo, una cadena constante kappa humana que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 17 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma (por ejemplo, una secuencia al menos aproximadamente 85%, 90%, 95%, 99% o más idéntica a la misma, o que difiere en no más de 1, 2, 5, 10, 20 o 50 residuos de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17). Además, el anticuerpo puede comprender una región constante de IgG1 humana y una cadena constante de kappa humana como se describe en este documento.

50 También se describen y/o reivindicán en la presente memoria anticuerpos codificados por polinucleótidos expuestos en las SEQ ID NOs: 2, 4, 6 u 8. Se proporcionan anticuerpos codificados por secuencias de polinucleótidos que hibridan en condiciones rigurosas con los polinucleótidos establecidos en las SEQ ID NOs: 2, 4, 6 u 8. En otra realización preferida, los descritos y/o reivindicados en la presente memoria son anticuerpos codificados por polinucleótidos, que difieren de las secuencias indicadas en las SEQ ID NOs: 2, 4, 6 u 8, pero debido a la degeneración del código genético, codifican una secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NOs: 3, 5, 7, 9 o 10-15.

55 El antagonista de GDF-8, por ejemplo, un anticuerpo anti-GDF-8, puede someterse a derivación o unirse a otra molécula funcional, por ejemplo, otro péptido o proteína (por ejemplo, un fragmento Fab). Por ejemplo, una proteína de fusión o un anticuerpo, o porción de unión a antígeno, puede estar funcionalmente unida (por ejemplo, por acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otro tipo) a una o más entidades moleculares, tales como un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico o multiespecífico), toxinas, radioisótopos, agentes citotóxicos o citostáticos, entre otros.

60 Un aspecto adicional de la invención proporciona como antagonistas de GDF-8 polinucleótidos purificados y aislados que codifican los anticuerpos anti-GDF-8 de la invención. En una realización, la invención proporciona polinucleótidos que comprenden una secuencia que codifica una VH (SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 7), VL (SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 9), y/o CDR (SEQ ID NOs: 10-15 y 20-25) como se enumeran en la Tabla 1. También se proporcionan aquí

5 polinucleótidos que hibridan en condiciones rigurosas con ácidos nucleicos que codifican una VH, VL o CDR (SEQ ID NOs: 3, 5, 7, 9, 10-15 o 20-25) como se enumera en la Tabla 1. También se proporcionan aquí polinucleótidos que comprenden las SEQ ID NOs: 2, 4, 6 u 8 o fragmentos de las SEQ ID NOs: 2, 4, 6 u 8. También se proporcionan polinucleótidos que hibridan bajo condiciones rigurosas con las SEQ ID NOs: 2, 4, 6 u 8. Otro aspecto de la invención proporciona células huésped y vectores que comprenden los polinucleótidos de la invención como antagonistas de GDF-8.

10 Los anticuerpos de la invención poseen varias propiedades útiles. En primer lugar, los anticuerpos son capaces de unirse a GDF-8 maduro con alta afinidad. En segundo lugar, los anticuerpos descritos inhiben la actividad de GDF-8 *in vitro* e *in vivo*. En tercer lugar, los anticuerpos descritos inhiben la actividad de GDF-8 asociada con la regulación negativa de la masa del músculo esquelético y la densidad ósea. En cuarto lugar, los anticuerpos descritos son un tratamiento efectivo para trastornos musculares, particularmente ALS. Estos anticuerpos tienen muchos usos adicionales, que incluyen el diagnóstico, el pronóstico, la monitorización, el cribado, el tratamiento, la mejora y/o la prevención de trastornos asociados a GDF-8, por ejemplo, trastornos asociados a los músculos y/u óseos.

15 Otros aspectos de la invención proporcionan composiciones que comprenden un anticuerpo anti-GDF-8 de la invención, y el uso de tales composiciones para inhibir o neutralizar GDF-8 en animales, particularmente en humanos u otros animales con trastornos musculares tales como ALS. Los anticuerpos de la invención también pueden usarse en un trastorno asociado a GDF-8, por ejemplo, en un trastorno en el que es deseable aumentar el tejido muscular o la densidad ósea. Por ejemplo, los anticuerpos anti-GDF-8 pueden usarse en terapias y composiciones para reparar el músculo dañado, por ejemplo, miocardio, diafragma, etc. Los trastornos y enfermedades asociados con GDF-8 a modo de ejemplo, tratados por los métodos divulgados y composiciones incluyen trastornos musculares y neuromusculares como la distrofia muscular (incluida la distrofia muscular de Duchenne); la esclerosis lateral amiotrófica; atrofia muscular; atrofia orgánica; fragilidad; síndrome de túnel; enfermedad pulmonar obstructiva congestiva (EPOC); sarcopenia, caquexia y otros síndromes de desgaste muscular; trastornos del tejido adiposo (por ejemplo, obesidad); diabetes tipo 2; intolerancia a la glucosa; síndromes metabólicos (por ejemplo, síndrome X); resistencia a la insulina (que incluye resistencia inducida por trauma, por ejemplo, quemaduras o desequilibrio de nitrógeno) y enfermedades degenerativas de los huesos (por ejemplo, osteoartritis y osteoporosis). En una realización preferida, pero no limitante, de la invención, una composición que contiene un anticuerpo anti-GDF-8 se usa en un método para tratar, reducir o mejorar ALS.

20 En otro aspecto, la invención proporciona composiciones, por ejemplo, composiciones farmacéuticas, que incluyen un vehículo farmacéuticamente aceptable y al menos un anticuerpo anti-GDF-8 reivindicado en este documento. En una realización, las composiciones, por ejemplo, composiciones farmacéuticas, comprenden una combinación de dos o más de los anticuerpos anti-GDF-8 antes mencionados o fragmentos de los mismos. También están dentro del alcance de la invención las combinaciones de un anticuerpo anti-GDF-8 con un agente terapéutico, por ejemplo, inhibidores del factor de crecimiento, inmunosupresores, agentes antiinflamatorios (por ejemplo, agentes antiinflamatorios sistémicos), inhibidores metabólicos, inhibidores de enzimas, y/o agentes citotóxicos o citostáticos.

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

30 Además del uso en el tratamiento de diversas enfermedades o trastornos, los anticuerpos anti-GDF-8 pueden usarse como herramientas de diagnóstico para detectar cuantitativamente o cualitativamente la proteína GDF-8 o los fragmentos de la proteína en una muestra biológica. La presencia o cantidad de proteína GDF-8 detectada se puede correlacionar con una o más de las afecciones médicas enumeradas aquí. Por lo tanto, aquí se proporcionan métodos para diagnosticar, pronosticar, monitorizar y/o detectar trastornos asociados a GDF-8.

35 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para detectar la presencia de GDF-8 en una muestra *in vitro* (por ejemplo, una muestra biológica, tal como suero, plasma, tejido, biopsia). El presente método se puede usar para diagnosticar un trastorno asociado a GDF-8, por ejemplo, un trastorno asociado al metabolismo óseo, muscular, adiposo o de la glucosa. El método incluye: (i) poner en contacto la muestra o una muestra de control con un anticuerpo anti-GDF-8 como se describe en este documento; y (ii) detectar la formación de un complejo entre el anticuerpo anti-GDF-8 y la muestra o la muestra de control, donde un cambio sustancialmente significativo en la formación del complejo en la muestra con respecto a la muestra control es indicativo de la presencia de GDF-8 en la muestra.

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

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

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

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

Los anticuerpos de la invención también son útiles en métodos de monitorización de la gravedad de un trastorno asociado a GDF-8, por ejemplo, trastorno muscular, trastorno neuromuscular, trastorno degenerativo óseo, trastorno óseo metabólico o inducido, trastorno adiposo, trastorno del metabolismo de la glucosa, o trastorno relacionado con la insulina. En una realización preferida, pero no limitativa, el método comprende las etapas de: (a) obtener una primera muestra tomada de un paciente de interés en un primer punto de tiempo; (b) poner en contacto la primera muestra con un anticuerpo anti-GDF-8 como se describe en este documento; (c) determinar el nivel de GDF-8 en la primera muestra; (d) obtener una segunda muestra tomada del paciente en un segundo punto de tiempo; (e) poner en contacto la segunda muestra con un anticuerpo anti-GDF-8 como se describe en este documento; (f) determinar el nivel de GDF-8 en la segunda muestra; y (g) comparar los niveles de GDF-8 en la primera y segunda muestras, donde un aumento, disminución o similitud en el nivel de GDF-8 en la segunda muestra indica si el trastorno asociado con GDF-8 ha cambiado en severidad. En una realización, se usa un método de monitorización de la invención para monitorizar ALS, y una disminución en el nivel de GDF-8 en la segunda muestra indica que la ALS ha disminuido en severidad.

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

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

5 Los métodos para administrar o dirigir un antagonista de la invención, por ejemplo, un anticuerpo, a una célula que expresa GDF-8 *in vivo* también se describen en este documento.

10 Los kits que comprenden los antagonistas de GDF-8, por ejemplo, los anticuerpos anti-GDF-8, de la invención para usos terapéuticos y de diagnóstico también se describen en este documento.

15 Los objetos adicionales de la invención se expondrán en la siguiente descripción. Diversos objetos, aspectos y ventajas de la invención se entenderán y alcanzarán por medio de los elementos y combinaciones señalados particularmente en las reivindicaciones.

20 Debe entenderse que tanto la descripción general anterior como la siguiente descripción detallada son solo ilustrativas y explicativas, y no son restrictivas de la invención tal como se reivindica.

Breve descripción de los dibujos

25 FIG. 1. Caracterización del anticuerpo anti-GDF-8 RK35. A. Unión directa del anticuerpo RK35 a GDF-8, medida en un ensayo ELISA con GDF-8 biotinilado. La afinidad de unión del anticuerpo RK35 (círculos) por GDF-8 se determinó que era 4 nM. La IgG de control no muestra unión apreciable (cuadrados). B. Efecto del anticuerpo RK35 sobre la unión de GDF-8 a su receptor de alta afinidad. En un ELISA de competición que usa el receptor de alta afinidad GDF-8, se usó ActRIIB para medir la actividad inhibidora de GDF-8 de RK35. La unión de GDF-8 biotinilado a la proteína quimérica humana inmovilizada ActRIIB fusionada a la región constante de IgG humana (Fc) se evaluó en ausencia (diamantes) o presencia de diversas concentraciones del mAb RK35, ActRIIB soluble o IgG de control. El receptor soluble ActRIIB-Fc (cuadrados) y la IgG de ratón irrelevante (triángulos) se usaron como controles positivos y negativos, respectivamente. RK35 (círculos) bloqueó la unión de GDF-8 biotinilado a ActRIIB inmovilizado con una  $IC_{50} \sim 2,5$  nM. C. Inhibición de la transducción de señal inducida por GDF-8. Las células de rhabdomioma que expresan un gen de fusión de promotor de TGF- $\beta$ -luciferasa se trataron con 10 ng/mL de GDF-8 en ausencia (cuadrados) o presencia (círculos) de concentraciones variables de anticuerpo RK35. RK35 redujo la inducción de GDF-8 de la actividad luciferasa de una manera sensible a la dosis, con una  $IC_{50}$  de 0,2 nM. La señal de fondo (diamantes) se midió sin adición de GDF-8.

35 FIG. 2. La inhibición de la miostatina conduce a un aumento del peso corporal y al aumento de la masa muscular tanto en ratones SODG93A como en ratas. A. Pesos corporales de ratones SODG93A tratados con RK35 (cuadrados) ( $n = 11$ ) y tratados con PBS (diamantes) ( $n = 11$ ) y ratones de control de camada tratados con PBS (tipo silvestre) (triángulos) ( $n = 9$ ). B. Pesos corporales de ratas SODG93A machos (círculos) y hembras (triángulos) tratadas con RK35 y machos (cuadrados) y hembras (diamantes) tratadas con PBS ( $n = 10$  por grupo). C. Masa muscular de ratones SODG93A tratados con RK35 y PBS y ratones de control de camada tratados con PBS ( $n = 9-12$ ) durante la enfermedad en estadio temprano. Se determinaron los pesos húmedos para los músculos gastrocnemio (gastroc), tibial craneal (tibial), cuádriceps (cuád) y diafragma (diafragma) de ratones de 88 días de edad tratados con PBS (barras negras), ratones SODG93A tratados con PBS (blanco barras), y ratones SODG93A tratados con RK35 (barras grises). D. Masa muscular de ratas SODG93A, tratadas con PBS (barras blancas) o RK35 (barras grises), en la etapa temprana de la enfermedad ( $\sim 95$  días) ( $n = 7$  por grupo). E. Masa muscular de ratones de tipo silvestre tratados con PBS (barras negras), ratones SODG93A tratados con PBS (barras blancas) y ratones SODG93A tratados con RK35 (barras grises) en la etapa terminal de la enfermedad ( $\sim 134$  días). F. Masa muscular de ratas SODG93A, tratadas con PBS (barras blancas) o RK35 (barras grises) en la etapa terminal de la enfermedad ( $\sim 128$  días). Los asteriscos (\*) indican diferencias estadísticas ( $p < 0,05$ ) entre los grupos indicados.

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

45 FIG. 4. Efectos de la inhibición de la miostatina sobre la estructura y la función muscular en roedores SODG93A. La tinción con hematoxilina y eosina del músculo gastrocnemio medial de ratones a los 88 días indica una atrofia significativa en (B) ratones SODG93A tratados con PBS, en comparación con (A) ratones SODG93A de tipo silvestre o (C) tratados con RK35. La tinción con hematoxilina y eosina del músculo gastrocnemio medial de ratones SODG93A tratados con PBS y tratados con RK35 en el estadio final indica tanto atrofia muscular significativa como núcleos situados centralmente (puntas de flecha) en comparación con (D) gastrocnemio de ratón de tipo silvestre. Tinción con

hematoxilina y eosina del diafragma de (G) ratones de tipo silvestre tratados con PBS y (H) ratones SODG93A tratados con PBS o (I) tratados con RK35, respectivamente, en la etapa terminal. Los ejemplos de miofibras atroficas están marcados ("a"). El asterisco en el panel H denota la división de la fibra. Las barras mostradas denotan 50  $\mu\text{m}$  en escala en los paneles A-F y 25  $\mu\text{m}$  en los paneles G-I. Panel J: Patrón de interferencia de EMG que muestra ráfagas inspiratorias, registradas a partir de los músculos del diafragma de ratas silvestres tratadas con PBS (WT + PBS) o ratas SODG93A tratadas con PBS (SOD + PBS) o RK35 (SOD + RK35). Panel K: tasas de pico de ráfagas de EMG (en Hz) de los músculos del diafragma de ratas de tipo silvestre (n = 4), y de ratas SODG93A tratadas con vehículo (PBS, n = 9) o RK35 (n = 8). Los asteriscos (\*) denotan una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre los grupos indicados.

FIG. 5. El tratamiento con RK35 muestra la disminución en el diámetro de la fibra muscular en el músculo gastrocnemio a través de la enfermedad en etapa temprana en ratones SODG93A, y en el diafragma a través de la enfermedad en etapa terminal. Los diámetros de fibra se midieron por morfometría en gastrocnemio, el músculo de ratones SODG93A tratados con PBS (A) y tratados con RK35 (B) y ratones de tipo silvestre tratados con PBS (C) a los 88 días. Los promedios fueron significativamente diferentes por ANOVA ( $p < 0,0001$ ); Las comparaciones por pares mediante la prueba posterior de comparación múltiple de Tukey también fueron significativas ( $p < 0,001$ ). En la etapa terminal, no se observaron diferencias significativas en la distribución de fibra en el músculo gastrocnemio de ratones SODG93A tratados con PBS y tratados con RK35 (datos no mostrados). D. Análisis de los diámetros de las fibras del músculo del diafragma de los ratones SODG93A tratados con PBS y tratados con RK35 en etapa terminal en comparación con los ratones de control de la misma edad de tipo silvestre. El músculo del diafragma de ratones SODG93A tratados con RK35 muestra una distribución del diámetro de fibra intermedia entre ratones SODG93A tratados con PBS y ratones de control de tipo silvestre en la etapa terminal. Los promedios fueron significativamente diferentes por ANOVA ( $p < 0,0001$ ); las comparaciones por pares mediante la prueba posterior de comparación múltiple de Tukey también fueron significativas ( $p < 0,01$ ). Se analizaron tres músculos por grupo; se tomaron medidas lineales del diámetro máximo del eje menor de al menos doscientas fibras, utilizando el software Zeiss Axiovision. Los diámetros de fibra se agruparon en intervalos de 20  $\mu\text{m}$ , y se generaron histogramas de frecuencia para cada grupo muscular.

FIG. 6. Efecto del tratamiento anti-miostatina en la pérdida de neuronas motoras en el asta ventral de la médula espinal. Se muestran análisis estereológicos de neuronas motoras de gran tamaño (área mayor a 300 ( $\mu\text{m}^2$ ) de las regiones L3-5 del asta ventral de ratones SODG93A tratados con PBS (SOD + PBS) o RK35 (SOD + RK35) en enfermedad en etapa temprana (A) y en etapa terminal (C) en comparación con ratones de edad similar (WT + PBS). El tratamiento con RK35 mostró una tendencia a revertir la pérdida de neuronas motoras ( $p = 0,08$ ) en la enfermedad en etapa temprana (A). Los recuentos individuales de neuronas motoras sanas grandes con nucléolos visibles se realizaron en secciones L3-5 teñidas con NISSL de ratones SODG93A tratados con PBS o RK35 en enfermedad (B) etapa temprana y (D) en etapa terminal en comparación con ratones de tipo silvestre de la misma edad. Para cada sección, se contaron las dos astas ventrales (un total de 20 astas ventrales por animal) y los datos se representan como el número promedio de neuronas motoras grandes por asta ventral. Los asteriscos (\*) indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,001$ ) entre los grupos indicados. Imágenes representativas de secciones de asta ventral teñidas con NISSL (20 aumentos) se muestran para ratones de tipo silvestre (E y H) tratados con PBS, ratones SODG93A (F e I) tratados con PBS y ratones SODG93A (G y J) tratados con RK35 analizados con enfermedad en etapa temprana (88 días) (E-G) y en etapa terminal (134 días; H-J). La barra indica una escala de 200  $\mu\text{m}$ .

FIG. 7. Mapeo de epítomos de GDF-8 para el anticuerpo RK35. Los sitios de unión en GDF-8 para RK35 se identificaron usando péptidos solapantes de 13 aminoácidos de GDF-8 humano. Los sitios de contacto de RK35 con GDF-8 están en negrita.

FIG. 8. Alineación de las regiones variables de cadena ligera y cadena pesada de RK35 (VL y VH, respectivamente) con las estructuras de línea germinal humana DPK9 y DP-47, respectivamente. Los aminoácidos de las cadenas variables de RK35 murino (MRK35) que se cambian en las regiones de RK35 humanizadas (HuRK35) se designan con un asterisco (\*) y están en negrita; las regiones determinantes de complementariedad de RK35 están enmarcadas y subrayadas.

Descripción detallada de la invención

## I. Definiciones

"Anticuerpo", como se usa en el presente documento, se refiere a una inmunoglobulina o una parte de la misma, y abarca cualquier polipéptido que comprende un sitio de unión al antígeno independientemente de la fuente, la especie de origen, el método de producción y las características. Para los fines de la presente invención, también incluye, a menos que se indique lo contrario, fragmentos de anticuerpos tales como Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fv, scFv, diacuerpos y otros fragmentos de anticuerpo que conservan la función de unión al antígeno. Los anticuerpos pueden elaborarse, por ejemplo, mediante técnicas de hibridoma tradicionales, métodos de ADN recombinante o técnicas de presentación en fagos usando bibliotecas de anticuerpos. Para otras diversas técnicas de producción de anticuerpos, véase *Antibodies: A Laboratory Manual*, eds. Harlow et al., Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.

- 5 El término "dominio de unión al antígeno" se refiere a la parte de una molécula de anticuerpo que comprende el área que se une específicamente o es complementaria a una parte o la totalidad de un antígeno. Cuando un antígeno es grande, un anticuerpo solo puede unirse a una parte particular del antígeno. El "epitopo" o "determinante antigénico" es una porción de una molécula de antígeno que es responsable de las interacciones con el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo. Un dominio de unión al antígeno puede proporcionarse por uno o más dominios variables de anticuerpo (por ejemplo, el denominado fragmento de anticuerpo Fd que consiste en un dominio VH). Un dominio de unión al antígeno puede comprender una región variable de cadena ligera de anticuerpo (VL) y una región variable de cadena pesada de anticuerpo (VH).
- 10 El término "GDF-8" se refiere a un factor 8 de crecimiento y diferenciación específico, pero no a otros factores que están estructuralmente o funcionalmente relacionados con GDF-8, por ejemplo, BMP-11 y otros factores que pertenecen a la superfamilia de TGF- $\beta$ . El término se refiere a la forma precursora no procesada de longitud completa de GDF-8, así como a las formas maduras y del propéptido que resultan de la escisión postraducciona. El término también se refiere a cualquiera de los fragmentos y variantes de GDF-8 que mantengan al menos algunas actividades biológicas asociadas con GDF-8 maduro, tal como se discute en la presente memoria, incluidas las secuencias que se han modificado. La secuencia de aminoácidos de GDF-8 humano maduro se proporciona en la SEQ ID NO: 1. La presente invención se refiere a GDF-8 de todas las especies de vertebrados, que incluye, pero no se limita a, humano, bovino, pollo, ratón, rata, porcino, ovino, pavo, babuino y pez (para información de la secuencia, véase, por ejemplo, McPherron et al., citado más arriba).
- 20 El término "actividad de GDF-8" se refiere a una o más de las actividades fisiológicamente morfogénicas o reguladoras del crecimiento asociadas con la proteína GDF-8 activa. Por ejemplo, el GDF-8 activo es un regulador negativo de la masa muscular esquelética. El GDF-8 activo también puede modular la producción de enzimas específicas de músculo (por ejemplo, creatina quinasa), estimular la proliferación de mioblastos y modular la diferenciación de preadipocitos a adipocitos. Los ejemplos de procedimientos para medir la actividad de GDF-8 *in vivo* e *in vitro* se exponen en los Ejemplos.
- 25 El término "antagonista de GDF-8" o "inhibidor de GDF-8" incluye cualquier agente capaz de inhibir la actividad, expresión, procesamiento o secreción de GDF-8. Dichos inhibidores incluyen macromoléculas y moléculas pequeñas, por ejemplo, proteínas, anticuerpos, péptidos, peptidomiméticos, ARNip, ribozimas, oligonucleótidos antisentido, ARN bicatenario y otras moléculas pequeñas que inhiben GDF-8. Un antagonista de GDF-8 incluye, además de los anticuerpos proporcionados en este documento, cualquier anticuerpo que inhiba eficazmente GDF-8, incluyendo anticuerpos con alta especificidad para unirse a GDF-8 (por ejemplo, anticuerpos con baja afinidad por otros miembros de la superfamilia de TGF- $\beta$  (por ejemplo, BMP-11)). Las variantes, que incluyen variantes humanizadas, de estos anticuerpos se contemplan en los métodos para diagnosticar, pronosticar, monitorizar, tratar, mejorar y prevenir de la invención. Se dice que tales inhibidores "inhiben", "disminuyen" o "reducen" la actividad biológica de GDF-8.
- 30 Los términos "neutralizar", "que neutraliza" y sus equivalentes se refieren a una reducción o eliminación drástica de la actividad de GDF-8 en relación con la actividad de GDF-8 en ausencia del mismo inhibidor. Por ejemplo, se puede decir que una reducción del 75-100% de la actividad "neutraliza" la actividad de GDF-8.
- 40 El término "tratamiento" se usa de forma intercambiable en la presente memoria con el término "método terapéutico" y se refiere tanto a tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas/preventivas. Aquellos que necesitan tratamiento pueden incluir individuos que ya tienen un trastorno médico particular, así como aquellos que finalmente pueden adquirir el trastorno (es decir, aquellos que necesitan medidas preventivas).
- 45 El término "aislado" se refiere a una molécula que está sustancialmente separada de su entorno natural. Por ejemplo, una proteína aislada es una que está sustancialmente separada de la fuente de células o tejidos de la que se deriva.
- 50 El término "purificado" se refiere a una molécula que está sustancialmente libre de otro material que se asocia con la molécula en su entorno natural. Por ejemplo, una proteína purificada está sustancialmente libre del material celular u otras proteínas de la célula o tejido del que se deriva. El término se refiere a preparaciones en las que la proteína aislada es suficientemente pura para administrarse como una composición terapéutica, o al menos 70% a 80% (p/p) pura, más preferiblemente, al menos 80%-90% (p/p) pura, aún más preferiblemente, 90-95% pura; y, más preferiblemente, al menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% (p/p) pura.
- 55 El término "dosis efectiva", "dosis terapéuticamente efectiva", "cantidad efectiva" o similares se refiere a la cantidad del compuesto que da como resultado una mejoría de los síntomas en un paciente o un resultado biológico deseado (por ejemplo, aumento de masa del músculo esquelético y/o de la densidad ósea). Tal cantidad debería ser suficiente para reducir la actividad de GDF-8 asociada con la regulación negativa de la masa del músculo esquelético y la densidad ósea o con la homeostasis de la glucosa y el metabolismo adiposo. La cantidad efectiva se puede determinar como se describe en el presente documento.
- 60 Un "trastorno asociado con actividad de GDF-8", "trastorno asociado con GDF-8", "trastorno asociado a GDF-8" o similar se refiere a trastornos que pueden ser causados, en parte o en su totalidad, por desregulación de (por ejemplo, aumento o disminución anormal) GDF-8 (y/o actividad de GDF-8) y/o trastornos que pueden tratarse, mejorarse,
- 65

prevenirse, diagnosticarse, pronosticarse o monitorizarse regulando y/o controlando GDF-8 (y/o la actividad de GDF-8). Los trastornos asociados a GDF-8 incluyen trastornos musculares, trastornos neuromusculares, trastornos degenerativos óseos, trastornos óseos metabólicos o inducidos, trastornos adiposos, trastornos del metabolismo de la glucosa o trastornos relacionados con la insulina. Un trastorno asociado a GDF-8 preferido de la invención es la esclerosis lateral amiotrófica (ALS).

El término "molécula pequeña" se refiere a compuestos que no son macromoléculas (véase, por ejemplo, Karp (2000) *Bioinformatics Ontology* 16: 269-85, Verkman (2004) *AJP-Cell Physiol.* 286: 465-74). Por lo tanto, a menudo se consideran moléculas pequeñas a los compuestos que tienen menos de mil daltons (por ejemplo, Voet y Voet, *Biochemistry*, 2ª ed., Ed. N. Rose, Wiley and Sons, Nueva York, 14 (1995)). Por ejemplo, Davis et al. ((2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 5981-86) usan la frase molécula pequeña para indicar folatos, metotrexato y neuropéptidos, mientras que Halpin y Harbury ((2004) *PLoS Biology* 2: 1022-30) usan la frase para indicar productos génicos de moléculas pequeñas, por ejemplo, ADN, ARN y péptidos. Los ejemplos de moléculas pequeñas naturales incluyen, pero no se limitan a, colesterol, neurotransmisores y ARNip; las moléculas pequeñas sintetizadas incluyen, pero no se limitan a, diferentes sustancias químicas enumeradas en numerosas bases de datos de moléculas pequeñas comercialmente disponibles, por ejemplo, FCD (Fine Chemicals Database), SMID (Small Molecule Interaction Database), ChEBI (Chemical Entities of Biological Interest) y CSD (Cambridge Structural Database) (véase, por ejemplo, Alfaro et al. (2005) *Nuc. Acids Res. Database Issue* 33: D416-24).

## II. Anticuerpos contra GDF-8 y fragmentos de anticuerpos

### A. Anticuerpo RK35 humanizado y de ratón

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

El ejemplo de anticuerpo de la divulgación a la que se hace referencia en este documento como "RK35" posee características únicas y beneficiosas. En primer lugar, este anticuerpo y fragmentos del anticuerpo son capaces de unirse a GDF-8 maduro con alta afinidad. En segundo lugar, el anticuerpo y los fragmentos del anticuerpo descritos y/o reivindicados en la presente memoria inhiben la actividad de GDF-8 *in vitro* e *in vivo* como se demuestra, por ejemplo, mediante la inhibición de la unión de ActRIIB y los ensayos de genes informadores. En tercer lugar, el anticuerpo y los fragmentos del anticuerpo y anticuerpos divulgados y/o reivindicados son útiles para tratar síntomas asociados con un trastorno asociado a GDF-8, por ejemplo, trastornos musculares, particularmente ALS, como se demuestra, por ejemplo, aumentando la masa muscular en ratones SOD mutantes tratados.

En un ejemplo de realización, los antagonistas de GDF-8 son anticuerpos que se unen eficazmente a GDF-8 e inhiben una o más actividades asociadas a GDF-8. Un experto en la técnica reconocerá que los anticuerpos de la invención pueden usarse para detectar, medir e inhibir proteínas GDF derivadas de diversas especies, por ejemplo, las descritas en la presente memoria. El porcentaje de identidad se determina mediante algoritmos de alineación estándar tales como, por ejemplo, Basic Local Alignment Tool (BLAST) descrito en Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-10, el algoritmo de Needleman et al. (1970) *J. Mol. Biol.* 48: 444-53, o el algoritmo de Meyers et al. (1988) *Comput. Appl. Biosci.* 4: 11-17. En general, el anticuerpo y los fragmentos de anticuerpo descritos y/o reivindicados en la presente memoria pueden usarse con cualquier proteína que retiene actividad biológica sustancial de GDF-8 y comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 70%, 80%, 90%, 95%, o más idéntica a cualquier secuencia de al menos 100, 80, 60, 40, 20 o 15 aminoácidos contiguos de la forma madura de GDF-8 expuesta en la SEQ ID NO: 1.

### B. Dominios variables de anticuerpos

Los anticuerpos intactos, también conocidos como inmunoglobulinas, son típicamente proteínas glucosiladas tetrámeras compuestas de dos cadenas ligeras (L) de aproximadamente 25 kDa cada una, y dos cadenas pesadas (H) de aproximadamente 50 kDa cada una. Existen dos tipos de cadenas ligeras, denominadas lambda y kappa, en los anticuerpos. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de las cadenas pesadas, las inmunoglobulinas se asignan a cinco clases principales: A, D, E, G y M, y varias de ellas se pueden dividir en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Cada cadena ligera está compuesta por un dominio variable (V) en el terminal N (VL) y un dominio constante (C) (CL). Cada cadena pesada se compone de un dominio V (VH) en el terminal N, tres o cuatro dominios C (CH) y una región bisagra. El dominio CH más proximal a VH se designa CH1. Los dominios VH y VL consisten en cuatro regiones de secuencias relativamente conservadas llamadas regiones marco (FR1, FR2, FR3 y FR4), que forman una estructura para tres regiones de secuencias hipervariables (regiones determinantes de complementariedad, CDR). Las CDR contienen la mayoría de los residuos responsables de las interacciones del anticuerpo con el antígeno. Las CDR se conocen como CDR1, CDR2 y CDR3. Por consiguiente, los constituyentes de CDR en la cadena pesada se denominan H1, H2 y H3, mientras que los constituyentes de CDR en la cadena ligera se denominan L1, L2 y L3. CDR3 es la mayor fuente de diversidad molecular dentro del sitio de unión del anticuerpo. H3, por ejemplo, puede ser tan corto como dos residuos de aminoácidos o más de 26 aminoácidos. Las

5 estructuras de subunidades y configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas en la técnica. Para una revisión de la estructura del anticuerpo, véase *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, eds. Harlow et al., 1988. Un experto en la técnica reconocerá que cada estructura de la subunidad, por ejemplo, una estructura CH, VH, CL, VL, CDR y/o FR, comprende fragmentos activos. Por ejemplo, los fragmentos activos pueden consistir en la porción de la subunidad VH, VL o CDR que se une al antígeno, es decir, el fragmento de unión al antígeno, o la porción de la subunidad CH que se une y/o activa un receptor Fc y/o un complemento.

10 Ejemplos no limitantes de fragmentos de unión abarcados dentro del término "fragmento de anticuerpo" utilizados en la presente memoria incluyen: (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')<sub>2</sub>, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, pueden unirse de forma recombinante mediante un enlazador sintético, creando una única cadena de proteína en la que las regiones VL y VH se unen para formar moléculas monovalentes (conocido como Fv de cadena única (scFv)). El enlazador usado más comúnmente es un péptido de 15 residuos (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>, pero también se conocen otros enlazadores en la técnica. Los anticuerpos de cadena simple también están destinados ser abarcados dentro del término "anticuerpo" o "fragmento de unión al antígeno" de un anticuerpo. Estos anticuerpos se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y los fragmentos se criban para determinar su utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos.

25 La diversidad de anticuerpos se crea mediante múltiples genes de línea germinal que codifican regiones variables y una variedad de eventos somáticos. Los eventos somáticos incluyen recombinación de segmentos de genes variables con diversidad (D) y unión (J) de segmentos de genes para formar una región VH completa, y la recombinación de segmentos génicos variables y de unión para formar una región VL completa. El proceso de recombinación en sí mismo es impreciso, lo que resulta en la pérdida o adición de aminoácidos en las uniones V(D)J. Estos mecanismos de diversidad ocurren en las células B en desarrollo antes de la exposición al antígeno. Después de la estimulación antigénica, los genes de anticuerpos expresados en las células B experimentan una mutación somática. Basándose en el número estimado de segmentos de genes de línea germinal, la recombinación aleatoria de estos segmentos y el apareamiento aleatorio de VH-VL, se pueden producir hasta  $1,6 \times 10^7$  anticuerpos diferentes (*Fundamental Immunology*, 3<sup>a</sup> edición (1993), editor Paul, Raven Press, Nueva York, NY). Cuando se tienen en cuenta otros procesos que contribuyen a la diversidad de anticuerpos (como la mutación somática), se cree que pueden generarse más de  $1 \times 10^{10}$  anticuerpos diferentes (*Immunoglobulin Genes*, 2<sup>a</sup> edición (1995), editores Jonio et al., Academic Press, San Diego, CA). Debido a los muchos procesos implicados en la generación de una diversidad de anticuerpos, es poco probable que los anticuerpos monoclonales derivados independientemente con la misma especificidad de antígeno tengan secuencias de aminoácidos idénticas.

40 Por lo tanto, se describen y/o reivindican en este documento nuevos anticuerpos que se unen a GDF-8. Los fragmentos de anticuerpo, por ejemplo, estructuras que contienen una CDR, generalmente serán una secuencia de cadena pesada o ligera del anticuerpo, o un fragmento activo de la misma, en la que la CDR se coloca en una ubicación correspondiente a la CDR de VH y VL naturales. Las estructuras y ubicaciones de dominios variables de inmunoglobulina, por ejemplo, CDR, se pueden definir usando esquemas de numeración bien conocidos, por ejemplo, el esquema de numeración de Kabat, el esquema de numeración de Chothia, una combinación de Kabat y Chothia (AbM), etc. (véase, por ejemplo, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU. (1991), editores Kabat et al., Al-Lazikani et al. (1997) *J. Mol. Biol.* 273: 927-48).

50 Por lo tanto, la presente descripción proporciona además nuevas CDR. La estructura para llevar una CDR de la invención generalmente será un polipéptido, por ejemplo, una secuencia de cadena pesada o ligera de anticuerpo o una porción sustancial de la misma, en la que la CDR está situada en una posición correspondiente a la CDR de regiones VH y VL que se producen naturalmente. Las estructuras y ubicaciones de los dominios variables de inmunoglobulina se pueden determinar cómo se describe, por ejemplo, en Kabat et al., citado más arriba y Al-Lazikani et al., citado más arriba.

55 Las moléculas de anticuerpo (que incluyen fragmentos de anticuerpo) de la presente divulgación, es decir, moléculas de anticuerpo que antagonizan con GDF-8, incluyen, pero sin limitación, el anticuerpo monoclonal murino RK35 y sus variantes, específicamente la variante humanizada. Los antagonistas de GDF-8 descritos y/o reivindicados en la presente invención incluyen, además de RK35, otros anticuerpos que se unen eficientemente a GDF-8, incluyendo anticuerpos con alta especificidad para unirse a GDF-8 (por ejemplo, anticuerpos con una menor afinidad por otros miembros de la superfamilia de TGF- $\beta$  (por ejemplo, BMP-11)). Las variantes, que incluyen variantes humanizadas, de estos anticuerpos se contemplan en los métodos para diagnosticar, pronosticar, monitorizar, tratar, mejorar y prevenir de la invención. Estas moléculas de anticuerpo pueden ser útiles para prevenir o tratar un trastorno asociado a GDF-8, por ejemplo, patologías relacionadas con el metabolismo óseo, muscular, adiposo y de glucosa. Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena ligera de RK35 murino y humanizado se exponen en las SEQ ID NOs: 5 y 9, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada de RK35 murino y humanizado se exponen en las SEQ ID NOs: 3 y 7, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) en las cadenas ligeras variables de RK35 murino y humanizado

se exponen en las SEQ ID NOs: 13, 14, 15, 23, 24 y 25. Las secuencias de aminoácidos de las tres CDR en las cadenas pesadas variables de RK35 murino y humanizado se exponen en las SEQ ID NOs: 10, 11, 12, 20, 21 y 22.

5 Como se describió anteriormente, las CDR contienen la mayoría de los residuos responsables de las interacciones con un antígeno, y están contenidas dentro de los dominios VH y VL, es decir, la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera, respectivamente. En consecuencia, con la condición de que un anticuerpo comprenda al menos una CDR que comprenda una secuencia de aminoácidos seleccionada de las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NOs: 10-15 y 20-25, o un fragmento de anticuerpo activo de la misma, es un anticuerpo de la presente descripción, es decir, una que se une a GDF-8 e interfiere con la señalización de GDF-8. Por lo tanto, una realización de la divulgación incluye polipéptidos, por ejemplo, anticuerpos, que contienen una o más CDR que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada de las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NOs: 10-15 y 20-25, o un fragmento activo de las mismas. En consecuencia, un experto en la técnica reconocerá que los anticuerpos de la invención incluyen un anticuerpo en el que las CDR de la cadena VL son las expuestas en las SEQ ID NOs: 13-15 y 23-25, y las CDR de la cadena VH son aquellas expuestas en las SEQ ID NOs: 10-12 y 20-22.

15 Un fragmento de unión al antígeno puede ser un fragmento Fv, que consiste en dominios VH y VL. Por lo tanto, un fragmento Fv de RK35 puede constituir un anticuerpo, siempre que se una a GDF-8 e interfiera con la señalización de GDF-8. Un experto en la técnica reconocerá que cualquier fragmento de anticuerpo que contenga el fragmento Fv, por ejemplo, de RK35, también puede ser un anticuerpo de la divulgación. Adicionalmente, cualquier fragmento Fv, fragmento scFv, fragmento Fab o fragmento F(ab')<sub>2</sub>, que contiene una o más CDR que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada de las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NOs: 10-15 y 20-25, también puede ser un anticuerpo descrito y/o reivindicado en este documento.

20 Tales moléculas de anticuerpo pueden producirse por métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden producirse por generación de hibridomas de acuerdo con métodos conocidos. Los hibridomas formados de esta manera se criban utilizando métodos estándar, tales como el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y el análisis Biacore, para identificar uno o más hibridomas que producen un anticuerpo que se une a GDF-8, interfiere con la señalización de GDF-8 y neutraliza o inhibe una o más actividades asociadas con GDF-8. Se puede usar GDF-8 recombinante, GDF-8 de origen natural, cualquiera de sus variantes, y fragmentos de péptidos antigénicos de GDF-8 como el inmunógeno. Un fragmento de péptido antigénico de GDF-8 comprende al menos siete residuos de aminoácidos continuos y abarca un epítipo tal que un anticuerpo producido contra el péptido forma un complejo inmune con GDF-8. Preferiblemente, el péptido antigénico comprende al menos 10 residuos de aminoácidos, más preferiblemente al menos 15 residuos de aminoácidos, incluso más preferiblemente al menos 20 residuos de aminoácidos, y lo más preferiblemente al menos 30 residuos de aminoácidos. Adicionalmente, es preferible que el fragmento de péptido antigénico de GDF-8 comprenda el sitio de unión al receptor de GDF-8.

25 Los sueros y anticuerpos policlonales de la invención se pueden producir inmunizando un sujeto adecuado con GDF-8, sus variantes, y/o porciones de la misma. El título de anticuerpo en el sujeto inmunizado se puede monitorizar a lo largo del tiempo mediante técnicas estándar, tales como un ELISA, o usando GDF-8 inmovilizado u otras proteínas marcadoras (por ejemplo, FLAG). Si se desea, las moléculas de anticuerpo de la presente invención pueden aislarse del sujeto o medio de cultivo y purificarse adicionalmente mediante técnicas bien conocidas, tales como cromatografía de proteína A, para obtener una fracción de IgG.

30 Ciertas realizaciones de la divulgación comprenden el dominio VH y/o VL del fragmento Fv de RK35. Los fragmentos de anticuerpos de la presente divulgación, por ejemplo, fragmentos Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fd y dAb, se pueden producir por escisión de los anticuerpos de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, los fragmentos Fab y F(ab')<sub>2</sub> inmunológicamente activos se pueden generar tratando los anticuerpos con una enzima tal como papaína y pepsina.

35 Las realizaciones adicionales descritas y/o reivindicadas en este documento comprenden una o más CDR de cualquiera de estos dominios VH y VL, tal como se expone en las SEQ ID NOs: 10-15 y 20-25. Una realización comprende un fragmento H3 del dominio VH de RK35 como se expone en la SEQ ID NO: 12.

40 Las secuencias de ADN y aminoácidos (AA) de los dominios VH y VL, y las CDR de los anticuerpos descritos actualmente se enumeran como se enlista en la Tabla 1. Por conveniencia, las posiciones aproximadas de cada CDR dentro de los dominios VH y VL se enumeran en la Tabla 2.

Tabla 1: ADN y Secuencia de amino ácidos de VH, VL, CH, y los CDR en RK35

RATÓN	Sec. de ADN de VH	SEQ ID NO: 2
	Sec. de AA de VH	SEQ ID NO: 3
	Sec. de ADN de VL	SEQ ID NO: 4
	Sec. de AA de VL	SEQ ID NO: 5

(continuación)

HUMANIZADO	Sec. de ADN de VH	SEQ ID NO: 6
	Sec. de AA de VH	SEQ ID NO: 7
	Sec. de ADN de VL	SEQ ID NO:8
	Sec. de AA de VL	SEQ ID NO:9
CDR BASADAS EN LAS DEFINICIONES KABAT o AbM ( <i>cursiva</i> )	Sec. de AA de H1	SEQ ID NO: 10 o <i>SEQ ID NO: 20</i>
	Sec. de AA de H2	SEQ ID NO: 11 o <i>SEQ ID NO: 21</i>
	Sec. de AA de H3	SEQ ID NO: 12 o <i>SEQ ID NO: 22</i>
	Sec. de AA de L1	SEQ ID NO: 13 o <i>SEQ ID NO: 23</i>
	Sec. de AA de L2	SEQ ID NO: 14 o <i>SEQ ID NO: 24</i>
	Sec. de AA de L3	SEQ ID NO: 15 o <i>SEQ ID NO: 25</i>
	Sec. de ADN de CL	SEQ ID NO: 16
	Sec. de AA de CL	SEQ ID NO: 17
	Sec. de ADN de CH	SEQ ID NO: 18
	Sec. de AA de CH	SEQ ID NO: 19

Tabla 2: Posición aproximada de CDR según las definiciones de Kabat (no cursiva) o AbM (*cursiva*) dentro de las regiones variables de anticuerpos RK35 de ratón y humanizados

CDR	RK35 SEQ ID NO:5	RK35 SEQ ID NO:9
H1	24-34 o <i>24-34</i>	24-34 o <i>24-34</i>
H2	50-56 o <i>50-56</i>	50-56 o <i>50-56</i>
H3	89-95 o <i>89-95</i>	89-95 o <i>89-95</i>
	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:9
L1	24-34 o <i>24-34</i>	24-34 o <i>24-34</i>
L2	50-56 o <i>50-56</i>	50-56 o <i>50-56</i>
L3	89-95 o <i>89-95</i>	89-95 o <i>89-95</i>

5

10

15

20

25

30

Los anticuerpos anti-GDF-8 descritos y/o reivindicados en la presente memoria pueden comprender además regiones constantes de anticuerpos o partes de las mismas. Por ejemplo, un dominio VL de la invención se puede unir en su extremo terminal C a un dominio constante de cadena ligera de anticuerpo, por ejemplo, una cadena C<sub>k</sub> o C<sub>λ</sub> humana, preferiblemente una cadena C<sub>λ</sub>. De forma similar, un fragmento de unión a antígeno basado en un dominio VH puede unirse a su extremo terminal C con toda o parte de una cadena pesada de inmunoglobulina derivada de cualquier isotipo de anticuerpo, por ejemplo, IgG, IgA, IgE e IgM, y cualquiera de las subclases de isotipos, particularmente IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>4</sub>. En ejemplos de realizaciones, los anticuerpos comprenden fragmentos del extremo terminal C de cadenas pesada y ligera de IgG<sub>1λ</sub> humana. Las secuencias preferidas de ADN y aminoácidos para el fragmento constante del extremo terminal C de cadena ligera λ se exponen en la SEQ ID NO: 16 y la SEQ ID NO: 17, respectivamente. Las secuencias preferidas de aminoácidos y ADN para el fragmento constante del extremo terminal C de cadena pesada de IgG<sub>1</sub> se exponen en la SEQ ID NO: 18 y la SEQ ID NO: 19, respectivamente. Se entiende que, debido a la degeneración del código genético, las secuencias de ADN enumeradas en la Tabla 1 son simplemente representativas de ácidos nucleicos que codifican las secuencias de aminoácidos, péptidos y anticuerpos de interés, y no deben interpretarse como limitantes.

Ciertas realizaciones de la divulgación comprenden el dominio VH y/o VL del fragmento F<sub>v</sub> de RK35. Realizaciones adicionales comprenden una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) de cualquiera de estos dominios VH y VL. Una realización comprende un fragmento H3 del dominio VH de RK35. Los dominios VH y VL de la invención, en ciertas realizaciones, están germinados, es decir, las regiones marco (FR) de estos dominios se cambian usando técnicas de biología molecular convencionales para coincidir con las secuencias consenso de aminoácidos de los productos génicos de la línea germinal humana. Esto también se conoce como un anticuerpo humanizado o germinado. En otras realizaciones, las secuencias marco permanecen divergentes de la línea germinal. Los anticuerpos humanizados pueden producirse usando ratones transgénicos que son incapaces de expresar genes de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina endógena, pero que son capaces de expresar genes de cadena pesada y ligera humanos.

C. Anticuerpos modificados y sus fragmentos

Un aspecto adicional de la invención proporciona métodos para obtener un dominio de unión al antígeno del anticuerpo dirigido contra GDF-8. El experto en la materia apreciará que los anticuerpos descritos y/o reivindicados en este documento no están limitados a las secuencias específicas de VH y VL enumeradas en la Tabla 1, sino que también incluyen variantes de estas secuencias que conservan la capacidad de unión al antígeno. Dichas variantes pueden derivarse de las secuencias proporcionadas usando técnicas conocidas en el arte. Las sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos se pueden realizar tanto en las FR como en las CDR. Si bien los cambios en las regiones marco se diseñan generalmente para mejorar la estabilidad y reducir la inmunogenicidad del anticuerpo, los cambios en las CDR generalmente se diseñan para aumentar la afinidad del anticuerpo por su objetivo. Dichos cambios que aumentan la afinidad se determinan típicamente empíricamente alterando la CDR y probando el anticuerpo. Dichas alteraciones pueden realizarse de acuerdo con los métodos descritos en, por ejemplo, *Antibody Engineering*, 2da. edición, Borrebaeck, ed., Oxford University Press, 1995.

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

El método para elaborar un dominio VH que sea una variante de secuencia de aminoácidos de un dominio VH establecido en la presente memoria comprende una etapa de añadir, eliminar, sustituir o insertar uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos del dominio VH divulgado actualmente, opcionalmente combinando el dominio VH así provisto con uno o más dominios VL, y probando el dominio VH o la combinación o combinaciones de VH/VL para unión a GDF-8, y (preferiblemente) probar la capacidad de tal dominio de unión al antígeno para modular una o más actividades asociadas con GDF-8. El dominio VL puede tener una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente como se establece aquí. Puede emplearse un método análogo en el que una o más variantes de secuencia de un dominio VL descrito en este documento se combinan con uno o más dominios VH.

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

- (a) proporcionar un repertorio inicial de ácidos nucleicos que codifican un dominio VH que incluye una CDR, por ejemplo, CDR3, para ser reemplazada o un dominio VH que carece de una región de codificación CDR, por ejemplo, CDR3;
- (b) combinar el repertorio con un ácido nucleico del donante que codifica una CDR del donante que comprende un fragmento activo de la SEQ ID NO: 2 o 6, por ejemplo, un ácido nucleico del donante que codifica la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 3 o 7, de modo que el ácido nucleico del donante se inserta en la región CDR, por ejemplo, CDR3, en el repertorio para proporcionar un repertorio de productos de ácidos nucleicos que codifican un dominio VH;
- (c) expresar los ácidos nucleicos del repertorio de productos;
- (d) seleccionar un fragmento de unión al antígeno que interactúa con GDF-8; y
- (e) recuperar el fragmento seleccionado de unión al antígeno o el ácido nucleico que lo codifica.

De nuevo, puede emplearse un método análogo en el que una CDR de VL (por ejemplo, L3) descrita en este documento se combina con un repertorio de ácidos nucleicos que codifica un dominio VL, que incluye una CDR a reemplazar o carece de una región codificante de CDR.

Se puede introducir una secuencia codificante de una CDR de la divulgación (por ejemplo, CDR3) en un repertorio de dominios variables que carecen de una CDR (por ejemplo, CDR3), usando tecnología de ADN recombinante. Por ejemplo, Marks et al., (1992) *Bio/Technology* 10: 779-83, describe métodos de producción de repertorios de dominios variables de anticuerpos en los que los cebadores de consenso dirigidos a, o adyacentes al extremo 5' del área de dominio variable se usan junto con cebadores de consenso para la tercera región marco de genes de VH humanos para proporcionar un repertorio de dominios variables VH que carecen de una CDR3. El repertorio puede combinarse con una CDR3 de un anticuerpo particular. Usando técnicas análogas, las secuencias derivadas de CDR3 de la presente invención pueden mezclarse con repertorios de dominios VH o VL que carecen de CDR3, y los dominios VH o VL completos mezclados combinados con un dominio VL o VH afín para proporcionar fragmentos de unión al antígeno descritos y/o reivindicados en la presente memoria. El repertorio puede mostrarse entonces en un sistema huésped adecuado, tal como el sistema de presentación en fagos de, por ejemplo, el documento WO 92/01047, de modo que se puedan seleccionar fragmentos adecuados de unión al antígeno.

También se divulgan técnicas análogas o combinatorias o de mezcla, por Stemmer (1994) *Nature* 370: 389-91, que describen una técnica en relación con un gen de  $\beta$ -lactamasa pero observa que el enfoque puede usarse para la generación de anticuerpos.

- 5 Otra alternativa es generar nuevas regiones VH o VL que lleven una secuencia derivada de CDR descrita en este documento usando mutagénesis aleatoria de uno o más genes de VH y/o VL seleccionados para generar mutaciones dentro del dominio variable completo. Tal técnica se describe en Gram et al., (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89: 3576-80 mediante el uso de PCR propensa a error.
- 10 Otro método que puede usarse para generar nuevos anticuerpos o fragmentos de los mismos es dirigir la mutagénesis a las CDR de genes de VH o VL. Tales técnicas se describen en Barbas et al., (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91: 3809-13 y Schier et al., (1996) J. Mol. Biol. 263: 551-67.
- 15 De forma similar, pueden injertarse una, dos o las tres CDR en un repertorio de dominios VH o VL que luego se criban para un compañero de unión o fragmentos de unión para GDF-8.
- 20 Una porción sustancial de un dominio variable de inmunoglobulina comprenderá al menos las CDR y, opcionalmente, sus regiones marco intervinientes a partir de los fragmentos de anticuerpo como se expone en este documento. La porción también incluirá al menos aproximadamente el 50% de cualquiera o ambos FR1 y FR4, siendo el 50% el 50% del extremo terminal C de FR1 y el 50% del extremo terminal N de FR4. Los residuos adicionales en el extremo terminal N o el extremo terminal C de la parte sustancial del dominio variable pueden ser los que normalmente no están asociados con las regiones de dominio variable que se producen naturalmente. Por ejemplo, la construcción de fragmentos de anticuerpos descritos y/o reivindicados en la presente memoria mediante técnicas de ADN recombinante puede dar como resultado la introducción de residuos del extremo terminal N o C 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 descritos en la presente memoria a otras secuencias de proteínas que incluyen cadenas pesadas de inmunoglobulina, otros dominios variables (por ejemplo, en la producción de diacuerpos) o marcadores de proteínas como se analiza en más detalles a continuación.
- 25 Los anticuerpos pueden conjugarse por métodos químicos con radionucleidos, fármacos, macromoléculas u otros agentes, y pueden prepararse como proteínas de fusión que comprenden una o más CDR de la divulgación.
- 30 Una proteína de fusión de anticuerpo contiene un par VH-VL en el que una de estas cadenas (habitualmente VH) y otra proteína se sintetizan como una única cadena polipeptídica. Estos tipos de productos difieren de los anticuerpos en que generalmente tienen un elemento funcional adicional, el residuo activo de una molécula pequeña o la característica estructural molecular principal de la macromolécula conjugada o fusionada.
- 35 Además de los cambios en la secuencia de aminoácidos descrita anteriormente, los anticuerpos pueden glicosilarse, pegilarse o unirse a albúmina o a un polímero no proteico. Por ejemplo, los anticuerpos anti-GDF-8 se pueden unir a uno de una variedad de polímeros no proteínicos, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol o polioxialquilenos. Los anticuerpos pueden modificarse químicamente, por ejemplo, para aumentar su semivida en circulación mediante conjugación covalente a un polímero. Los polímeros ilustrativos y los métodos para unirlos a los péptidos son conocidos en la técnica.
- 40 En otras realizaciones, el anticuerpo puede modificarse para tener un patrón de glicosilación alterado (es decir, con respecto al patrón de glicosilación original o nativo). Como se usa en el presente documento, "alterado" significa que tiene uno o más residuos de carbohidrato suprimidos, y/o que tienen uno o más sitios de glicosilación añadidos al anticuerpo original. La adición de sitios de glicosilación a un anticuerpo anti-GDF-8 se lleva a cabo mediante métodos bien conocidos de alteración de la secuencia de aminoácidos para que contengan secuencias consenso del sitio de glicosilación. Otro medio para aumentar el número de residuos de carbohidratos en los anticuerpos es mediante acoplamiento químico o enzimático de glicósidos con los residuos de aminoácidos del anticuerpo. La eliminación de cualquier residuo de carbohidrato presente en los anticuerpos puede lograrse química o enzimáticamente como se conoce en la técnica.
- 45 Los anticuerpos de la invención también se pueden marcar con un marcador detectable o funcional tal como  $^{131}\text{I}$  o  $^{99}\text{Tc}$ , que se puede unir a anticuerpos de la invención usando química convencional conocida en la técnica. Las etiquetas también incluyen etiquetas enzimáticas como la peroxidasa de rábano picante o la fosfatasa alcalina. Las etiquetas incluyen además residuos químicos tales como biotina, que pueden detectarse mediante unión a un residuo específico detectable afín, por ejemplo, avidina marcada.
- 50 Los anticuerpos, en los que las secuencias de CDR difieren solo insustancialmente de las enumeradas en la Tabla 1, están abarcadas dentro del alcance de la invención. Las diferencias insustanciales incluyen cambios menores de aminoácidos, por ejemplo, sustituciones de uno o dos de cualquiera de los cinco aminoácidos en la secuencia de una CDR. Típicamente, un aminoácido se sustituye por un aminoácido relacionado que tiene características similares de carga, hidrofobicidad o estereoquímicas. Tales sustituciones son conocidas por un experto en la técnica. Las regiones marco de la estructura (FR) se pueden modificar más sustancialmente que las CDR sin afectar adversamente las propiedades de unión de un anticuerpo. Los cambios en las FR incluyen, entre otros, humanizar un marco derivado no humano o diseñar ciertos residuos del marco que son importantes para el contacto con antígenos o para estabilizar el sitio de unión, por ejemplo, cambiando la clase o subclase de la región constante, cambiando los residuos de
- 55
- 60
- 65

aminoácido específicos que podrían alterar una función efectora tal como la unión al receptor de Fc (por ejemplo, Lund et al., (1991) J. Immunol., 147: 2657-62; Morgan et al., (1995) Immunology 86: 319-24), o cambiando la especie de la cual se deriva la región constante. Los anticuerpos pueden tener mutaciones en la región CH2 de cadena pesada que reducen o alteran la función efectora, por ejemplo, unión al receptor Fc y activación del complemento. Por ejemplo, los anticuerpos pueden tener mutaciones tales como las descritas en las patentes de Estados Unidos números 5.624.821 y 5.648.260. En la cadena pesada de IgG<sub>1</sub> o IgG<sub>2</sub>, por ejemplo, tales mutaciones pueden realizarse en los residuos de aminoácidos 117 y 120 de la SEQ ID NO: 19, que representa la porción Fc de IgG<sub>1</sub> (estos residuos corresponden a los aminoácidos 234 y 237 en la secuencia de longitud completa de IgG<sub>1</sub> o IgG<sub>2</sub>). Los anticuerpos pueden tener también mutaciones que establezcan el enlace disulfuro entre las dos cadenas pesadas de una inmunoglobulina, tales como mutaciones en la región bisagra de IgG<sub>4</sub>, como se describe en, por ejemplo, Angal et al., (1993) Mol. Immunol. 30: 105-08.

Los polipéptidos y anticuerpos descritos y/o reivindicados en la presente memoria también abarcan proteínas que son estructuralmente diferentes de los polipéptidos y anticuerpos descritos, por ejemplo, que tienen una secuencia alterada pero sustancialmente las mismas propiedades bioquímicas que los polipéptidos y anticuerpos descritos, por ejemplo, tienen cambios solo en aminoácidos funcionalmente no esenciales. Dichas moléculas incluyen variantes alélicas de origen natural y variantes diseñadas deliberadamente que contienen alteraciones, sustituciones, reemplazos, inserciones o supresiones. Los expertos en la materia conocen bien las técnicas para tales alteraciones, sustituciones, reemplazos, inserciones o supresiones.

Los anticuerpos descritos y/o reivindicados en la presente memoria pueden producirse adicionalmente usando animales transgénicos no humanos que se modifican para producir anticuerpos completamente humanos en lugar de los anticuerpos endógenos del animal en respuesta a la exposición a un antígeno. Véase, por ejemplo, la publicación PCT WO 94/02602. Los genes endógenos que codifican las cadenas de inmunoglobulina pesada y ligera en el huésped no humano han sido incapacitados, y los loci activos que codifican las inmunoglobulinas de cadena pesada y ligera humanas se insertan en el genoma del huésped. Los genes humanos se incorporan, por ejemplo, usando cromosomas artificiales de levadura que contienen los segmentos de ADN humano requeridos. Entonces se obtiene un animal que proporciona todas las modificaciones deseadas como progenie mediante cruzamiento de animales transgénicos intermedios que contienen menos que el complemento completo de las modificaciones. Una realización de tal animal no humano es un ratón, y se denomina XENOMOUSE<sup>MR</sup> como se describe en las publicaciones PCT WO 96/33735 y WO 96/34096. Este animal produce células B que secretan inmunoglobulinas completamente humanas. Los anticuerpos se pueden obtener directamente del animal después de la inmunización con un inmunógeno de interés, como, por ejemplo, una preparación de un anticuerpo policlonal, o alternativamente de células B inmortalizadas derivadas del animal, tales como hibridomas que producen anticuerpos monoclonales. Adicionalmente, los genes que codifican las inmunoglobulinas con regiones variables humanas pueden recuperarse y expresarse para obtener los anticuerpos directamente, o pueden modificarse adicionalmente para obtener análogos de anticuerpos tales como, por ejemplo, moléculas de Fv de cadena simple.

En consecuencia, el término anticuerpo como se usa en el presente documento incluye anticuerpos intactos, fragmentos de anticuerpos, por ejemplo, fragmentos Fab, F(ab')<sub>2</sub> y scFv, y anticuerpos y fragmentos intactos que han sido mutados en sus regiones constante y/o variable (por ejemplo, mutaciones para producir anticuerpos quiméricos, parcialmente humanizados o completamente humanizados, así como para producir anticuerpos con un rasgo deseado, por ejemplo, unión mejorada de GDF-8 y/o unión de FcR reducida). Como tales, estos pueden ser anticuerpos de la invención, siempre que estén abarcados por el alcance de las reivindicaciones; estos anticuerpos se unen específicamente a GDF-8, interfieren con la señalización de GDF-8 y/o neutralizan o inhiben una o más actividades asociadas a GDF-8.

Se pueden emplear también otras moléculas de unión a proteínas para modular la actividad de GDF-8. Dichas moléculas de unión a proteínas incluyen medicamentos inmunofarmacéuticos modulares pequeños (SMIP<sup>MR</sup>) (Trubion Pharmaceuticals, Seattle, WA). Los SMIP son polipéptidos monocatenarios compuestos por un dominio de unión para una estructura afín tal como un antígeno, un contrarreceptor o similar, un polipéptido de región bisagra que tiene uno o ningún residuo de cisteína, y dominios de CH2 y CH3 de inmunoglobulina (véase también [www.trubion.com](http://www.trubion.com)). Los SMIP y sus usos y aplicaciones se describen en, por ejemplo, las Solicitudes de Patente Publicadas de los Estados Unidos Nos. 2003/0118592, 2003/0133939, 2004/0058445, 2005/0136049, 2005/0175614, 2005/0180970, 2005/0186216, 2005/0202012, 2005/0202023, 2005/0202028, 2005/0202534 y 2005/0238646, y miembros relacionados de la familia de patentes.

La capacidad de unión de un anticuerpo de la invención puede medirse por los siguientes métodos: análisis Biacore, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), cristalografía de rayos X, análisis de secuencia y mutagénesis de barrido como se describe en los Ejemplos a continuación, y otros métodos que son bien conocidos en la técnica. La capacidad de un anticuerpo de la invención para neutralizar y/o inhibir una o más actividades asociadas a GDF-8 puede medirse mediante la siguiente lista no limitativa de métodos: ensayos para medir la proliferación de una línea celular dependiente de GDF-8; ensayos para medir la expresión de polipéptidos mediados por GDF-8; ensayos que miden la actividad de moléculas de señalización secuencia abajo; ensayos que prueban la eficacia de un anticuerpo de la invención para prevenir trastornos musculares en un modelo animal relevante; ensayos como se describe en los ejemplos a continuación; y otros ensayos que son bien conocidos en la técnica.

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

- a) contraer una pluralidad de anticuerpos con GDF-8;
- b) elegir anticuerpos que se unen a GDF-8;
- c) probar la capacidad de los anticuerpos elegidos para evitar que GDF-8 se una al receptor de GDF-8; y
- d) seleccionar anticuerpos capaces de evitar que GDF-8 se una a su receptor.

Los anticuerpos anti-GDF-8 de la invención también son útiles para aislar, purificar y/o detectar GDF-8 en sobrenadantes, lisados celulares o en una superficie celular. Los anticuerpos descritos en esta invención se pueden usar de forma diagnóstica para monitorizar los niveles de proteína GDF-8 como parte de un procedimiento de prueba clínica. Adicionalmente, los anticuerpos de la invención se pueden usar en tratamientos que requieren la neutralización y/o inhibición de una o más actividades asociadas a GDF-8, por ejemplo, tratamientos para ALS y otras patologías relacionadas con los músculos. La presente invención también proporciona nuevos polinucleótidos y polipéptidos aislados y purificados relacionados con nuevos anticuerpos dirigidos contra GDF-8 humana. Los genes, polinucleótidos, proteínas y polipéptidos descritos y/o reivindicados en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos murinos y humanizados para GDF-8 (por ejemplo, RK35) y sus variantes.

#### D. Ácidos nucleicos, clonación y sistemas de expresión

La presente invención proporciona además polinucleótidos aislados y purificados que codifican anticuerpos de la presente invención. Los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención pueden comprender ADN o ARN y pueden ser total o parcialmente sintéticos. La referencia a las secuencias de nucleótidos tal como se expone aquí abarca moléculas de ADN con las secuencias especificadas o equivalentes genómicas, así como moléculas de ARN con las secuencias especificadas en las que, U es sustituido por T, a menos que el contexto requiera lo contrario.

Por ejemplo, se divulgan y/o reivindican en la presente memoria polinucleótidos purificados y aislados que codifican la región variable de un anticuerpo murino para GDF-8 que modula una o más actividades asociadas a GDF-8 (por ejemplo, neutraliza la bioactividad de GDF-8) (RK35) y una versión humanizada de RK35. Las secuencias preferidas de ADN de la invención incluyen secuencias de ADN genómicas, ADNc y sintetizadas químicamente.

Las secuencias de nucleótidos de la divulgación incluyen aquellas que codifican las regiones variables de cadena ligera de RK35 de ratón expuestas en la SEQ ID NO: 4, que incluyen aquellas que codifican una secuencia líder que precede a la secuencia de la región variable de cadena ligera, por ejemplo, la secuencia de nucleótidos expuesta como la SEQ ID NO: 30 (los nucleótidos 1-60 corresponden a la secuencia líder, y los nucleótidos 61-381 corresponden a la SEQ ID NO: 4). Las secuencias de nucleótidos de la divulgación también incluyen aquellas que codifican la región variable de cadena pesada de RK35 expuesta en la SEQ ID NO: 2, que incluyen aquellas que codifican una secuencia líder que precede a la región variable de cadena pesada, por ejemplo, la secuencia de nucleótidos expuesta como la SEQ ID NO: 28 (los nucleótidos 1-57 corresponden a la secuencia líder, y los nucleótidos 58-405 corresponden a la SEQ ID NO: 2). Las secuencias de nucleótidos de la invención también incluyen secuencias humanizadas de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera, tales como las expuestas en las SEQ ID NOs: 6 y 8, respectivamente. Los polinucleótidos de la presente divulgación también incluyen polinucleótidos que hibridan en condiciones rigurosas con las secuencias de ácido nucleico expuestas en las SEQ ID NOs: 2, 4, 6 y 8, y complementos de las mismas, y/o codifican polipéptidos que retienen actividad biológica sustancial (es decir, fragmentos activos) en las regiones variables. Los polinucleótidos de la presente divulgación también incluyen porciones continuas de las secuencias expuestas en las SEQ ID NOs: 2, 4, 6 y 8, que comprenden al menos 15 nucleótidos consecutivos.

La secuencia de aminoácidos de las cadenas ligeras variables de RK35 de ratón se expone en la SEQ ID NO: 5. Un ejemplo de una secuencia de aminoácidos del dominio de cadena ligera variable de RK35 de ratón precedido por una secuencia líder se expone como la SEQ ID NO: 31. La secuencia de aminoácidos de las cadenas pesadas variables de RK35 se expone en la SEQ ID NO: 3. Un ejemplo de una secuencia de aminoácidos del dominio de cadena pesada variable de RK35 de ratón precedido por una secuencia líder se expone como la SEQ ID NO: 29. Las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera variables humanizadas se exponen en las SEQ ID NOs: 7 y 9, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las CDR contenidas dentro de las cadenas pesadas de RK35 de ratón se exponen en las SEQ ID NOs: 10-12 y 20-22. Las secuencias de aminoácidos de las CDR contenidas dentro de las cadenas ligeras de RK35 de ratón se exponen en las SEQ ID NOs: 13-15 y 23-25. Los polipéptidos descritos y/o reivindicados en la presente memoria también incluyen porciones continuas de cualquiera de las secuencias sustancialmente expuestas en las SEQ ID NOs: 3, 5, 7, 9, 10-15 y 20-25 que comprenden al menos 5 aminoácidos consecutivos. Un polipéptido preferido descrito y/o reivindicado en la presente memoria incluye cualquier porción continua de cualquier secuencia sustancialmente expuesta en las SEQ ID NOs: 3, 5, 7, 9 y 10-15 que retiene la actividad biológica sustancial de un anticuerpo de la invención. Además de los polinucleótidos descritos y/o reivindicados en la presente memoria, los descritos y/o reivindicados en la presente memoria son polinucleótidos que codifican las secuencias de aminoácidos sustancialmente expuestas en las SEQ ID NOs: 3, 5, 7, 9 y 10-15 o una porción continua de los mismos, y que difieren de los polinucleótidos descritos anteriormente solo debido a la conocida degeneración del código genético.

5 Los polinucleótidos aislados de la presente invención se pueden usar como sondas de hibridación y cebadores para identificar y aislar ácidos nucleicos que tienen secuencias idénticas o similares a las que codifican los polinucleótidos descritos. Los polinucleótidos aislados de esta manera se pueden usar, por ejemplo, para producir anticuerpos contra GDF-8 u otros miembros de la familia de TGF- $\beta$  o para identificar células que expresan tales anticuerpos. Los métodos de hibridación para identificar y aislar ácidos nucleicos incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), hibridaciones Southern, hibridación *in situ* e hibridación Northern, y son bien conocidas por los expertos en la técnica.

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

Tabla 3

Condición	Híbrido	Longitud del híbrido (pb) <sup>1</sup>	Temperatura de hibridación y regulador <sup>2</sup>	Temperatura de lavado y regulador <sup>2</sup>
A	ADN:ADN	> 50	65°C; 1X SSC o 42°C; 1X SSC, 50% de formamida	65°C; 0.3X SSC
B	ADN:ADN	<50	T <sub>B</sub> *; 1X SSC	T <sub>B</sub> *; 1X SSC
C	ADN:ARN	> 50	67°C; 1X SSC o 45°C; 1X SSC, 50% de formamida	67°C; 0.3X SSC
D	ADN:ARN	<50	T <sub>D</sub> *; 1X SSC	T <sub>D</sub> *; 1X SSC
E	ARN:ARN	>50	70°C; 1X SSC o 50°C; 1X SSC, 50% de formamida	70°C; 0.3X SSC
F	ARN:ARN	<50	T <sub>F</sub> *; 1X SSC	T <sub>F</sub> *; 1X SSC
G	ADN:ADN	>50	65°C; 4X SSC o 42°C; 4X SSC, 50% de formamida	65°C; 1X SSC
H	ADN:ADN	<50	T <sub>H</sub> *; 4X SSC	T <sub>H</sub> *; 4X SSC
I	ADN:ARN	>50	67°C; 4X SSC o 45°C; 4X SSC, 50% de formamida	67°C; 1X SSC
J	ADN:ARN	<50	T <sub>J</sub> *; 4X SSC	T <sub>J</sub> *; 4X SSC
K	ARN:ARN	>50	70°C; 4X SSC o 50°C; 4X SSC, 50% de formamida	67°C; 1X SSC
L	ARN:ARN	<50	T <sub>L</sub> *; 2X SSC	T <sub>L</sub> *; 2X SSC
M	ADN:ADN	>50	50°C; 4X SSC o 40°C; 6X SSC, 50% de formamida	50°C; 2X SSC
N	ADN:ADN	<50	T <sub>N</sub> *; 6X SSC	T <sub>N</sub> *; 6X SSC
O	ADN:ARN	>50	55°C; 4X SSC o 42°C; 6X SSC, 50% de formamida	55°C; 2X SSC
P	ADN:ARN	<50	T <sub>P</sub> *; 6X SSC	T <sub>P</sub> *; 6X SSC
Q	ARN:ARN	>50	60°C; 4X SSC o 45°C; 6X SSC, 50% de formamida	60°C; 2X SSC
R	ARN:ARN	<50	T <sub>R</sub> *; 4X SSC	T <sub>R</sub> *; 4X SSC

<sup>1</sup>La longitud del híbrido es la prevista para la región o regiones hibridadas de los polinucleótidos que se hibridan. Cuando se hibrida un polinucleótido con un polinucleótido objetivo de secuencia desconocida, se supone que la longitud del híbrido es la del polinucleótido que se hibrida. Cuando los polinucleótidos de secuencia conocida se hibridan, la longitud del híbrido puede determinarse alineando las secuencias de los polinucleótidos e identificando la región o regiones de complementariedad de secuencia óptima.

Condición	Híbrido	Longitud del híbrido (pb) <sup>1</sup>	Temperatura de hibridación y regulador <sup>2</sup>	Temperatura de lavado y regulador <sup>2</sup>
<sup>2</sup> SSPE (1xSSPE es NaCl 0,15 M, NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM, y EDTA 1,25 mM, pH 7,4) puede sustituirse por SSC (1xSSC es NaCl 0,15 M y citrato de sodio 15 mM) en la hibridación y reguladores de lavado; los lavados se realizan durante 15 minutos después de que se completa la hibridación. T <sub>B</sub> *-T <sub>R</sub> *: La temperatura de hibridación para los híbridos que se prevé que sean inferiores a 50 pares de bases debe ser 5-10°C menor que la temperatura de fusión (T <sub>m</sub> ) del híbrido, donde T <sub>m</sub> se determina de acuerdo con las siguientes ecuaciones. Para híbridos de menos de 18 pares de bases de longitud, T <sub>m</sub> (°C) = 2 (No. de bases A + T) + 4 (No. de bases G + C). Para híbridos entre 18 y 49 pares de bases de longitud, T <sub>m</sub> (°C) = 81,5 + 16,6 (log <sub>10</sub> Na <sup>+</sup> ) + 0,41 (% G + C)-(600/N), donde N es el número de bases en el híbrido, y Na <sup>+</sup> es la concentración de iones sodio en el regulador de hibridación (Na <sup>+</sup> para 1X SSC = 0,165 M). Se proporcionan ejemplos adicionales de condiciones rigurosas para la hibridación de polinucleótidos en Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, capítulos. 9 y 11, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989), y Ausubel et al., Eds., Current Protocols in Molecular Biology, Secciones 2.10 y 6.3-6.4, John Wiley & Sons, Inc. (1995), incorporado aquí como referencia.				

- 5 Los polinucleótidos aislados de la presente invención se pueden usar como sondas de hibridación y cebadores para identificar y aislar ADN que tienen secuencias que codifican variantes alélicas de los polinucleótidos descritos. Las variantes alélicas son formas alternativas naturales de los polinucleótidos descritos que codifican polipéptidos que son idénticos o tienen una similitud significativa con los polipéptidos codificados por los polinucleótidos descritos. Preferiblemente, las variantes alélicas tienen al menos un 90% de identidad de secuencia (más preferiblemente, al menos un 95% de identidad; lo más preferiblemente, al menos un 99% de identidad) con los polinucleótidos descritos.
- 10 Los polinucleótidos aislados de la presente invención también pueden usarse como sondas de hibridación y cebadores para identificar y aislar ADN que tienen secuencias que codifican polipéptidos homólogos a los polinucleótidos descritos. Estos homólogos son polinucleótidos y polipéptidos aislados de una especie diferente a la de los polipéptidos y polinucleótidos descritos, o dentro de la misma especie, pero con una similitud de secuencia significativa con los polinucleótidos y polipéptidos divulgados. Preferiblemente, los homólogos de polinucleótidos tienen al menos 50% de identidad de secuencia (más preferiblemente, al menos 75% de identidad, lo más preferiblemente, al menos 90% de identidad) con los polinucleótidos descritos, mientras que los polipéptidos homólogos tienen al menos 30% de identidad de secuencia (más preferiblemente, al menos 45% de identidad, lo más preferiblemente, al menos 60% de identidad) con los anticuerpos/polipéptidos divulgados. Preferiblemente, los homólogos de los polinucleótidos y polipéptidos descritos son aquellos aislados de especies de mamíferos.
- 20 Los polinucleótidos aislados de la presente invención también pueden usarse como sondas de hibridación y cebadores para identificar células y tejidos que expresan los anticuerpos de la presente invención y las condiciones en las que se expresan.
- 25 Además, los polinucleótidos aislados de la presente invención pueden usarse para alterar (es decir, potenciar, reducir o modificar) la expresión de los genes correspondientes a los polinucleótidos de la presente invención en una célula u organismo. Estos "genes correspondientes" son las secuencias de ADN genómico de la presente invención que se transcriben para producir los ARNm de los que derivan los polinucleótidos de la presente invención.
- 30 La presente invención también proporciona constructos en forma de plásmidos, vectores, casetes de transcripción o expresión que comprenden al menos un ácido nucleico de la invención como anteriormente.
- 35 Los polinucleótidos aislados de la presente invención se pueden unir operativamente a una secuencia de control de la expresión para la producción recombinante de los polipéptidos de la presente invención. Adicionalmente, un experto en la técnica reconocerá que los polinucleótidos de la invención se pueden unir operativamente a secuencias de nucleótidos bien conocidas que codifican la región constante para diversos isotipos de anticuerpos. Por ejemplo, un polinucleótido de la invención que codifica una región o regiones variables de cadena ligera de la invención (por ejemplo, la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 8) se puede unir operativamente a una secuencia de nucleótidos que codifica la región constante (o derivados de la misma) de una cadena ligera κ o una cadena ligera λ, de modo que la expresión de los nucleótidos unidos dará como resultado una cadena ligera kappa o lambda completa con una región variable que se une específicamente y neutraliza GDF-8. De forma similar, un polinucleótido de la invención que codifica una región variable de cadena pesada de la invención (por ejemplo, la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 6) puede unirse operativamente a una secuencia de nucleótidos que codifica la región constante de un isotipo de cadena pesada (o derivados de la misma), por ejemplo, IgM, IgD, IgE, IgG e IgA. Los métodos generales para expresar proteínas recombinantes son bien conocidos en la técnica. Dichas proteínas recombinantes pueden expresarse en forma soluble para uso en el tratamiento de trastornos relacionados con la actividad de GDF-8, por ejemplo, trastornos degenerativos musculares y óseos.
- 45 Los vectores de expresión recombinantes de la invención pueden portar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en células huésped (por ejemplo, orígenes de replicación), secuencias de marcación tales como histidina y genes marcadores seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección
- 50

de células huésped en las que se ha introducido el vector. Por ejemplo, típicamente el gen marcador seleccionable confiere resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato, en una célula huésped en la que se ha introducido el vector. Los genes marcadores seleccionables preferidos incluyen el gen de dihidrofolato reductasa (DHFR) (para uso en células huésped de dhfr con selección/amplificación de metotrexato) y el gen *neo* (para selección de G418).

Se pueden elegir o construir vectores adecuados, que contienen secuencias reguladoras apropiadas, que incluyen secuencias promotoras, secuencias terminadoras, secuencias de poliadenilación, secuencias potenciadoras, genes marcadores y otras secuencias según corresponda. Los vectores pueden ser plásmidos o virales, por ejemplo, fagos o fagémidos, según sea apropiado. 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 constructos de ácidos nucleicos, mutagénesis, secuenciación, introducción de ADN en células y expresión génica, y análisis de proteínas, se describen en detalle en *Current Protocols in Molecular Biology*, 2ª edición, Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons, 1992.

La presente invención también proporciona una célula huésped que comprende uno o más constructos como anteriormente. Un ácido nucleico que codifica cualquier CDR (H1, H2, H3, L1, L2 o L3), dominio VH o VL, o fragmento de unión a antígeno como se proporciona aquí, forma un aspecto de la presente invención.

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

Los fragmentos de anticuerpos específicos, los dominios VH y/o VL, y las moléculas de polinucleótidos codificadores y vectores de acuerdo con la presente invención se pueden proporcionar aislados y purificados, por ejemplo, de su entorno natural, en forma sustancialmente pura u homogénea, o, en el caso de ácidos nucleicos, libres o sustancialmente libres de ácidos nucleicos o genes de origen distinto al de la secuencia que codifica un polipéptido con la función requerida.

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

Alternativamente, puede ser posible producir de forma recombinante los polipéptidos y anticuerpos de la presente invención en eucariotas inferiores tales como levadura o en procariotas. Las cepas de levadura potencialmente adecuadas incluyen *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, cepas de *Kluyveromyces* y cepas de *Candida*. Las cepas bacterianas potencialmente adecuadas incluyen *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y *Salmonella typhimurium*. Si los polipéptidos de la presente invención se elaboran en levadura o bacterias, puede ser necesario modificarlas mediante, por ejemplo, fosforilación o glicosilación de sitios apropiados, para obtener proteínas funcionales. Tales uniones covalentes se pueden lograr usando métodos químicos o enzimáticos bien conocidos.

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

Después de la expresión recombinante en las células huésped apropiadas, los polipéptidos y anticuerpos de la presente invención se pueden purificar a partir de medio de cultivo o extractos celulares usando procesos de purificación conocidos, tales como filtración en gel y cromatografía de intercambio iónico. La purificación también puede incluir cromatografía de afinidad con agentes que se sabe que se unen a los polipéptidos y anticuerpos de la presente invención. Estos procesos de purificación también pueden usarse para purificar los polipéptidos y anticuerpos de la presente invención a partir de fuentes naturales.

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

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

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

La introducción de ácidos nucleicos puede seguirse causando o permitiendo la producción de proteínas a partir del ácido nucleico, por ejemplo, cultivando las células huésped en condiciones adecuadas para la expresión génica. Tales condiciones son bien conocidas en la técnica.

III. Métodos para tratar, mejorar, prevenir e inhibir el progreso de los trastornos óseos, adiposos, de metabolismo de la glucosa, de insulina y musculares

La implicación de GDF-8 en ALS, y el descubrimiento de los nuevos anticuerpos de la invención, permite métodos para tratar, aliviar y mejorar trastornos asociados a GDF-8, por ejemplo, trastornos musculares, trastornos neuromusculares, trastornos degenerativos óseos, trastornos óseos metabólicos o inducidos, trastornos del metabolismo de la glucosa, trastornos adiposos y trastornos relacionados con la insulina. Además, los anticuerpos permiten diagnosticar, pronosticar y monitorizar el progreso de los trastornos óseos, musculares, adiposos o de insulina al medir el nivel de GDF-8 en una muestra biológica. En particular, los anticuerpos de la invención se pueden usar para tratar a un individuo con ALS u otro trastorno muscular, o en un método para distinguir si un paciente sufre de ALS u otro trastorno muscular.

Los anticuerpos y otras moléculas de la presente invención son útiles para prevenir, diagnosticar o tratar diversos trastornos médicos en humanos o animales. Los anticuerpos pueden usarse para inhibir o reducir una o más actividades asociadas con GDF-8. Más preferiblemente, los anticuerpos inhiben o reducen una o más de las actividades de GDF-8 con relación a las actividades de GDF-8 no unida. En ciertas realizaciones, la actividad de GDF-8, cuando está unida a uno o más anticuerpos anti-GDF-8, se inhibe al menos 50%, preferiblemente al menos 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 72, 76, 78, 80, 82, 84, 86 u 88%, más preferiblemente al menos 90, 91, 92, 93 o 94%, e incluso más preferiblemente al menos 95% a 100% en relación con una proteína GDF-8 madura que no está unida a uno o más de los anticuerpos anti-GDF-8. La inhibición o neutralización de la actividad de GDF-8 puede medirse, por ejemplo, en ensayos del gen informador pGL3(CAGA)<sub>12</sub> (RGA) como se describe en Thies et al., citado más arriba, y en ensayos del receptor ActRIIB como se ilustra en los Ejemplos.

Los trastornos médicos diagnosticados, pronosticados, monitorizados, tratados, mejorados o prevenidos por anticuerpos contra GDF-8 son trastornos asociados a GDF-8, por ejemplo, trastornos musculares o neuromusculares que incluyen, por ejemplo, distrofia muscular (MD, incluida la distrofia muscular de Duchenne), esclerosis lateral amiotrófica (ALS), atrofia muscular, atrofia de órganos, fragilidad, síndrome del túnel carpiano, enfermedad pulmonar obstructiva congestiva, sarcopenia, caquexia y otros síndromes de desgaste muscular (por ejemplo, causados por otras enfermedades y afecciones). Además, otros trastornos médicos que pueden ser diagnosticados, pronosticados, controlados, tratados, mejorados o prevenidos por los anticuerpos contra GDF-8 son trastornos del tejido adiposo tales como obesidad, diabetes tipo 2, tolerancia alterada a la glucosa, síndromes metabólicos (por ejemplo, Síndrome X), resistencia a la insulina inducida por un traumatismo (tal como quemaduras o desequilibrio de nitrógeno) o enfermedades degenerativas óseas (por ejemplo, osteoartritis, osteoporosis, etc.). En realizaciones preferidas, los trastornos que son diagnosticados, pronosticados, monitorizados, tratados, mejorados o prevenidos por anticuerpos contra GDF-8 son trastornos musculares o neuromusculares. En una realización más preferida, el trastorno muscular o neuromuscular que se diagnostica, pronostica, monitoriza, trata, mejora o previene mediante anticuerpos anti-GDF-8 es MD o ALS. En la realización más preferida de la invención, el trastorno muscular o neuromuscular que se diagnostica, pronostica, monitoriza, trata, mejora o previene mediante antagonistas de GDF-8 de la presente divulgación, por ejemplo, anticuerpos anti-GDF-8 que inhiben GDF-8 actividad de la presente invención, es ALS.

Otros trastornos médicos que pueden ser diagnosticados, pronosticados, controlados, tratados, mejorados o prevenidos por los antagonistas de GDF-8 son aquellos asociados con la pérdida de hueso, que incluyen osteoporosis, especialmente en los ancianos y/o mujeres posmenopáusicas, osteoporosis inducida por glucocorticoides, osteopenia, osteoartritis y fracturas relacionadas con la osteoporosis. Otras enfermedades y trastornos metabólicos óseos objetivo incluyen baja masa ósea debido a la terapia crónica con glucocorticoides, falla gonadal prematura, supresión de andrógenos, deficiencia de vitamina D, hiperparatiroidismo secundario, deficiencias nutricionales y anorexia nerviosa. Los anticuerpos se usan preferiblemente para diagnosticar, pronosticar, monitorizar, tratar, mejorar o prevenir tales

trastornos en mamíferos, particularmente en humanos.

Los anticuerpos de la presente invención se administran en cantidades terapéuticamente efectivas. Generalmente, una cantidad terapéuticamente eficaz puede variar con la edad, condición y el sexo del sujeto, así como con la gravedad de la afección médica en el sujeto. La dosificación puede ser determinada por un médico y ajustada, según sea necesario, para adaptarse a los efectos observados del tratamiento. La toxicidad y la eficacia terapéutica de tales compuestos se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales de experimentación, por ejemplo, para determinar la LD<sub>50</sub> (la dosis letal para el 50% de una población) y la ED<sub>50</sub> (la dosis terapéuticamente efectiva en 50% de una población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos, es decir, la LD<sub>50</sub>/ED<sub>50</sub>, es el índice terapéutico, y se prefieren los anticuerpos que exhiben índices terapéuticos grandes.

Los datos obtenidos de ensayos de cultivo celular y estudios en animales se pueden usar para formular un intervalo de dosificación para uso en humanos. La dosificación de dichos compuestos se encuentra preferiblemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluye la ED<sub>50</sub> con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación y la vía de administración. Para cualquier anticuerpo usado en la presente invención, la dosis terapéuticamente efectiva se puede estimar inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Se puede formular una dosis en modelos animales para lograr un intervalo de concentración en plasma circulante que incluye la IC<sub>50</sub> (por ejemplo, la concentración del anticuerpo de prueba que logra una inhibición máxima del 50% de los síntomas o la inhibición máxima del 50% de la inhibición de la actividad biológica) como se determina en el cultivo celular. Los niveles en plasma pueden medirse, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alto rendimiento. Los efectos de cualquier dosificación particular pueden monitorizarse mediante un bioensayo adecuado. Los ejemplos de bioensayos adecuados incluyen, pero no están limitados a, ensayos de replicación de ADN, ensayos basados en transcripción, ensayos de unión a proteína/receptor GDF-8, ensayos de creatina quinasa, ensayos basados en la diferenciación de preadipocitos, ensayos basados en la captación de glucosa en adipocitos y ensayos inmunológicos.

En general, las composiciones se administran de forma que los anticuerpos o sus fragmentos de unión se administren a una dosis de 1 µg/kg a 150 mg/kg, 1 µg/kg a 100 mg/kg, 1 µg/kg a 50 mg/kg, 1 µg/kg a 20 mg/kg, 1 µg/kg a 10 mg/kg, 1 µg/kg a 1 mg/kg, 10 µg/kg a 1 mg/kg, 10 µg/kg a 100 µg/kg, 100 µg/kg a 1 mg/kg, y 500 µg/kg a 1 mg/kg. Preferiblemente, los anticuerpos se administran como una dosis en bolo para maximizar los niveles circulantes de anticuerpos durante el mayor período de tiempo después de la dosis. La infusión continua también se puede usar antes, después o en lugar de la dosis en bolo.

#### IV. Métodos de identificación de agentes terapéuticos

Aún otro aspecto de la divulgación proporciona un método para identificar agentes terapéuticos útiles en el tratamiento del músculo, por ejemplo, metabolismo de la glucosa, adiposidad y trastornos óseos. Los ensayos de cribado apropiados, por ejemplo, ensayos basados en ELISA, son conocidos en la técnica. En dicho ensayo de cribado, se forma una primera mezcla de unión combinando un anticuerpo de la invención y su ligando, GDF-8, y se mide la cantidad de unión entre el ligando y el anticuerpo en la primera mezcla de unión (M<sub>0</sub>). También se forma una segunda mezcla de unión combinando el anticuerpo, el ligando y un compuesto o agente a cribar, y se mide la cantidad de unión entre el ligando y el anticuerpo en la segunda mezcla de unión (M<sub>1</sub>). Luego se comparan las cantidades de unión en la primera y segunda mezclas de unión, por ejemplo, calculando la relación M<sub>1</sub>/M<sub>0</sub>. Se considera que el compuesto o agente 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 (es decir, M<sub>1</sub>/M<sub>0</sub> < 1). La formulación y optimización de mezclas de unión está dentro del nivel de experticia en la técnica; tales mezclas de unión también pueden contener reguladores y sales necesarias para mejorar u optimizar la unión, y pueden incluirse ensayos de control adicionales en el ensayo de cribado de la invención.

Los compuestos que se encuentra que reducen la unión anticuerpo-ligando en al menos aproximadamente 10% (es decir, M<sub>1</sub>/M<sub>0</sub> < 0,9), preferiblemente más de aproximadamente 30%, pueden identificarse y luego, si se desea, se criban de forma secundaria por la capacidad para inhibir la actividad de GDF-8 en otros ensayos tales como el ensayo de unión de ActRIIB, u otros ensayos basados en células e *in vivo* como se describe en los Ejemplos o bien, conocidos en la técnica.

#### V. Moléculas pequeñas

La inhibición de la actividad de GDF-8 en un organismo (o sujeto) afectado (o en riesgo de) un trastorno asociado a GDF-8, o en una célula de dicho organismo implicado en tales trastornos, también puede lograrse a través del uso de moléculas pequeñas antagonistas (generalmente pequeñas moléculas orgánicas) que antagonizan, es decir, inhiben la actividad de, GDF-8. Las nuevas moléculas antagonistas pequeñas se pueden identificar mediante los métodos de cribado descritos anteriormente y se pueden usar en los métodos de tratamiento de la presente invención descritos en este documento.

Por el contrario, el aumento de la actividad de GDF-8 en un organismo (o sujeto) afectado (o en riesgo de) un trastorno relacionado con la disminución de la expresión y/o actividad de GDF-8 o un trastorno relacionado con niveles

disminuidos de GDF-8 también se puede lograr a través del uso de pequeñas moléculas (generalmente pequeñas moléculas orgánicas) que agonizan, es decir, mejoran la actividad de, GDF-8. Las nuevas moléculas agonistas pequeñas se pueden identificar mediante los métodos de cribado descritos anteriormente y se pueden usar en los métodos de tratamiento descritos en este documento.

5

VI. Métodos para diagnosticar, pronosticar y monitorizar el progreso de trastornos óseos, adiposidad, metabolismo de la glucosa y musculares

10

Además de tratar, por ejemplo, trastornos del músculo, hueso, metabolismo de glucosa y adiposos, la presente divulgación proporciona métodos para diagnosticar tales trastornos detectando la disminución o el aumento de GDF-8 en una muestra biológica, por ejemplo, suero, plasma, líquido de lavado broncoalveolar, esputo, biopsias (por ejemplo, de músculo), etc. "Diagnóstico" o "diagnosticar" significa identificar la presencia o ausencia de una afección patológica. Los métodos de diagnóstico implican detectar la presencia de GDF-8, por ejemplo, determinando una cantidad de prueba de polipéptido GDF-8 en una muestra biológica de un sujeto (mamífero humano o no humano) y comparando la cantidad de prueba con una cantidad o intervalo normal (por ejemplo, una cantidad o intervalo de un individuo o individuos que se sabe que no padecen dicho trastorno) para el polipéptido GDF-8. Mientras que un método de diagnóstico particular puede no proporcionar un diagnóstico definitivo de ALS u otros trastornos asociados con GDF-8, es suficiente si el método proporciona una indicación positiva que ayuda en el diagnóstico.

15

20

La presente divulgación también proporciona métodos para el pronóstico de ALS u otros trastornos musculares, o, por ejemplo, trastornos óseos, de metabolismo de la glucosa y adiposos mediante la detección de la sobreexpresión de GDF-8. "Pronóstico" o "pronosticar" significa predecir el desarrollo probable y/o la gravedad de una condición patológica. Los métodos de pronóstico implican determinar la cantidad de prueba de GDF-8 en una muestra biológica de un sujeto y comparar la cantidad de prueba con una cantidad o intervalo de pronóstico (por ejemplo, una cantidad o intervalo de individuos con severidades variables de, por ejemplo, ALS) para GDF-8. Varias cantidades de GDF-8 en una muestra de prueba son consistentes con ciertos pronósticos para ALS u otros trastornos asociados con GDF-8. La detección de una cantidad de GDF-8 a un nivel de pronóstico particular proporciona un pronóstico para el sujeto.

25

30

La presente descripción también proporciona métodos para monitorizar el curso de la ALS u otros trastornos asociados con GDF-8 detectando la sobreexpresión o subregulación de GDF-8. Los métodos de monitoreo implican determinar las cantidades de prueba de GDF-8 en muestras biológicas tomadas de un sujeto en una primera y una segunda vez, y comparar las cantidades. Un cambio en la cantidad de GDF-8 entre la primera y la segunda vez indica un cambio en el curso de, por ejemplo, la gravedad de ALS u otros trastornos asociados con GDF-8. Un experto en la técnica reconocerá que en trastornos asociados a GDF-8 similares a ALS, por ejemplo, cuando es deseable un aumento en la masa muscular, una disminución en la cantidad de GDF-8 y/o actividad de GDF-8 entre la primera y segunda vez indica la remisión del trastorno, y un aumento en la cantidad indica la progresión del trastorno. Dichos ensayos de control también son útiles para evaluar la eficacia de una intervención terapéutica particular (por ejemplo, atenuación y/o reversión de la enfermedad) en pacientes que están siendo tratados por ALS u otros trastornos asociados con GDF-8.

35

40

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

45

50

Cuando los anticuerpos están destinados para fines de diagnóstico, pronóstico o control, 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) pueden marcarse usando técnicas convencionales. Los marcadores adecuados incluyen fluoróforos, cromóforos, átomos radiactivos, reactivos densos en electrones, enzimas y ligandos que tienen compañeros de unión específicos. Las enzimas generalmente se detectan por su actividad. Por ejemplo, la peroxidasa de rábano picante se puede detectar por su capacidad de convertir tetrametilbenzidina (TMB) en un pigmento azul, cuantificable con un espectrofotómetro. Otros marcadores adecuados pueden incluir biotina y avidina o estreptavidina, IgG y proteína A, y los numerosos pares receptor-ligando conocidos en la técnica. Otras permutaciones y posibilidades serán fácilmente evidentes para los expertos habituales en la técnica, y se consideran equivalentes dentro del alcance de la presente invención.

55

VII. Composiciones farmacéuticas y métodos de administración

60

La presente invención proporciona composiciones que comprenden un antagonista de GDF-8 de la invención, es decir, polinucleótidos, vectores, anticuerpos y fragmentos de anticuerpos. Tales composiciones pueden ser adecuadas para uso farmacéutico y administración a pacientes. Las composiciones típicamente comprenden una o más moléculas de la presente invención, preferiblemente un anticuerpo y un excipiente farmacéuticamente aceptable. Los anticuerpos anti-GDF-8 de la presente invención se pueden usar *in vitro*, *ex vivo* o incorporados en una composición farmacéutica cuando se combinan con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Como se usa en el presente documento, la frase "excipiente farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, soluciones, reguladores, medios

65

de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retardo de la absorción, y similares, que son compatibles con la administración farmacéutica. Dicha composición puede contener, además de los anticuerpos de la invención y el vehículo, diversos diluyentes, rellenos, sales, reguladores, estabilizantes, solubilizantes y otros materiales bien conocidos en la técnica. El término "farmacéuticamente aceptable" significa un material no tóxico que no interfiere con la efectividad de la actividad biológica del ingrediente o ingredientes activos. Las características del portador dependerán de la ruta de administración. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Las composiciones también pueden contener otros compuestos activos que proporcionan funciones terapéuticas suplementarias, adicionales o mejoradas. Las composiciones farmacéuticas también se pueden incluir en un recipiente, empaque o dispensador junto con instrucciones para la administración.

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

Como se usa en el presente documento, el término "cantidad terapéuticamente efectiva" significa la cantidad total de cada componente activo de la composición o método farmacéutico que es suficiente para mostrar un beneficio significativo para el paciente, por ejemplo, mejora de los síntomas, curación o aumento en la tasa de curación de tales condiciones. Cuando se aplica a un ingrediente activo individual, administrado solo, el término se refiere a ese ingrediente solo. Cuando se aplica a una combinación, el término se refiere a cantidades combinadas de los ingredientes activos que dan como resultado el efecto terapéutico, ya sea que se administren en combinación, en serie o simultáneamente.

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

En una realización, los anticuerpos de la invención, por ejemplo, composiciones farmacéuticas de los mismos, se administran en terapia de combinación, es decir, combinados con otros agentes, por ejemplo, agentes terapéuticos, que son útiles para tratar afecciones o trastornos patológicos, tales como trastornos musculares, trastornos neuromusculares, trastornos degenerativos óseos, trastornos óseos metabólicos o inducidos, trastornos adiposos, trastornos del metabolismo de la glucosa o trastornos relacionados con la insulina, por ejemplo, así como trastornos alérgicos e inflamatorios. El término "en combinación" en este contexto significa que los agentes se administran de manera sustancialmente simultánea, de forma simultánea o secuencial. Si se administran de forma secuencial, al inicio de la administración del segundo compuesto, el primero de los dos compuestos es preferiblemente aún detectable en concentraciones efectivas en el sitio de tratamiento o en el sujeto.

Una composición farmacéutica de la invención se formula para ser compatible con su ruta de administración prevista. Los métodos para llevar a cabo la administración son conocidos por los expertos en la técnica. También puede ser posible obtener composiciones que pueden administrarse por vía tópica u oral, o que pueden ser capaces de transmitirse a través de las membranas mucosas. La administración de un anticuerpo de la invención utilizado en una composición farmacéutica para poner en práctica el uso de la presente invención se puede llevar a cabo en una variedad de formas convencionales, tales como ingestión oral, inhalación, inyección cutánea, subcutánea o intravenosa.

Las soluciones o suspensiones usadas para la 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 metil parabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; reguladores 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, como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. Tales preparaciones pueden incluirse en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiples hechos de vidrio o plástico.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para inyección incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los vehículos adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor<sup>MR</sup> EL (BASF, Parsippany, NJ) o solución salina regulada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser lo suficientemente fluida para permitir que sea fácil de inyectar. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe poder conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene,

5 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, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensoactivos. La prevención de la acción de microorganismos se puede lograr 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 realizarse incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

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

25 La cantidad de un anticuerpo de la invención (u otro antagonista de la invención) en la composición farmacéutica de la presente invención dependerá de la naturaleza y la gravedad de la afección que se trata, y de la naturaleza de los tratamientos previos experimentados por el paciente. En última instancia, el médico tratante decidirá la cantidad de anticuerpo con el que se tratará a cada paciente en particular. Inicialmente, un médico tratante administra bajas dosis de anticuerpos y observa la respuesta del paciente. Pueden administrarse dosis mayores de anticuerpo hasta que se obtenga el efecto terapéutico óptimo para el paciente, y en ese punto la dosificación generalmente no aumenta más. Se contempla que las diversas composiciones farmacéuticas utilizadas para practicar el método de la presente invención deberían contener aproximadamente 0,1 µg a 50 mg de anticuerpo por kg de peso corporal.

30 La duración de la terapia que usa la composición farmacéutica de la presente invención variará, dependiendo de la gravedad de la enfermedad que se está tratando y la afección y la respuesta idiosincrásica potencial de cada paciente individual. Se contempla que la duración de cada aplicación de anticuerpo será a través de, por ejemplo, la ruta subcutánea y, por ejemplo, en el intervalo de una vez por semana. Finalmente, el médico tratante decidirá la duración apropiada de la terapia usando la composición farmacéutica de la presente invención.

35 Las composiciones orales generalmente incluyen un diluyente inerte o un vehículo comestible. Pueden encerrarse en cápsulas de gelatina o comprimirse en tabletas. Para el propósito de la administración terapéutica oral, el antagonista de GDF-8 (por ejemplo, anticuerpo, molécula pequeña, etc.) puede incorporarse con excipientes y usarse en forma de tabletas o cápsulas. Los agentes aglutinantes farmacéuticamente compatibles y/o los materiales adyuvantes se pueden incluir como parte de la composición. Las tabletas, 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 disgregante tal como ácido algínico, Primogel<sup>MR</sup> o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o Sterotes<sup>MR</sup>; 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 saborizante de naranja.

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

50 Para administración por inhalación, se administra un antagonista de GDF-8 en forma de aerosol desde un recipiente o dispensador presurizado, que contiene un propelente adecuado, por ejemplo, un gas tal como dióxido de carbono o un nebulizador. Por consiguiente, los compuestos descritos en este documento pueden administrarse por inhalación al tejido pulmonar. El término "tejido pulmonar" tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier tejido del tracto respiratorio e incluye tanto el tracto respiratorio superior como el inferior, excepto que se indique lo contrario. Se

pueden administrar uno o más anticuerpos contra GDF-8 en combinación con una o más de las modalidades existentes para tratar enfermedades pulmonares.

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

También es posible formular el compuesto para inhalación usando un dispositivo médico, por ejemplo, un inhalador (véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos Nos. 6.102.035 (un inhalador de polvo) y 6.012.454 (un inhalador de polvo seco)). El inhalador puede incluir compartimentos separados para el compuesto activo a un pH adecuado para el almacenamiento y otro compartimento para un regulador neutralizante, y un mecanismo para combinar el compuesto con un regulador neutralizante inmediatamente antes de la atomización. En una realización, el inhalador es un inhalador de dosis medida.

Aunque no es necesario, pueden usarse potenciadores de administración tales como tensoactivos para mejorar adicionalmente la administración pulmonar. Un "tensoactivo" como se usa en el presente documento se refiere a un compuesto que tiene unidades estructurales hidrofílicas y lipofílicas que promueven la absorción de un fármaco interactuando con una interfaz entre dos fases inmiscibles. Los tensoactivos son útiles con partículas secas por varias razones, por ejemplo, reducción de la aglomeración de partículas, reducción de fagocitosis de macrófagos, etc. Cuando se combina con surfactante pulmonar, se puede lograr una absorción más eficiente del compuesto porque los surfactantes, tales como DPPC, facilitarán enormemente la difusión del compuesto. Los tensoactivos son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero sin limitación, fosfoglicéridos, por ejemplo, fosfatidilcolinas, L-alfa-fosfatidilcolina dipalmitoilo (DPPC) y difosfatidil glicerol (DPPG); hexadecanol; ácidos grasos; polietilenglicol (PEG); éter de polioxietilen-9-aurilo; ácido palmítico; ácido oleico; trioleato de sorbitán (Span 85); glicocolato; surfactina; poloxámero; éster de ácido graso de sorbitán; trioleato de sorbitán; tiloxapol; y fosfolípidos.

La administración sistémica también puede ser por medios transmucosales o transdérmicos. Por ejemplo, en el caso de anticuerpos que comprenden la porción Fc, las composiciones pueden ser capaces de transmitirse a través de membranas mucosas (por ejemplo, intestino, boca o pulmones) a través de la ruta mediada por el receptor FcRn (por ejemplo, patente de Estados Unidos No. 6.030.613). En general, la administración transmucosal 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 ungüentos, bálsamos, geles, parches o cremas como se conoce generalmente en la técnica. Para la administración transmucosal o transdérmica, se usan en la formulación penetrantes apropiados para la barrera a permear. Tales penetrantes son generalmente conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, detergentes, sales biliares y derivados de ácido fusídico.

Las composiciones farmacéuticas también pueden consistir en composiciones adecuadas para terapia génica, es decir, composiciones compuestas de los polinucleótidos descritos en este documento. En el caso de la terapia génica, el vehículo farmacéuticamente aceptable puede incluir, por ejemplo, lípidos, esferas de colágeno, sistemas de emulsión catiónica, agua, reguladores salinos, vectores virales, restos de quilomicrones, nanopartículas de polímeros (por ejemplo, gelatina-ADN o quitosano-ADN), partículas de oro, complejos poliméricos, ADN recubierto con liposomas (*lipoplexes*), complejos de polímeros con ADN (*polyplexes*), etc. (véase, por ejemplo, Gardlik et al. (2005) Med. Sci. Monit. 11 (4): RA110-21).

#### Estabilización y retención

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

Los antagonistas de la invención se pueden preparar con vehículos que protegerán contra la eliminación rápida del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes y sistemas de administración microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables y biocompatibles, como acetato de vinil etileno, 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 un antagonista de GDF-8, por ejemplo, uno o más anticuerpos anti-GDF-8, también pueden usarse como vehículos farmacéuticamente aceptables. Estos pueden prepararse de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la técnica.

Por ejemplo, un anticuerpo GDF-8 puede asociarse con un polímero, por ejemplo, un polímero sustancialmente no antigénico, tal como óxidos de polialquileno u óxidos de polietileno. Los polímeros adecuados variarán sustancialmente en peso. Se pueden usar polímeros que tienen pesos moleculares promedio en número que varían de aproximadamente 200 a aproximadamente 35.000 (o aproximadamente 1.000 a aproximadamente 15.000, o aproximadamente 2.000 a aproximadamente 12.500).

Por ejemplo, un anticuerpo GDF-8 puede conjugarse con un polímero soluble en agua, por ejemplo, polímeros de polivinilo hidrófilos, por ejemplo, alcohol polivinílico y polivinilpirrolidona. Una lista no limitativa de dichos polímeros incluye homopolímeros de óxido de polialquileno tales como polietilenglicol (PEG) o polipropilenglicoles, polioles

polioxi-etilenados, copolímeros de los mismos y copolímeros en bloque de los mismos, con la condición de que se mantenga la solubilidad en agua de los copolímeros en bloque. Polímeros adicionales útiles incluyen polioxi-alquilenos tales como polioxi-etileno, polioxi-propileno y copolímeros en bloque de polioxi-etileno y polioxi-propileno (Pluronic); polimetacrilatos; carbómeros; polisacáridos ramificados o no ramificados, que comprenden los monómeros de sacáridos D-manosa, D-galactosa y L-galactosa, fucosa, fructosa, D-xilosa, L-arabinosa, ácido D-glucurónico, ácido siálico, ácido D-galacturónico, ácido D-manurónico (por ejemplo, ácido polimanurónico o ácido algínico), D-glucosamina, D-galactosamina, D-glucosa y ácido neuramínico, incluidos homopolisacáridos y heteropolisacáridos tales como lactosa, amilopectina, almidón, hidroxietil almidón, amilosa, sulfato de dextrano, dextrano, dextrinas, glicógeno o la subunidad de polisacáridos de los mucopolisacáridos ácidos, por ejemplo, ácido hialurónico; polímeros de alcoholes de azúcar tales como polisorbitol y polimanitol; heparina, etc.

Otros compuestos también se pueden unir al mismo polímero, por ejemplo, una citotoxina, una etiqueta, u otro agente de direccionamiento, por ejemplo, otro anticuerpo GDF-8 o un ligando no relacionado. Pueden usarse óxidos de polialquilenos (PAO) terminados en alcoxi monoactivados, por ejemplo, polietilenglicoles terminados en monometoxi (mPEG), polímeros terminados en alquilo C<sub>1-4</sub> y óxidos de polietileno bisactivados (glicoles) para entrecruzamiento (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos No. 5.951.974).

En una realización, el polímero antes del entrecruzamiento con el ligando no necesita ser, pero preferiblemente es, soluble en agua. Generalmente, después del entrecruzamiento, el producto es soluble en agua, por ejemplo, exhibe una solubilidad en agua de al menos aproximadamente 0,01 mg/mL, y más preferiblemente al menos aproximadamente 0,1 mg/mL, y aún más preferiblemente al menos aproximadamente 1 mg/mL. Además, el polímero no debe ser altamente inmunogénico en la forma conjugada, ni debe poseer viscosidad que sea incompatible con la infusión intravenosa, la aerosolización o inyección, si el conjugado está destinado a ser administrado por tales vías.

En una realización, el polímero contiene solo un único grupo que es reactivo. Esto ayuda a evitar el entrecruzamiento de moléculas de ligando entre sí. Sin embargo, está dentro del alcance de la presente memoria maximizar las condiciones de reacción para reducir el entrecruzamiento entre moléculas de ligando o purificar los productos de reacción mediante filtración en gel o cromatografía de intercambio iónico para recuperar derivados sustancialmente homogéneos. En otras realizaciones, el polímero contiene dos o más grupos reactivos con el fin de unir múltiples ligandos a la cadena principal del polímero. De nuevo, la filtración en gel o la cromatografía de intercambio iónico se pueden usar para recuperar el derivado deseado en forma sustancialmente homogénea.

El peso molecular del polímero puede oscilar hasta aproximadamente 500.000 D, y preferiblemente es al menos aproximadamente de 20.000 D, o al menos aproximadamente de 30.000 D, o al menos aproximadamente de 40.000 D. El peso molecular elegido puede depender del tamaño efectivo del conjugado a lograr, la naturaleza (por ejemplo, estructura, tal como lineal o ramificada) del polímero, y el grado de formación de derivados.

Se puede usar un enlace covalente para unir un anticuerpo GDF-8 a un polímero, por ejemplo, el entrecruzamiento al grupo amino del extremo terminal N del ligando y de los grupos amino épsilon encontrados en residuos de lisina del ligando, así como otros grupos amino, imino, carboxilo, sulfhidrilo, hidroxilo u otros grupos hidrófilos. El polímero se puede unir covalentemente directamente al anticuerpo GDF-8 sin el uso de un agente de entrecruzamiento multifuncional (ordinariamente bifuncional). La unión covalente a grupos amino se realiza mediante procedimientos químicos conocidos basados en cloruro cianúrico, diimidazol carbonilo, grupos reactivos aldehído (alcóxido de PEG más dietil acetilo de bromoacetaldehído; PEG más DMSO y anhídrido acético, o cloruro de PEG más el fenóxido de 4-hidroxibenzaldehído, ésteres de succinimidilo activados, ditiocarbonato de PEG activado, 2,4,5-triclorofenilcloroformiato o PEG activado con P-nitrofenilcloroformiato). Los grupos carboxilo pueden formar derivados acoplando PEG-amina usando carbodiimida. Los grupos sulfhidrilo pueden formar derivados por acoplamiento a PEG sustituido con maleimido (por ejemplo, alcoxi-PEG amina más sulfosuccinimidil 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato) (véase el documento WO 97/10847) o PEG-maleimida). Alternativamente, los grupos amino libres en el ligando (por ejemplo, grupos amino épsilon en residuos de lisina) pueden tiolarse con 2-imino-tiolano (reactivo de Traut) y luego acoplarse a derivados de PEG que contienen maleimida, por ejemplo, como se describe en Pedley et al. (1994) Br. J. Cancer 70: 1126-30.

Los polímeros de PEG con adición de grupos funcionales que se pueden unir a un anticuerpo GDF-8 están disponibles, por ejemplo, a través de Shearwater Polymers, Inc. (Huntsville, AL). Dichos derivados de PEG disponibles en el mercado incluyen, por ejemplo, amino-PEG, ésteres de aminoácidos de PEG, PEG-hidracida, PEG-tiol, PEG-succinato, PEG carboximetilado, PEG-ácido propiónico, aminoácidos de PEG, succinato de succinimidilo de PEG, propionato de succinimidilo de PEG, éster de succinimidilo de PEG carboximetilado, carbonato de succinimidilo de PEG, ésteres de succinimidilo de aminoácidos de PEG, PEG-oxicarbonilimidazol, PEG-carbonato de nitrofenilo, tresilato de PEG, PEG-glicidil éter, PEG-aldehído, PEG vinilsulfona, PEG-maleimida, PEG-ortopiridil-disulfuro, PEG heterofuncionales, derivados de vinilo de PEG, silanos de PEG y fosfóridos de PEG. Las condiciones de reacción para el acoplamiento de estos derivados de PEG pueden variar dependiendo del anticuerpo GDF-8, el grado deseado de PEGilación y el derivado de PEG utilizado. Algunos factores implicados en la elección de derivados de PEG incluyen: el punto de unión deseado (tal como grupos R de lisina o cisteína), estabilidad hidrolítica y reactividad de los derivados, estabilidad, toxicidad y antigenicidad del enlace, idoneidad para análisis, etc. Las instrucciones específicas para el uso de cualquier derivado particular están disponibles a través del fabricante.

5 Los conjugados de un anticuerpo GDF-8 y un polímero se pueden separar de los materiales de partida sin reaccionar, por ejemplo, mediante filtración en gel o cromatografía de intercambio iónico, u otras formas de cromatografía, por ejemplo, HPLC. Las especies heterólogas de los conjugados se purifican entre sí de la misma manera. La resolución de diferentes especies (por ejemplo, que contienen uno o dos residuos de PEG) también es posible debido a la diferencia en las propiedades iónicas de los aminoácidos sin reaccionar (véase, por ejemplo, el documento WO 96/34015).

10 Se espera que los polinucleótidos y proteínas de la presente invención exhiban uno o más de los usos o actividades biológicas (incluyendo aquellas asociadas con los ensayos citados a continuación) identificados en este documento. Los usos o actividades descritos para proteínas de la presente invención pueden proporcionarse mediante administración o uso de tales proteínas, o mediante administración o uso de polinucleótidos que codifican tales proteínas (tales como, por ejemplo, en terapias génicas o vectores adecuados para la introducción de ADN).

15 Puede ser ventajoso formular composiciones orales o parenterales en forma de unidad de dosificación para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. La forma de unidad de dosificación como se usa en el presente documento 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 de unidades de dosificación de la invención está dictada y depende directamente de las características únicas del compuesto activo, el efecto terapéutico particular que debe alcanzarse, y las limitaciones inherentes en la técnica de formulación de dicho compuesto activo para el tratamiento de individuos.

20 Otro aspecto de la presente divulgación se refiere en consecuencia a kits para llevar a cabo la administración de los anticuerpos contra GDF-8 de la invención, por ejemplo, con o sin otros compuestos terapéuticos, o para usar los anticuerpos anti-GDF-8 como una investigación o herramienta terapéutica para determinar la presencia y/o nivel de GDF-8 en una muestra biológica, tal como un kit de ELISA. En una realización de la divulgación, el kit comprende uno o más anticuerpos anti-GDF-8 formulados en un vehículo farmacéutico, y al menos un agente, por ejemplo, un agente terapéutico, formulado según sea apropiado, en una o más preparaciones farmacéuticas separadas.

25 Los ejemplos que siguen se exponen para ayudar a la comprensión de la invención, pero no se pretende que limiten el alcance de la invención de ninguna manera, y no deben interpretarse como tales. Los ejemplos no incluyen descripciones detalladas de métodos convencionales, tales como formación de hibridomas, ELISA, ensayos de proliferación, análisis de citometría de flujo y técnicas de ADN recombinante. Tales métodos son bien conocidos por los expertos en la técnica.

## 35 Ejemplos

### Ejemplo 1

40 Creación e identificación del anticuerpo RK35 anti-GDF-8

La proteína GDF-8 humana (propéptido GDF-8 y GDF-8 maduro) y la proteína BMP-11 se aislaron y caracterizaron como se describe en la Solicitud de Patente Publicada de Estados Unidos No. 2004/0142382.

45 Se inmunizaron seis ratones hembra BALB/c con desactivación génica de miostatina (8 semanas de edad, McPherron et al., citado más arriba) mediante inyecciones subcutáneas con 20 µg del dímero GDF-8 recombinante en adyuvante completo de Freund.

50 Se administraron varias inyecciones de refuerzo de la misma cantidad de antígeno en adyuvante incompleto de Freund a intervalos de 2 semanas y se administró una inyección intravenosa final (vena de la cola) de 2 µg en PBS antes de la fusión. Los esplenocitos de dos de los ratones que demostraron los títulos de anticuerpos más elevados se fusionaron con células de mieloma de ratón (número de acceso de ATCC P3X63.Ag8.653) usando técnicas estándar (Oi y Herzenberger (1980) en: Mishell, BB, Shiigi, SM, Henry, C., Mishell, RI (Eds.), Selected Methods in Cellular Immunology WH Freeman, San Francisco, págs. 351-72). Después de 10-14 días, los sobrenadantes se recogieron y cribaron para la producción de anticuerpos anti-GDF-8 mediante ELISA en fase sólida y en solución (Whittemore et al., citado más arriba). Se usaron técnicas estándar de ELISA y el ensayo informador con pGL3-(CAGA)<sub>12</sub> (Theis et al. (2001) Growth Factors 18: 251-59) para determinar la IC<sub>50</sub> para la inhibición de la unión de miostatina a su receptor, ActRIIB, usando ActRIIB-Fc quimérico generado fusionando el dominio extracelular del receptor de ActRIIB-Fc humano con la región Fc de IgG1 humana. Los hibridomas elegidos para estudios adicionales se convirtieron en monoclonales mediante dilución limitante repetida para asegurar la monoclonalidad. El anticuerpo monoclonal RK35 se seleccionó para un estudio posterior.

### 60 Ejemplo 2

65 El anticuerpo monoclonal RK35 tiene una alta afinidad por GDF-8 y exhibe actividad de neutralización

**Ejemplo 2.1:** Procedimientos experimentales

Para el ELISA, se recubrió GDF-8 biotinilado durante la noche a 4°C en placas de microtitulación de estreptavidina de 96 pozos (Pierce, Rockford, IL) a razón de 1 µg/mL. Después del recubrimiento, las soluciones se eliminaron de los pozos, y las placas se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente en solución SuperBlock (Pierce). Las placas se enjuagaron con PBS y se añadieron 100 µl de anticuerpo RK35 a los pozos a diversas concentraciones. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora y luego se lavaron con PBS. A cada pozo, se le añadieron 100 µl de una dilución 1:5.000 de conjugado anti-hulgG-HRP (Southern Biotech, Birmingham, AL) y las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Cada placa se lavó tres veces con PBS. Se añadió sustrato de TMB (100 µl) a cada pozo y se incubó hasta el desarrollo del color. La reacción se detuvo mediante la adición de 100 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,18 M. La señal generada se midió leyendo la absorbancia a 450 nm usando un lector de placas de microtitulación. La unión a GDF-8 se confirmó usando anticuerpo de control de isotipo humano.

Se recubrieron placas de ensayo de fondo plano de 96 pozos con quimera de ActRIIB-Fc (R & D Systems, Minneapolis, MN, Cat. No. 339-RB/CF) (Costar, NY, Cat. No. 3590) a razón de 1 µg/mL en regulador de carbonato de sodio 0,2 M durante la noche a 4°C. Las placas se bloquearon luego con 1 mg/mL de albúmina de suero bovino y se lavaron siguiendo el protocolo de ELISA estándar. Se añadieron alícuotas (100 µL) de GDF-8 o BMP-11 biotinilado a la placa de ELISA bloqueada a diversas concentraciones, se incubaron durante 1 h, se lavaron, y se detectó la cantidad de GDF-8 o BMP-11 unido mediante estreptavidina-peroxidasa rábano picante (SA-HRP, BD PharMingen, San Diego, CA, Cat. No. 13047E) seguido de la adición de TMB (KPL, Gaithersburg, MD, Cat. No. 50-76-04). Las mediciones colorimétricas se hicieron a 450 nm en un lector de microplacas de Molecular Devices. Para analizar la actividad inhibidora, se probó RK35 a diversas concentraciones por preincubación con 20 ng/mL de GDF-8 o 20 ng/mL de BMP-11. Después de la incubación durante 1 hora a temperatura ambiente, se añadieron 100 µL de mezcla de RK35 y GDF-8 o BMP-11 a la placa. La detección y cuantificación del factor unido se describe en Whittemore et al. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 300: 965-71.

Para demostrar la actividad de GDF-8, se desarrolló un ensayo de gen informador (RGA) usando un vector informador pGL3(CAGA)<sub>12</sub> que expresa luciferasa bajo el control del promotor inducido por TGF-β. La CAGA es una secuencia sensible a TGF-β dentro del promotor del gen PAI-1 inducido por TGF-β (Denner et al. (1998) *EMBO J.* 17: 3091-3100). Se elaboró un vector informador que contenía 12 cajas de CAGA usando el plásmido informador de luciferasa básico pGL3 (Promega, Madison, WI). La caja TATA y el sitio de inicio de la transcripción del promotor posterior principal de adenovirus (-35/+10) se insertaron entre los sitios BglIII y HindIII. Los oligonucleótidos que contienen 12 repeticiones de las cajas CAGA, es decir, AGCCAGACA, se hibridaron y clonaron en el sitio XhoI. La línea celular de rhabdomyosarcoma humano A204 (ATCC HTB-82) se transfectó transitoriamente con pGL3(CAGA)<sub>12</sub> usando el reactivo de transfección FuGENE 6 (Boehringer Mannheim, Alemania). Después de la transfección, las células se cultivaron en placas de 96 pozos en medio 5A de McCoy complementado con glutamina 2 mM, 100 U/mL de estreptomina, 100 µg/mL de penicilina y 10% de suero de ternero fetal durante 16 horas. Las células se trataron luego con o sin 10 ng/mL de GDF-8 en medio 5A de McCoy 5A con glutamina, estreptomina, penicilina y 1 mg/mL de albúmina de suero bovino durante 6 horas a 37°C. La luciferasa se cuantificó en las células tratadas usando el sistema de ensayo de luciferasa (Promega). Para probar la actividad inhibidora de RK35, se preincubó GDF-8 con el anticuerpo durante 1 hora a temperatura ambiente. Esta mezcla se añadió luego a las células transfectadas y las células se incubaron durante 6 horas a 37°C. La luciferasa se cuantificó usando el sistema de ensayo de luciferasa (Promega).

**Ejemplo 2.2:** Resultados

Se generó un anticuerpo monoclonal de ratón de alta afinidad para la miostatina mediante la inmunización de ratones desactivados para GDF-8 con GDF-8 humana recombinante purificada, que es idéntica en secuencia de aminoácidos a la miostatina murina madura (McPherron et al., 1997). El anticuerpo RK35 se unió con alta afinidad a GDF-8 según se ensayó mediante ELISA directo (4 nM; Figura 1A). Se utilizó un ELISA de competencia para evaluar la capacidad de RK35 para inhibir la unión de GDF-8 a su receptor de alta afinidad, ActRIIB. RK35 bloqueó la unión de GDF-8 biotinilado a ActRIIB-Fc inmovilizado con una IC<sub>50</sub> ~ 2,5 nM (Figura 1B). ActRIIB soluble también bloqueó la unión de GDF-8 a ActRIIB-Fc inmovilizado, mientras que los anticuerpos de control no bloquearon la unión. La actividad de neutralización de RK35 también se midió usando un ensayo informador basado en células pGL3-(CAGA)<sub>12</sub>. En este ensayo, el gen de luciferasa se clonó bajo el control del promotor sensible a GDF-8/TGF-β y las células de rhabdomyosarcoma humano A204 se transfectaron transitoriamente con el plásmido informador. Los aumentos en la actividad de luciferasa en células A204 inducida por GDF-8 se bloquearon de una forma dependiente de la dosis por RK35 (Figura 1C). RK35 redujo la actividad de transducción de señal de GDF-8 con una IC<sub>50</sub> de 0,2 nM. Por lo tanto, RK35 es un nuevo anticuerpo neutralizante monoclonal murino altamente potente dirigido contra GDF-8.

**Ejemplo 3**

Actividad *in vivo* de RK35 en modelos de roedor con ALS y de tipo silvestre

**Ejemplo 3.1:** Procedimientos experimentales**Ejemplo 3.1.1:** Animales y tratamiento con fármaco

5 Todos los procedimientos que involucran animales fueron aprobados por el IACUC de la Universidad de Pensilvania o Wyeth. Los ratones transgénicos que expresan SODG93A humana (Gurney et al., citado más arriba) sobre un fondo híbrido B6SJL (Jackson Laboratories) se aparearon internamente con ratones reproductores hembra B6SJLF1 (Jackson Laboratories). La progenie se cribó por PCR; se utilizaron ratones negativos para el transgén como controles de tipo silvestre de camada de la misma edad. Los ratones se dividieron en cuatro grupos: 29 ratones SODG93A tratados con el anticuerpo anti-miostatina RK35, 28 ratones SODG93A tratados con solución salina regulada con fosfato (PBS) (vehículo), 23 ratones de tipo silvestre tratados con RK35 y 23 ratones de tipo silvestre tratados con PBS. Comenzando a los 28 días después del nacimiento, los ratones fueron inyectados intraperitonealmente semanalmente, con anticuerpo monoclonal anti-GDF-8 RK35 o un volumen equivalente de PBS. La primera dosis fue de 40 mg/kg; las dosis posteriores fueron de 20 mg/kg/semana siguiendo el protocolo descrito para el anticuerpo anti-miostatina JA16 (Whittemore, et al., citado más arriba). Se sacrificaron 9-12 ratones de cada grupo entre 84 y 90 días (12 semanas) de edad (media de 88 días) para evaluar la masa muscular húmeda y la histología, y los ratones restantes se monitorizaron hasta alcanzar la enfermedad en etapa terminal (~ 134 días), que se define como una falla a la derecha dentro de los 30 segundos de yacer en forma lateral izquierda y derecha.

20 Al mismo tiempo, se administró a ratas transgénicas (58) que expresan SODG93A humano (Howland et al., citado más arriba) en una mezcla igual de machos y hembras, PBS (vehículo) o RK35. Diez ratas en cada grupo fueron sacrificadas a los 95 días de edad para determinar el efecto de RK35 sobre la masa muscular húmeda. Las 19 ratas restantes en cada grupo continuaron hasta la etapa terminal de la enfermedad. Se usó un segundo estudio en el que se usaron ratas de control de camada hembra transgénicas y de tipo silvestre para comparar los aumentos de peso corporal y los cambios en la fuerza de prensión entre los grupos de tratamiento y el genotipo. En cada estudio, las ratas fueron inyectadas intraperitonealmente con RK35 a razón de 40 mg/kg (a las 6 semanas (~42 días) de edad) y posteriormente inyectadas con 20 mg/kg/semana o vehículo continuando bien sea hasta sacrificio a los 95 días para analizar la masa muscular o hasta la etapa terminal medida por falla refleja derecha.

#### 25 **Ejemplo 3.1.2:** Peso corporal y mediciones de masa muscular

30 Los pesos corporales iniciales se usaron para distribuir equitativamente animales entre las cohortes a fin de garantizar el peso corporal promedio equivalente al inicio del estudio. El inicio de la pérdida de peso se calificó como la edad a la que se observó la primera de tres medidas consecutivas de pérdida de peso. La masa muscular húmeda se determinó en el gastrocnemio, el tibial craneal, el cuádriceps y el diafragma en un punto compatible con enfermedad temprana (88 días para ratones, 95 días para ratas) y en etapa terminal (~ 134 días para ratones y ~ 128 días para las ratas). Los animales se sacrificaron y los músculos de cada pata se diseccionaron y pesaron cuantitativamente; los valores de las patas derecha e izquierda se promediaron.

#### 35 **Ejemplo 3.1.3:** Histopatología muscular y recuento de neuronas motoras

40 El gastrocnemio y el diafragma se fijaron y seccionaron para la tinción con H&E (Howland et al. (2002) Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A. 99: 1604-29). La puntuación para la atrofia y la hipertrofia fue realizada por dos patólogos independientes, sin conocimiento de la identidad de la muestra. Los diámetros de fibra se midieron por morfometría (Axiovision 4.3, Zeiss, Thornwood, NY) en músculo gastrocnemio (ratones SODG93A tratados con PBS y RK35 y ratones de tipo silvestre tratados con PBS) a los 88 días y etapa terminal, así como para el músculo del diafragma (SODG93A tratados con PBS y RK35 y ratones de tipo silvestre tratados con PBS) y etapa terminal. Se congelaron en forma instantánea tres músculos por grupo en isopentano enfriado con hielo seco, se sometieron a criosección a un espesor de 8 µm y se inmunotifieron usando un anticuerpo anti-laminina (Sigma, St. Louis, MO; número de catálogo L9393). Se tomaron medidas lineales del diámetro máximo del eje menor de al menos doscientas fibras, utilizando el software Zeiss Axiovision. Los diámetros de fibra se agruparon en intervalos de 20 µm, y se generaron histogramas de frecuencia para cada grupo muscular.

50 Se realizaron recuentos de neuronas motoras en 3 ratones de cada grupo (de tipo silvestre, SODG93A tratado con PBS, y SODG93A tratado con RK35) tanto en enfermedad en etapa inicial como en la etapa terminal (se analizaron un total de 18 ratones). Las médulas espinales eliminadas de los ratones decapitados se fijaron posteriormente en paraformaldehído al 4%, luego se diseccionaron los cordones y se fijaron posteriormente durante 24 horas adicionales en paraformaldehído al 4%. Usando la tecnología MultiBrain<sup>MR</sup> (Neuroscience Associates, Knoxville, TN), se embebieron 18 médulas espinales lumbares en un solo bloque y se seccionaron transversalmente hasta 50 µm en el plano coronal a lo largo de todo el segmento (~ 6 mm) de la ampliación lumbar. Cada sexta sección (300 µm) se tiñó con tiónina NISSL para revelar cuerpos celulares (Bjugn (1993) Brain Res. 627: 25-33; Kieran et al. (2004) Nat. Med. 10: 402-05). Los recuentos se realizaron utilizando dos enfoques independientes. En primer lugar, se analizaron diez secciones de la médula espinal que abarcaban L3-5 para cada uno de 18 ratones por un observador sin conocer la identidad de la muestra utilizando Zeiss Axoplan2 a 20x y 40x. Se contaron las dos astas ventrales de cada sección, identificando neuronas motoras grandes y sanas mediante la presencia de nucléolos visibles como se describió previamente (Kieran et al., citado más arriba). Los datos resultantes se representaron como el número promedio de neuronas motoras grandes por asta ventral. En segundo lugar, las secciones de la región L3-L5 se analizaron estereológicamente usando un Zeiss Axioskop2 equipado con una etapa de muestra motorizada, microcator electrónico y software de estereología (Stereo Investigator (MBF Bioscience, Williston, VT), como se describe (West et al., (1991) Anat. Rec. 231: 482-97;

Schmitz y Hof (2000) *J. Chem. Neuroanat.*, 20: 93-114; Schmitz y Hof (2005) *Neuroscience* 130: 813-31); las neuronas motoras  $\alpha$  se puntuaron como neuronas con un área de proyección máxima superior a 300  $\mu\text{m}^2$ .

**Ejemplo 3.1.4:** Análisis fenotípico

5 Las mediciones de la fuerza de agarre (Columbus Instruments, Columbus, OH) se realizaron quincenalmente comenzando 28 días después del nacimiento en las extremidades anteriores y posteriores de los ratones tratados y de control (n = 8-24) como se describe (LaMonte et al. (2002) *Neuron* 34: 715-24). Se probaron ratas transgénicas y de tipo silvestre con respecto a la fuerza de agarre de la extremidad anterior dos veces por semana usando un medidor de fuerza de agarre Dunnett (MJS Technology, Stevenage, Hertfordshire, Inglaterra) en la fase temprana de la enfermedad (entre 95 y 110 días después del nacimiento, n = 10). Las ratas también se analizaron mediante un cilindro giratorio (Ugo Basile, Comerio, Italia) y se monitorizaron las anomalías en la marcha y los grados de movilidad de las extremidades (datos no mostrados).

15 **Ejemplo 3.1.5:** Electrofisiología

Se realizaron registros de electromiografía (EMG) y análisis de datos sin conocer el genotipo y el grupo de tratamiento. Las ratas anestesiadas con Nembutal mantenidas a 35-37°C de temperatura corporal se sometieron a EMG con aguja insertando un electrodo de aguja monopolar concéntrico (9013R0011, Medtronic, MN, EE.UU.) en el músculo del diafragma expuesto quirúrgicamente hasta que aparecieron ráfagas de patrón de interferencia de EMG con cada inspiración. Las señales eléctricas se adquirieron a 20 KHz con una configuración de BIOPAC que consta de la unidad de adquisición de datos MP 150, el módulo de interfaz universal UIM100C, el módulo de electromiografía EMG100C y el software Acknowledge (BIOPAC Systems Inc, Goleta, CA). Las señales se analizaron primero para eliminar el artefacto de 60 Hz y el paso de banda filtrado entre 500 y 1.000 Hz para eliminar los artefactos de movimiento debido a la respiración y para enfatizar las descargas de la unidad de motor. Las ráfagas de EMG se identificaron mediante la rectificación de la señal, filtrado de paso bajo a 10 Hz, y luego se detectaron los tiempos en los que la envolvente resultante era mayor que su valor medio. Las ráfagas que duraron menos de 100 ms no se contaron, y los períodos sin ráfaga que duraron menos de 100 ms se contaron como parte de las ráfagas circundantes. Finalmente, los picos en la señal no rectificadas se detectaron usando un umbral de detección de pico establecido igual a tres veces la desviación estándar de la amplitud de la señal durante los períodos sin ráfagas. El análisis de ráfagas de picos se realizó con un software personalizado escrito por K.C. McGill (Universidad de Stanford, CA), y la tasa de pico de ráfaga (Hz) para cada animal se calculó como el número medio de picos por ráfaga dividido por la duración media de la ráfaga.

**Ejemplo 3.1.6:** Análisis de datos y estadísticas

35 Se aplicó un modelo de ANOVA de medidas repetidas de dos factores sobre los datos de peso corporal, así como todos los datos de fuerza de agarre utilizando un procedimiento mixto SAS. Se aplicó un modelo lineal de ANOVA de dos factores sobre los datos de masa muscular utilizando el procedimiento GLM de SAS. Los datos de electrofisiología se analizaron mediante la prueba t de dos muestras. Para los datos de recuento de neuronas motoras, se usó un modelo lineal generalizado (GLM) que asumió la distribución de Poisson. Los datos de fibra muscular se analizaron mediante ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey. Las comparaciones se consideraron estadísticamente significativas cuando los valores de p fueron menores de 0,05; las comparaciones con 0,05 < p < 0,15 se anotaron como tendencias.

45 **Ejemplo 3.2:** Resultados

**Ejemplo 3.2.1:** El tratamiento con RK35 aumentó el peso corporal de los roedores SODG93A pero no amplió la supervivencia

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

60 Las ratas transgénicas SODG93A también se trataron con anticuerpo RK35 comenzando 42 días después del nacimiento y continuando con la enfermedad hasta etapa terminal (~128 días de edad). El tratamiento con RK35 anti-miostatina condujo a un aumento del peso corporal en ratas SODG93A en comparación con las ratas tratadas con PBS (Figura 2B). Las ratas transgénicas que recibieron RK35 pesaron significativamente más que las ratas transgénicas tratadas con PBS tan pronto como 60 días después del nacimiento (p < 0,05), lo que corresponde a 3 semanas después del inicio de la dosificación. Las ratas macho tratadas con RK35 alcanzaron un máximo de 458,8  $\pm$  6,5 g a los 96 días, un aumento del 10% sobre las ratas macho tratadas con PBS de 419,1  $\pm$  10,7 g. Las hembras tratadas con RK35 alcanzaron un máximo de 289,7  $\pm$  9,3 g, un aumento del 15% sobre las hembras tratadas con PBS de 252,8  $\pm$  6,0 g.

Las ratas SODG93A tratadas con PBS o RK35 comenzaron a mostrar una pérdida de peso significativa después de ~112 días debido a la progresión de la enfermedad; el tratamiento con RK35 no retrasó el inicio de la pérdida de peso. Mientras que el tratamiento con RK35 condujo a aumentos significativos en el peso corporal, los inventores no observaron efectos del tratamiento con RK35 sobre la supervivencia. El tiempo hasta la etapa terminal, medida usando el punto final definido de falla a la derecha en 30 segundos, fue de  $132 \pm 8$  días para los ratones SODG93A tratados con RK35 ( $n = 16$ ), mientras que los ratones SODG93A tratados con PBS alcanzaron la etapa terminal a los  $134 \pm 7$  días ( $n = 17$ ). Las ratas SODG93A tratadas con RK35 alcanzaron la etapa terminal en  $125 \pm 8$  días en comparación con  $128 \pm 6$  días en las ratas SODG93A tratadas con PBS. Ninguna de estas diferencias fue estadísticamente significativa, lo que indica que la inhibición de miostatina no retrasa el tiempo hasta la enfermedad en etapa terminal en modelos de ALS en ratón o en rata.

### Ejemplo 3.2.2: Efectos de la inhibición de la miostatina en la masa muscular y la fuerza

Para determinar si la inhibición de la miostatina disminuía la pérdida muscular, se sacrificaron ratones transgénicos SODG93A y de tipo silvestre de cada grupo a los 88 días después del nacimiento, un punto de tiempo cercano al aumento máximo del peso corporal inducido por el tratamiento con RK35. En este momento, los ratones SODG93A tratados con PBS muestran disminuciones significativas en la masa muscular en el gastrocnemio, tibial craneal y cuádriceps en relación con los ratones de control de tipo silvestre consistentes con la enfermedad en etapa temprana (Figura 2C). Por el contrario, los ratones SODG93A tratados con RK35 mostraron mejorías estadísticamente significativas en la masa muscular en todos los músculos examinados en comparación con los ratones SODG93A tratados con PBS de la misma edad en el punto de tiempo de 88 días que oscilaba entre ~ 19% y 32% (músculo gastrocnemio, +26%; tibial craneal, +19%; cuádriceps, +32%). Aunque no se observó una pérdida significativa de masa muscular en diafragmas de ratones SODG93A tratados con PBS durante la enfermedad en etapa temprana; el tratamiento con RK35 también indujo un aumento significativo en la masa de este músculo (+21%).

Los ratones restantes en cada cohorte se monitorizaron hasta la etapa terminal tal como se define mediante la prueba de reflejo derecha. En la etapa terminal, se observó pérdida de masa muscular de las patas tanto en ratones SODG93A tratados con RK35 como tratados con PBS (Figura 2E). En contraste con las observaciones en el tejido de ratones de 88 días, en la fase terminal de la enfermedad, los ratones SODG93A tratados con PBS mostraron una reducción significativa en la masa del músculo del diafragma en relación con los animales de tipo silvestre (Figura 2E). Sin embargo, el aumento inducido por RK35 en la masa del diafragma observado en ratones SODG93A tratados permaneció significativo en la etapa terminal, lo que indica que la inhibición de la miostatina disminuyó la atrofia del diafragma en el ratón SODG93A.

Los efectos del anticuerpo anti-miostatina sobre la masa muscular también se investigaron en ratas SODG93A. Similar a las observaciones hechas en ratones, las ratas SODG93A de ~ 95 días de edad, tratadas con RK35 mostraron un aumento significativo de la masa sobre las ratas SODG93A tratadas con PBS en gastrocnemio (+ 17%), tibial craneal (+ 30%), cuádriceps (+ 30%) y músculos del diafragma (+ 17%) (Figura 2D). Para la enfermedad en etapa terminal, la atrofia del músculo de la pata era evidente tanto en ratas SODG93A tratadas con PBS como con RK35 (Figura 2F). Una tendencia hacia el aumento de la masa muscular de la pata como resultado del tratamiento con RK35 en las ratas SODG93A persistió hasta la etapa terminal, pero estos efectos no alcanzaron significación. Sin embargo, un incremento robusto y significativo del 35% en la masa del diafragma de ratas SODG93A tratadas con RK35 sobre controles tratados con PBS (~35%) todavía era evidente en la enfermedad terminal (Figura 2F), de acuerdo con las observaciones realizadas con ratones SODG93A (Figura 2E).

Para probar los efectos de la inhibición de la miostatina en la función muscular, se realizaron ensayos cuantitativos de resistencia al agarre en ratones tratados con RK35 y PBS. Tanto los ratones SODG93A tratados con RK35 como los tratados con PBS mostraron un aumento en el desarrollo de la fuerza de agarre de las extremidades posteriores entre los 28 y 56 días después del nacimiento. A los 56 días después del nacimiento, los ratones SODG93A tratados con PBS se vuelven significativamente más débiles que los ratones control de la misma edad (Figura 3A) ( $p < 0,0001$ ). Mientras que disminuciones en la fuerza de agarre también fueron evidentes en ratones SODG93A tratados con RK35 a los 63 días después del nacimiento, los ratones tratados con RK35 permanecieron significativamente más fuertes (o tendieron a ser más fuertes) que los ratones SODG93A tratados con PBS de 49 a 88 días después del nacimiento ( $p < 0,05$ ). El análisis de la fuerza de agarre de la extremidad anterior mostró un patrón similar (Figura 3B). La fuerza máxima de la extremidad anterior en ratones SODG93A tratados tanto con PBS como con RK35 se observó aproximadamente 49 y 56 días después del nacimiento, respectivamente. Los ratones SODG93A tratados con PBS se volvieron significativamente más débiles que los animales de tipo silvestre a los 56 días después del nacimiento ( $p < 0,05$ ) y continuaron disminuyendo a partir de entonces. Los ratones SODG93A tratados con RK35 fueron más fuertes que los ratones SODG93A tratados con PBS de 56 a 88 días de edad (56 d,  $p = 0,08$ , 63 d:  $p = 0,06$ , 70-88 d,  $p < 0,001$ ). Estos datos indican que la inhibición de la miostatina disminuye la pérdida de la función muscular a través de la enfermedad en etapa temprana en los ratones SODG93A. Sin embargo, después de ~ 100 días, las disminuciones en la fuerza de agarre fueron similares en los ratones SODG93A tratados y no tratados.

Para determinar si el tratamiento con RK35 indujo cambios similares en ratas SODG93A, también se analizó la fuerza de agarre de las extremidades anteriores en ratas SODG93A tratadas con RK35 y PBS y compañeros de camada de tipo silvestre de la misma edad durante la enfermedad en etapa temprana (Figura 3C). Las ratas SODG93A tratadas

5 con PBS fueron significativamente más débiles que los controles de tipo silvestre, lo que confirma que las ratas SODG93A también exhiben una fase de enfermedad temprana que precede los déficits motores manifiestos y la pérdida de peso de una manera similar a los ratones. Las mediciones de la fuerza de agarre de las ratas SODG93A tratadas con RK35 fueron generalmente más bajas que las de las ratas silvestres tratadas con PBS, aunque los grupos no fueron significativamente diferentes. La inhibición de la miostatina en ratas SODG93A mejoró significativamente la fuerza de agarre en comparación con las ratas SODG93A tratadas con PBS en este intervalo de edad.

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

15 También se examinaron los efectos del tratamiento con RK35 sobre la morfología muscular. Se examinaron el diafragma y el músculo gastrocnemio medial de ratones SODG93A de 88 días (enfermedad en etapa temprana) y ~ 134 días (enfermedad terminal), comparando los efectos del tratamiento con RK35 con los de PBS, en paralelo con tejido de controles de tipo silvestre de la misma edad. Se anotó el grado de atrofia e hipertrofia en cada tejido en un análisis ciego (0, ninguno; 1, leve; 2, suave; 3, moderado; 4, marcado; 5, severo) como se muestra en la Tabla 4. Los ratones SODG93A tratados con PBS mostraron una atrofia significativa del gastrocnemio en la etapa inicial de la enfermedad (puntuación media de 2,0 y Figura 4B). La contracción observada de las fibras musculares, los núcleos centralmente colocados y los núcleos condensados de cromatina eran consistentes con los músculos sometidos a denervación activa; también hubo evidencia de inflamación en comparación con ratones de tipo silvestre (Figura 4A y B). Por el contrario, el gastrocnemio de ratones SODG93A en fase temprana tratados con RK35 (Figura 4C) mostró poca o ninguna atrofia (Tabla 4, puntuación media de 0,3). Estos resultados apoyan los datos de masa muscular que indican que la atrofia del músculo esquelético de la pata en la enfermedad en fase temprana (88 días después del nacimiento) en los ratones SODG93A se reduce significativamente por la inhibición de la miostatina.

25 El examen de gastrocnemio de ratones SODG93A en etapa terminal confirmó atrofia muscular moderada en ambos grupos tratados con PBS (Tabla 4, puntuación media de 3,0) y con RK35 (Tabla 4, puntuación media de 3,3) (Figura 4E y F) sin signos degenerativos en músculo de tipo silvestre (Figura 4D). Estos resultados son consistentes con los datos de la masa muscular, lo que indica que los efectos protectores de la inhibición de la miostatina en la enfermedad temprana no persisten a través de la enfermedad en etapa terminal en ratones SODG93A.

30 El diafragma de ratones SODG93A tratados con PBS o tratados con RK35 mostró poca o ninguna atrofia (Tabla 4, puntajes promedio de 0,6) en comparación con ratones de tipo silvestre a los 88 días. Sin embargo, en etapa terminal, se observó atrofia leve a moderada en el diafragma de ratones SODG93A tratados con PBS (Figura 4H, Tabla 4, puntuación media de 2,3). Por el contrario, el diafragma de ratones SODG93A tratados con RK35 analizados en la enfermedad terminal no mostró signos significativos de atrofia en comparación con animales SODG93A tratados con PBS (Tabla 4, compárense las Figuras 4H y 4I), similar al diafragma de ratones de tipo silvestre de la misma edad (Figura 4G). Tomados en conjunto, la masa muscular y la evaluación histológica indican que la inhibición de la miostatina por RK35 preserva el diafragma, pero no la integridad del músculo esquelético de la pata hasta la etapa terminal de la enfermedad.

40 Tabla 4: Resumen de la patología muscular observada en ratones SODG93A tratados con PBS o RK35, en comparación con ratones de control de tipo silvestre de la misma edad.

genotipo:	G93A	G93A	TS	G93A	G93A	TS
RK35:	-	+	-	+		
Edad:	88d	88d	88d	134d	134d	134d
# ratones:	3	3	3	3	3	3
<hr/>						
gastrocnemio						
hipertrofia	0	0	0	0	0	0
atrofia	2	0,3	0	3,0	3,3	0
<hr/>						
diafragma						
hipertrofia	0	0,6	0	0	1,7	0
atrofia	0,6	0,6	0	2,3	0	0
<hr/>						
Puntuación: 0, ninguno; 1, leve; 2, suave; 3, moderado; 4, marcado; 5, severo						

45 El análisis del tamaño de la fibra muscular en gastrocnemio y músculo del diafragma mostró un patrón similar. Las distribuciones de frecuencia de las mediciones de diámetro de fibra del músculo gastrocnemio de 88 días muestran un

desplazamiento hacia fibras más pequeñas en ratones SODG93A (Figura 5A) en comparación con ratones de control de tipo silvestre (Figura 5C). La distribución de diámetros de fibra de ratones SODG93A tratados con RK35 (Figura 5B) es intermedia entre ratones SODG93A no tratados y ratones de tipo silvestre durante la enfermedad en etapa temprana. Sin embargo, en etapa terminal, el diámetro medio de la fibra en el músculo gastrocnemio de los ratones SODG93A tratados con RK35 no difirió significativamente de los ratones SODG93A tratados con PBS (datos no mostrados). Los diámetros promedio de fibra en el músculo gastrocnemio de ratones SODG93A tratados con RK35 y tratados con PBS fueron significativamente diferentes que los de tipo silvestre en etapa terminal, lo que es consistente con la marcada atrofia muscular observada por histología. Las diferencias significativas en el tamaño de la fibra entre ratones de tipo silvestre y SODG93A tratados con PBS también fueron evidentes en la etapa terminal en el músculo del diafragma. El tamaño de la fibra del músculo del diafragma de ratones SODG93A tratados con RK35 mostró un cambio significativo en el diámetro promedio de la fibra, lo que condujo a una distribución de tamaño intermedia entre ratones de tipo silvestre y SODG93A tratados con PBS (Figura 5D).

Los efectos de la expresión de SODG93A sobre la actividad eléctrica del músculo del diafragma (Figuras 4J y 4K) se examinaron a continuación usando el modelo de rata en un momento correspondiente al inicio clínico (~112 días; Howland et al., (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 1604-09). La EMG mostrada para el grupo de rata SODG93A tratado con PBS muestra una actividad pico escasa, así como cierta presencia de actividad espontánea anormal (Figura 4J). La actividad pico de las ratas SODG93A tratadas con RK35 fue similar a la observada para las ratas de tipo silvestre, sin evidencia de actividad espontánea anormal. Como se muestra en la Figura 4K, el músculo del diafragma de ratas transgénicas SODG93A mostró una disminución estadísticamente significativa en las tasas de pico de ráfaga de EMG indicativo de una función alterada. Por el contrario, las ratas SODG93A tratadas con RK35 mostraron una tasa de pico de ráfaga que fue significativamente mayor que las ratas SODG93A tratadas con PBS, y que no fue significativamente diferente de los controles de tipo silvestre de la misma edad. Por lo tanto, la inhibición de la miostatina por RK35 fue efectiva para preservar tanto la estructura del diafragma como la función del diafragma.

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

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

Los recuentos de neuronas motoras lumbares grandes (Figuras 6A-D) en ratones SODG93A tratados con PBS (Figura 6F) disminuyeron significativamente en comparación con los controles de tipo silvestre de compañeros de camada (Figura 6E). El tratamiento con RK35 redujo la pérdida de neuronas motoras en la etapa temprana de la enfermedad (Figura 6G) a un nivel intermedio entre ratones SODG93A tratados con PBS y ratones de tipo silvestre.

Para la enfermedad en etapa terminal, pérdidas significativas de neuronas motoras grandes en el asta ventral lumbar así como gliosis aumentada fueron evidentes en los ratones SODG93A independientemente del tratamiento (Figuras 6I y J) sin cambios correspondientes notados en ratones de tipo silvestre (Figura 6H).

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

En etapa terminal, los recuentos de neuronas motoras tanto en ratones SODG93A tratados con RK35 y tratados con PBS fueron significativamente diferentes de los ratones de control de tipo silvestre mediante ambos métodos de análisis (Figuras 6C y D). Estos datos son consistentes con los datos sobre la estructura y la función del músculo esquelético presentados anteriormente en que las mejoras mediadas por RK35 observadas durante la etapa temprana de la enfermedad no se mantienen en etapa terminal.

#### Ejemplo 4

Discusión

La ALS es una enfermedad mortal y progresiva en la que las neuronas motoras de la médula espinal y el tronco encefálico se degeneran con posterior atrofia muscular. Se ha prestado considerable atención a los mecanismos implicados en la muerte de las células de neuronas motoras. Varios estudios recientes han sugerido que múltiples tipos de células pueden estar involucradas en la etiología de la enfermedad al monitorizar la producción de factores clave en el microambiente extracelular de la unión neuromuscular (Bruijn et al. (2004) *Annu. Rev. Neurosci.* 27: 723-49). Los estudios que usan ratones quiméricos han mostrado que la presencia de células no neuronales de tipo silvestre puede extender la supervivencia de neuronas motoras que expresan SOD1 mutante (Clement et al., (2003) *Science* 302: 113-17). Estas observaciones han conducido a la investigación de terapias que puedan ralentizar la degeneración neuronal al proporcionar un microambiente óptimo para la supervivencia. Por ejemplo, se ha demostrado que la administración en el músculo de factores de crecimiento expresados viralmente que incluyen IGF-1, GDNF y VEGF prolonga la supervivencia en el modelo de ratón SODG93A (Kaspar et al. (2003) *Science* 301: 839-42; Azzouz et al. (2004) *Nature* 429: 413-17, Wang et al. (2002) *J. Neurosci.* 22: 6920-28). Además, la expresión específica de músculo de IGF-1 ha demostrado estabilizar las uniones neuromusculares, mejorar la supervivencia de las neuronas motoras y retrasar el inicio y la progresión de la enfermedad en el modelo de ratón transgénico SODG93A, indicando que los efectos directos sobre el músculo pueden afectar el inicio y progresión de la enfermedad (Dobrowolny et al. (2005) *J. Cell. Biol.* 168: 193-99). Los cambios en el metabolismo muscular y la vulnerabilidad de las neuronas motoras también se han informado en ratones con ALS, lo que respalda aún más la hipótesis de que el músculo puede ser un conductor activo de la patología de la enfermedad (Dupois et al. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 11159 -64).

La miostatina o GDF-8, es un inhibidor endógeno del crecimiento muscular que provoca su función biológica, al menos en parte, mediante la activación del receptor de Activina IIb (ActRIIb), lo que produce la represión de la proliferación y diferenciación de las células de mioblastos (Langley et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277: 49831-40; Thomas et al. (2000) *J. Biol. Chem.* 275: 40235-43). Se ha demostrado que la inhibición de la función de GDF-8 usando anticuerpos neutralizantes anti-GDF-8 mejora la masa muscular y la fuerza en ratones adultos sanos y proporciona una mejora funcional en el modelo de ratón mdx de distrofia muscular (Whittemore et al., *Biochem* 2003). *Biophys. Res. Commun.* 300: 965-71; Bogdanovich et al. (2002) *Nature* 420: 418-21). Para comprender mejor el papel del músculo en la progresión de la enfermedad de las neuronas motoras, se usó un nuevo anticuerpo neutralizante para GDF-8, RK35, que se une con mayor afinidad que un reactivo descrito anteriormente (IC<sub>50</sub> 3 nM para RK35 frente a > 100 nM para JA16; Whittemore et al. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 300: 965-71; Bogdanovich et al. (2002) *Nature* 420: 418-21), lo que resulta en mayores aumentos en la masa muscular en ratones de tipo silvestre tratados con RK35. (datos no mostrados).

En modelos de ratón y rata SODG93A de ALS familiar, el tratamiento con RK35 dio como resultado un aumento del peso corporal y un aumento de la masa y la fuerza muscular durante las primeras fases de la enfermedad de neuronas motoras. Esta fase temprana de la enfermedad se define como la edad (56-88 días después del nacimiento) a la que los ratones SODG93A muestran una pérdida significativa de la fuerza muscular, medida por la evaluación de la fuerza de agarre (Ligon et al. (2005) *Neuroreport* 16: 533-36) y anomalías de la marcha (Wooley et al. (2005) *Muscle Nerve* 32: 43-50), y que coincide con la denervación de las uniones neuromusculares (Frey et al. (2000) *J. Neurosci.* 20: 2534-42; Fischer et al. al (2004) *Experimental Neurology* 185: 232-40). Los incrementos de masa muscular resultantes de la inhibición de GDF-8 por RK35 fueron más evidentes en los músculos cuádriceps, pero también fueron pronunciados en el gastrocnemio, el tibial craneal y el diafragma en ambos modelos de roedores probados. Estos aumentos se correlacionaron bien con el aumento de la fuerza, ya que la fuerza de las extremidades traseras y anteriores disminuyeron más lentamente en los ratones tratados con RK35 en comparación con los controles. El grado de aumento de la masa muscular inducido por el tratamiento con el anticuerpo anti-GDF-8 RK35 fue similar en magnitud a un aumento del 25% en la masa muscular observada en ratones heterocigotos para la alteración del gen de GDF-8; la masa muscular de ratones que son homocigóticos nulos para GDF-8 es aproximadamente el doble de la de ratones de tipo silvestre (McPherron (1997) *Nature* 387: 83-90).

Aproximadamente 84-88 días después del nacimiento en ratones SODG93A, y aproximadamente 110 días para ratas SODG93A, se hacen evidentes signos de enfermedad que incluyen disminución del peso corporal, anomalías de la marcha y parálisis. El tratamiento con RK35 no extendió la supervivencia en ratones o ratas SODG93A. El aumento de la masa muscular y la fuerza inducida por el tratamiento anti-GDF-8 en la fase temprana de la enfermedad no retrasaron la aparición de anomalías de la marcha y la parálisis de las extremidades en ratones y ratas SODG93A (datos no mostrados) ni se mantuvieron la ganancia de masa muscular de las patas.

Sin embargo, se observaron aumentos significativos en la masa del diafragma en ratones y ratas SODG93A tratados con RK35 en comparación con los controles SODG93A tratados con vehículo tanto en fases de enfermedad temprana como terminal. El músculo del diafragma en ratones SODG93A tratados con RK35 en la etapa terminal fue comparable al de los controles de tipo silvestre de la misma edad tanto en la masa como en la evaluación histológica. Las ratas SODG93A tratadas con RK35 también mantuvieron un aumento significativo en la masa muscular del diafragma en etapa terminal. De acuerdo con estos cambios morfológicos, el análisis electrofisiológico de diafragmas de ratas SODG93A no tratadas indica que la expresión de SOD1 mutante produce una inhibición significativa de la función muscular, y que el tratamiento con RK35 conserva eficazmente la función muscular en el diafragma.

En este estudio, se utilizó un punto final definido (falla de la prueba refleja derecha, que indica parálisis significativa de

las extremidades), como los criterios para la "etapa terminal" y eutanasia. Por lo tanto, no está claro si la mayor masa muscular mejorada del diafragma, la disminución de la atrofia y la mejora de la función electrofisiológica inducida por el tratamiento con RK35 habrían resultado en una vida útil prolongada en roedores provistos de suplementos nutricionales. Sin embargo, estos hallazgos son potencialmente importantes dado el hecho de que la disfunción respiratoria es la principal causa de muerte en pacientes con ALS (Lechtzin et al. (2002) *Amyotroph. Lateral Scler. Other Motor Neuron Disord.* 3: 5-13). Tratamientos como el RK35 diseñados para mejorar la función del diafragma pueden retrasar la necesidad de una respiración asistida mecánicamente en los pacientes con ALS.

La inhibición de GDF-8 por RK35 puede influir en la pérdida de neuronas motoras en la médula espinal lumbar en la fase temprana de la enfermedad, aunque muchos beneficios terapéuticos aparentemente se perdieron por la enfermedad en etapa terminal. Estos datos indican que las terapias que actúan directamente sobre el músculo pueden tener un beneficio en las neuronas motoras que inervan el músculo, posiblemente modulando el microambiente trófico, aunque este enfoque aparentemente no es suficiente para retrasar la enfermedad. Estas observaciones son consecuentes con los resultados de Dobrowolny et al. ((2005) *J. Cell. Biol.* 168: 193-99), en el que la expresión de una isoforma específica del músculo de IGF condujo a una pérdida más lenta de neuronas motoras en el modelo de ratón SODG93A, y con los de Kaspar et al. ((2003) *Science* 301: 839-42), donde la administración viral de IGF1 al músculo dio como resultado una pérdida reducida de neuronas motoras en la enfermedad en etapa temprana. Similar a las observaciones de Kaspar et al. ((2003), citado más arriba), los efectos beneficiosos del tratamiento sobre la supervivencia de las neuronas motoras no se mantuvieron a través de la enfermedad terminal. Por lo tanto, es probable que el soporte del factor trófico mejorado del músculo sea insuficiente para evitar la pérdida de neuronas motoras en el modelo SODG93A.

En resumen, tanto en modelos de ratón como de rata de ALS familiar, la inhibición de la miostatina da como resultado un aumento de la masa y la fuerza muscular, que se mantiene durante las primeras etapas de la enfermedad, pero se pierde en la etapa terminal. La inhibición de la miostatina disminuyó los cambios degenerativos en el músculo esquelético en la etapa temprana de la enfermedad, pero no retrasó la aparición de la parálisis ni extendió la supervivencia, como se define por insuficiencia refleja derecha, ni la inhibición de la miostatina disminuyó significativamente la pérdida de neuronas motoras. Sin embargo, se observaron diferencias tanto morfológicas como funcionales a través de la enfermedad en etapa tardía en el músculo del diafragma de los animales tratados con anticuerpo anti-miostatina, en comparación con los controles no tratados. En general, los datos proporcionados en este documento respaldan el potencial de un efecto beneficioso de la construcción muscular mediante el tratamiento con RK35, que puede contribuir a una "calidad de vida del paciente" mejorada al principio del proceso de la enfermedad. Dado que los anticuerpos anti-GDF-8 se encuentran actualmente en desarrollo clínico, el uso de tales reactivos clínicos en ALS para el mantenimiento de la masa muscular del miembro y el diafragma garantiza una investigación adicional como un componente de un enfoque múltiple para el tratamiento de la ALS. La combinación de una terapia anti-GDF-8 con medicamentos existentes como el riluzol antagonista de glutamato o agentes más nuevos que ingresan al desarrollo clínico podría no solo mejorar el nivel de eficacia al ayudar a mantener la masa muscular sino también tener un impacto significativo en la calidad de vida general del paciente.

#### 40 **Ejemplo 5**

Mapeo de epítomos para RK35

Para mapear los epítomos de anticuerpos exactos para GDF-8, se sintetizaron 48 péptidos solapantes de 13 residuos que representan la secuencia completa de GDF-8 maduro expuesto en la SEQ ID NO: 1 directamente en papel de celulosa usando la técnica de síntesis puntual (por ejemplo, Molina et al. (1996) *Peptide Res.* 9: 151-55, Frank et al. (1992) *Tetrahedron* 48: 9217-32). La superposición de los péptidos fue de 11 aminoácidos. En este arreglo, los residuos de cisteína se reemplazaron por serina para reducir las complicaciones químicas causadas por las cisteínas. Se adquirieron membranas de celulosa modificadas con polietilenglicol y aminoácidos protegidos con Fmoc a través de Abimed (Lagenfeld, Alemania). El arreglo se definió en la membrana acoplado un espaciador de alanina  $\beta$ , y se sintetizaron los péptidos usando química de acoplamiento estándar con DIC (diisopropilcarbodiimida)/HOBt (hidroxibenzotriazol) como se describió previamente (Molina et al., citado más arriba; Frank et al., citado más arriba).

Los aminoácidos activados se detectaron usando un robot Abimed ASP 222. Las etapas de lavado y desprotección se realizaron manualmente, y los péptidos se acetilaron en el extremo terminal N después del ciclo final de síntesis. Después de la síntesis del péptido, la membrana se lavó en metanol durante 10 minutos y en bloqueador (TBST (solución salina regulada con Tris con Tween<sup>MR</sup> 20 al 0,1% (v/v) y caseína al 1% (p/v) durante 10 minutos. La membrana se incubó luego con 2,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de un anticuerpo anti-GDF-8 en bloqueador durante 1 hora con agitación suave. Después de lavar en bloqueador 3 veces durante 10 minutos, la membrana se incubó con anticuerpo secundario marcado con HRP (0,25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en bloqueador) durante 30 minutos. La membrana se lavó luego tres veces durante 10 minutos cada vez con bloqueador y 2 veces durante 10 minutos cada vez con TBST. El anticuerpo unido se visualizó usando el reactivo SuperSignal<sup>MR</sup> West (Pierce) y una cámara digital (Alphananotech Fluoromager). Como se muestra en la Figura 7, el epítomo RK35 se mapea hasta una región de GDF-8 entre los aminoácidos 30-40 y 84-97, que supuestamente interactúa con el receptor de GDF-8 Tipo II según lo predicho por la secuencia de receptor de GDF-8 en comparación con receptores homólogos de la familia de TGF- $\beta$  con dominios caracterizados.

**Ejemplo 6**

Caracterización del anticuerpo RK35

5 Los genes de cadena pesada variable (VH) y de cadena ligera variable (VL) que codifican RK35 se clonaron a partir de células de hibridoma que producen el anticuerpo, y se determinaron las secuencias de aminoácidos. Los datos de secuencia para el anticuerpo RK35 se usaron para identificar la secuencia germinal más cercana para la cadena pesada y ligera. En la Figura 8 se muestra una comparación de las regiones variables ligera y pesada de RK35 con las secuencias de la línea germinal humana más cercanas. Se pueden realizar mutaciones apropiadas usando técnicas estándar de mutagénesis dirigida al sitio con los cebadores mutagénicos apropiados. La mutación del anticuerpo se confirma mediante análisis de secuencia. Ejemplos de secuencias de aminoácidos para RK35 humanizado se exponen en las SEQ ID NOs: 7 (VH) y 9 (VL), ambas pueden codificarse mediante una secuencia de ácido nucleico determinada fácilmente por un experto en la técnica, por ejemplo, las secuencias de ácido nucleico expuestas como SEQ ID NO: 6 (VH) y 8 (VL). Un experto en la técnica reconocerá que todos y/o cada uno los aminoácidos en el marco del anticuerpo humanizado se pueden mutar de vuelta al aminoácido murino original, por ejemplo, para mantener la conformación del fragmento de unión al antígeno. Los ejemplos no limitantes de la SEQ ID NO: 7 (VH) y la SEQ ID NO: 9 (VL) con algunas retrorrotaciones que pueden ayudar a mantener la afinidad del anticuerpo por GDF-8 se exponen como la SEQ ID NO: 26 y la SEQ ID NO: 27, respectivamente.

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

**Ejemplo 7**

Tratamiento de los trastornos musculares

30 Los inhibidores de GDF-8, es decir, antagonistas de GDF-8, tales como, por ejemplo, anticuerpos inhibidores, son útiles para el tratamiento de trastornos metabólicos asociados con GDF-8 tales como diabetes tipo 2, tolerancia alterada a la glucosa, síndrome metabólico (por ejemplo, síndrome X), resistencia a la insulina (por ejemplo, inducida por un trauma tal como quemaduras o desequilibrio de nitrógeno) y trastornos del tejido adiposo (por ejemplo, obesidad). Los inhibidores de GDF-8 también son útiles para el tratamiento de trastornos óseos y musculares asociados con GDF-8, tal como ALS, distrofia muscular y osteoartritis. Los anticuerpos anti-GDF-8 y fragmentos de anticuerpos de la invención pueden usarse para tratar un sujeto, por ejemplo, un sujeto humano, preferiblemente un sujeto que padece ALS, al inicio de la enfermedad, o un sujeto que tiene una enfermedad metabólica o ósea/muscular establecida. Los anticuerpos inhibidores contra GDF-8 también pueden usarse para prevenir y/o reducir la gravedad y/o los síntomas de la enfermedad. Se anticipa que los anticuerpos anti-GDF-8 y los fragmentos de anticuerpos se administran, por ejemplo, subcutáneamente, tan frecuentemente como una vez al día y tan poco frecuentemente como una vez al mes. La duración del tratamiento varía desde aproximadamente un mes (o menos) hasta varios años.

45 Para probar la eficacia clínica de anti-GDF-8 en humanos, los sujetos que padecen o están en riesgo de ALS se identifican y dividen en grupos de tratamiento aleatorios. Los grupos de tratamiento incluyen un grupo placebo y de uno a tres o más grupos que reciben anticuerpos (a diferentes dosis cuando hay dos o más grupos). Los individuos son controlados prospectivamente durante, por ejemplo, un mes a tres años para evaluar los cambios en el peso, la masa muscular y la fuerza de agarre. Se anticipa que las personas que reciban tratamiento exhibirán una mejoría.

50 Un antagonista de GDF-8, preferiblemente en forma de un anticuerpo o anticuerpos, se administra como el único compuesto activo o en combinación con otro compuesto o composición. Cuando se administra como el único compuesto activo o en combinación con otro compuesto o composición, la dosificación es preferiblemente de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg, dependiendo de la gravedad de los síntomas y/o la progresión de la enfermedad. La dosis efectiva apropiada puede ser seleccionada por un médico tratante de la siguiente lista no limitativa de intervalos: 1 µg/kg a 100 mg/kg, 1 µg/kg a 50 mg/kg, 1 µg/kg a 20 mg/kg, 1 µg/kg a 10 mg/kg, 1 µg/kg a 1 mg/kg, 10 µg/kg a 1 mg/kg, 10 µg/kg a 100 µg/kg, 100 µg a 1 mg/kg y 500 µg/kg a 1 mg/kg. Los ejemplos de regímenes de tratamiento no limitantes y los resultados potenciales se resumen en la Tabla 5.

Tabla 5: Ejemplos de casos clínicos potenciales

Estado previo al tratamiento	Régimen de tratamiento	Resultado potencial
Sin signos clínicos, antecedentes familiares de ALS	0,01-1 mg/kg cada 4 semanas por 48 semanas	Prevención de ALS o retraso del inicio
Signos clínicos leves de ALS	0,01-100 mg/kg semanalmente	Mayor fuerza de agarre, aumento

Estado previo al tratamiento	Régimen de tratamiento	Resultado potencial
	por 4 o más semanas	de peso y masa muscular

(continuación)

Estado previo al tratamiento	Régimen de tratamiento	Resultado potencial
Etapa avanzada de ALS caracterizada por pérdida muscular severa, pérdida de peso y pérdida de fuerza, etc.	0,01-100 mg/kg dos veces a la semana por 6 o más semanas	Mejora de los signos clínicos, reducción de la gravedad de los síntomas y/o aumento de la relación masa muscular/grasa corporal

Listado de secuencias

5

<110> Wyeth The Trustees of the University of Pennsylvania

<120> Anticuerpos antagonistas contra GDF-8 y su uso en el tratamiento de ALS y otros trastornos asociados a GDF-8

10

<130> 01997.040600

<150> US 60/709.704

<151> 2005-08-19

15

<160> 31

<170> PatentIn versión 3.3

20

<210> 1

<211> 109

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25

<400> 1

```

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

30

<210> 2

<211> 348

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 2

ES 2 659 114 T3

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

5 <210> 3  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 3

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

10 <210> 4  
 <211> 321  
 <212> ADN  
 15 <213> Mus musculus  
 <400> 4

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

20 <210> 5

ES 2 659 114 T3

<211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

5 <400> 5

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

10 <210> 6  
 <211> 348  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

15 <220>  
 <223> Secuencia de ácido nucleico que codifica la región variable de cadena pesada de RK35 humanizado (traducida nuevamente a partir de la SEQ ID NO: 7)

<400> 6

gaggtccaac tattagaatc gggaggcggc ctggttcagc caggagggag tctcaggctt 60  
 agttgctgctg cgctcgggatt caccttttca agttacgcaa tgtcatgggt tcgtcaggca 120  
 ccggggaaag gcttagagtg ggtgtcaact attagctctg gcggtagcta tacgtcgtat 180  
 cctgactctg tgaagggacg atttacaata agccgggaca attctaaaaa cactttgtac 240  
 ctacagatga attccttgag agccgaagat accgccgtct actattgtgc gaagcaagat 300  
 tacgctatga actattgggg tcaagggaca atggtaacgg taccctcc 348

20

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

25

<220>  
 <223> Región variable de cadena pesada de RK35 humanizado

30 <400> 7

ES 2 659 114 T3

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

- 5 <210> 8  
 <211> 321  
 <212> ADN  
 <213> Artificial
- 10 <220>  
 <223> Secuencia de ácido nucleico que codifica la región variable de cadena ligera de RK35 humanizado (traducida nuevamente a partir de la SEQ ID NO: 9)
- 15 <400> 8
- |            |            |            |            |            |            |     |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| gacattcaaa | tgacccaaag | cccttcttcc | ttaagcgcac | cagtaggtga | ccgagttaca | 60  |
| ataacgtgta | aagcgagcca | agatgtgagt | actgcagtag | cgtggtatca | gcaaaagcca | 120 |
| gggaaggctc | cgaaactatt | gatttactcc | gcctcttaca | gatatacggg | cgttcctgat | 180 |
| aggtttagtg | gaagtgggtc | gggtacggac | tttaccctga | ctatatcgtc | acttcagcca | 240 |
| gaggattttg | ctacctacta | ttccaacag  | cattattcaa | caccgtggac | attcggccag | 300 |
| ggaactaagg | tcgaaataaa | a          |            |            |            | 321 |
- 20 <210> 9  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Artificial
- 25 <220>  
 <223> Región variable de cadena ligera de RK35 humanizado
- <400> 9

ES 2 659 114 T3

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

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

10 <400> 10

Ser Tyr Ala Met Ser  
 1 5

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

20 <400> 11

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

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

<400> 12

Gln Asp Tyr Ala Met Asn Tyr  
 1 5

30

<210> 13  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

35 <400> 13

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

40

ES 2 659 114 T3

5 <210> 14  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 14

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr  
 1 5

10 <210> 15  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 15 <400> 15

Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro  
 1 5

20 <210> 16  
 <211> 321  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 25 <400> 16

cgaaccgtag cggcaccgtc agtattcata ttccctccat cggacgagca attgaaaagt 60  
 gggacagctt cggtcgtgtg tctcttgaat aacttttacc ccagagaagc taagggtccag 120  
 tggaaagtgg acaatgcggt acagagcgga aattctcaag aatccgttac tgaacaggat 180  
 agtaaggatt ctacgtattc acttagcagt actctgacct tatcaaaggc agattatgaa 240  
 aaacacaagg tatacgcttg cgaggtgacg catcaaggct tatccagccc agttacaaaa 300  
 tcttttaaca ggggtgagtg t 321

30 <210> 17  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 17

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

ES 2 659 114 T3

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 100 105

5 <210> 18  
 <211> 990  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

10 <400> 18

```

gcctccacaa aaggaccatc tgtttttccc ttggcgccat caagtaaadc tacttccgga      60
ggatccgctg cgcttggctg cctcgtgaaa gactattttcc cagaacctgt cacagtctcg      120
tggaatagtg gtgctttaac ctcgggcgta catacttttc ctgctgtact tcaatcaagc      180
ggactgtact cattatcgtc tgtagtcacg gtccccgagtt cttcactcgg aacacagact      240
tatatatgca acgttaatca taagcctagc aacaccaagg ttgacaaaaa ggtggaacca      300
aaatcgtgcg ataagacgca cacatgtcca ccctgtcctg caccagaagc tctgggcgcg      360
ccatcggttt tcttgttccc acccaaacct aaggacacgt taatgataag tcgaacgcca      420
gaggtgacat gtgtttgtagt ggatgtgagc cacgaagatc cggaagtaaa attcaattgg      480
tatgtagatg gtgttgaagt ccataacgca aaaactaagc cgaggggaaga gcagtacaac      540
tctacttata gggtagtctc cgtactaact gtcttgcacc aagattggct aatggggaag      600
gaatataaat gtaaggtttc aaataaggca ctaccagccc cgatagagaa gacaataagc      660
aaagcgaagg ggcaaccaag agagcccaa gtgtacacct tgcctccgag cagagaggaa      720
atgacaaaaa atcaagtatc ccttacgtgt ctggtaaagg gattttatcc aagtacata      780
gcagtggagt gggagagtaa cggccagcca gaaaacaatt acaaaaccac tccccggtt      840
ttagatagcg atgggagttt cttttgtac tcaaagttga ccgttgacaa gtcacgatgg      900
cagcaaggta atgtatttag ttgttctggt atgcatgagg ccttacataa tcactacacg      960
cagaaatctc tctccttaag ccccgggaaa      990
    
```

15 <210> 19  
 <211> 330  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 19

```

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

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

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

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

20

ES 2 659 114 T3

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Ala Leu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu  
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
325 330

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

ES 2 659 114 T3

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

5 <210> 21  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 21

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

10 <210> 22  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 15 <400> 22

Gln Asp Tyr Ala Met Asn Tyr  
 1 5

20 <210> 23  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 25 <400> 23

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

30 <210> 24  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 35 <400> 24

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr  
 1 5

40 <210> 25  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 25

Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro  
 1 5

45 <210> 26  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

50 <220>  
 <223> Región variable de cadena pesada de RK35 humanizado con retromutaciones

55 <400> 26

ES 2 659 114 T3

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

<210> 27

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Región variable de cadena ligera de RK35 humanizado con retromutaciones.

<400> 27

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

<210> 28

<211> 405

<212> ADN

ES 2 659 114 T3

<213> Mus musculus

<400> 28

```

atgaactttg tgctcagctt gattttcctt gccctcattt taaaagggtg ccagtgtgaa      60
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggctta gtgaagcctg gagggtccct gaaactctcc      120
tgtgcagcct ctggattcac tttcagtagc tatgccatgt cttgggttcg ccagactccg      180
gagaagagggc tggagtgggt cgcaaccatt agtagtggtg gtagttacac ctctatcca      240
gacagtgtga agggctgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg      300
caaatgagca gtctgaggtc tgaggacacg gccatgtatt actgtgcaag acaagactat      360
gctatgaact actgggggtca aggaacctca gtcaccgtct cctca                      405
    
```

5

<210> 29

<211> 135

<212> PRT

10

<213> Mus musculus

<400> 29

```

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

15

<210> 30

<211> 381

<212> ADN

20

<213> Mus musculus

<400> 30

ES 2 659 114 T3

atggagtcac agattcaggt ctttgtattc gtgtttctct ggttgctctgg tgttgacgga 60  
gacattgaga tgaccagtc tcacaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc 120  
atcacctgca aggccagtca ggatgtgagt actgctgtag cctggtatca acagaaacca 180  
ggacaatctc ctaaactact gctttactcg gcatcctacc ggtacactgg agtcctgat 240  
cggttcactg gcagtgatc tgggacggat ttcactttca ccatcagcag tgtgcaggct 300  
gaagacctgg cagtttatta ctgtcagcaa cattatagta ctccgtggac gttcggtgga 360  
ggcaccaagc tggaaatcaa a 381

5 <210> 31  
<211> 127  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
<400> 31

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

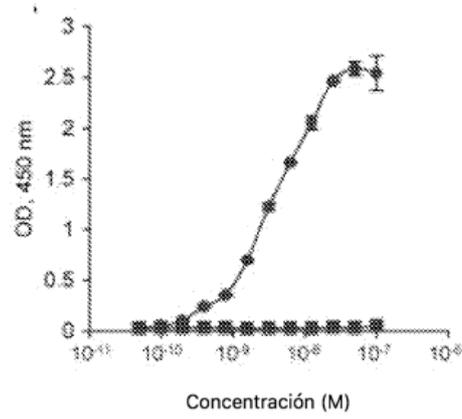
10

**REIVINDICACIONES**

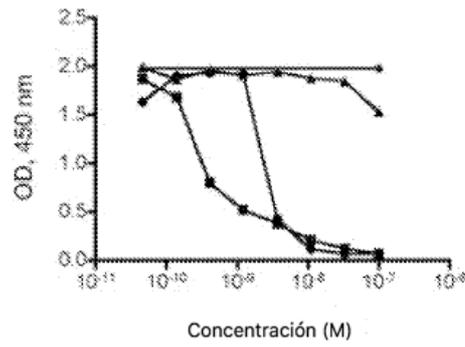
1. Un anticuerpo humanizado que se une específicamente y antagoniza GDF-8, que comprende:
- una región pesada variable (VH) de anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 o que difiere en no más de 2 residuos de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, y
- 5 una región ligera variable (VL) de anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9 o que difiere en no más de 2 residuos de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9;
- en la que
- la primera CDR de una región VH (H1) tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10,
- la segunda CDR de una región VH (H2) tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11,
- 10 la tercera CDR de una región VH (H3) tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12,
- la primera CDR de una región VL (L1) tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13,
- la segunda CDR de una región VL (L2) tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14,
- la tercera CDR de una región VL (L3) tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15,
- o en la que
- 15 la primera CDR de una región VH (H1) tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20,
- la segunda CDR de una región VH (H2) tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21,
- la tercera CDR de una región VH (H3) tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22,
- la primera CDR de una región VL (L1) tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23,
- la segunda CDR de una región VL (L2) tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24,
- 20 la tercera CDR de una región VL (L3) tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25.
2. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 1, que comprende:
- una región pesada variable (VH) de anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 o que difiere en no más de 1 residuo de aminoácido de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7; y
- 25 una región ligera variable (VL) de anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9 o que difiere en no más de 1 residuo de aminoácido de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9.
3. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicha región VH comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, y dicha región VL comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9.
- 30 4. El anticuerpo humanizado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además una región constante de cadena pesada de un subtipo de inmunoglobulina seleccionado del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE e IgM.
5. El anticuerpo humanizado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende además una región constante de cadena pesada de IgG1 humana.
- 35 6. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 4 o la reivindicación 5, en el que la región constante se altera para modificar las propiedades del anticuerpo.
7. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 6, en el que la región constante alterada está mutada.

8. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 6 o la reivindicación 7, en el que la región constante se altera para aumentar o disminuir la unión al receptor Fc.
9. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la región constante comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19.
- 5 10. El anticuerpo de la reivindicación 7, en el que la región constante de IgG1 humana comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19 mutada en uno o más de los residuos 117 y 120 de la misma.
11. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende además una región constante de cadena ligera de anticuerpo seleccionada del grupo que consiste en kappa y lambda.
12. Un polinucleótido que codifica el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.
- 10 13. El polinucleótido de la reivindicación 12 operativamente enlazado a una secuencia de control de la expresión.
14. Un vector que comprende el polinucleótido de la reivindicación 12 o la reivindicación 13 como un antagonista de GDF-8.
15. Una célula huésped que comprende el vector de la reivindicación 14 o que comprende el polinucleótido de la reivindicación 12 o la reivindicación 13 como un antagonista de GDF-8.
- 15 16. Un método para producir un anticuerpo que se une específicamente a GDF-8, que comprende la etapa de cultivar la célula huésped de la reivindicación 15 y recuperar el anticuerpo producido de ese modo.
17. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 producido por el método de la reivindicación 16.
18. Una composición que comprende el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 y 17, y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 20 19. La composición de la reivindicación 18 para uso en el tratamiento de un trastorno de un sujeto mamífero, en el que trastorno se selecciona del grupo que consiste en: un trastorno muscular, un trastorno neuromuscular, un trastorno degenerativo óseo, un trastorno adiposo, un trastorno óseo metabólico, un trastorno óseo inducido, un trastorno del metabolismo de la glucosa y un trastorno relacionado con insulina.
- 25 20. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 19, en la que dicho trastorno se selecciona adicionalmente del grupo de trastornos que consisten en: distrofia muscular, distrofia muscular de Duchenne, atrofia muscular, atrofia de órganos, fragilidad, síndrome del túnel carpiano, enfermedad pulmonar obstructiva congestiva, esclerosis lateral amiotrófica (ALS), sarcopenia, caquexia, síndrome de pérdida muscular, osteoporosis, fractura relacionada con la osteoporosis, osteopenia, osteoartritis, baja masa ósea, tolerancia alterada a la glucosa, resistencia a la insulina, diabetes tipo 2, obesidad y síndrome metabólico.
- 30 21. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 20, en la que dicho trastorno es distrofia muscular de Duchenne.
22. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 20, en la que dicho trastorno es ALS.
23. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 20, en la que dicho trastorno es caquexia o sarcopenia.
- 35 24. La composición de la reivindicación 18 para uso en el tratamiento de un trastorno de pérdida muscular en un sujeto mamífero.
25. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 24, en la que el trastorno de pérdida muscular es un síndrome de pérdida muscular o pérdida muscular inducida por VIH.
26. La composición para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 19 a 25, en la que dicho sujeto mamífero es humano.
- 40 27. Uso del anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, *in vitro*, en un método de diagnóstico.
28. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para uso *in vivo* en un método de diagnóstico.

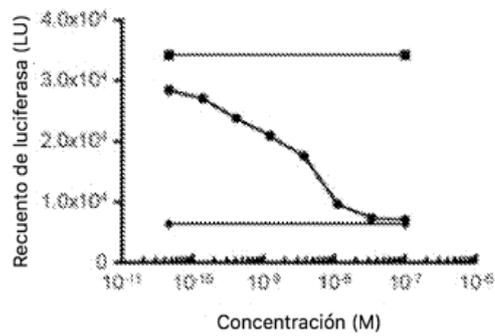
**FIG. 1A**



**FIG. 1B**



**FIG. 1C**



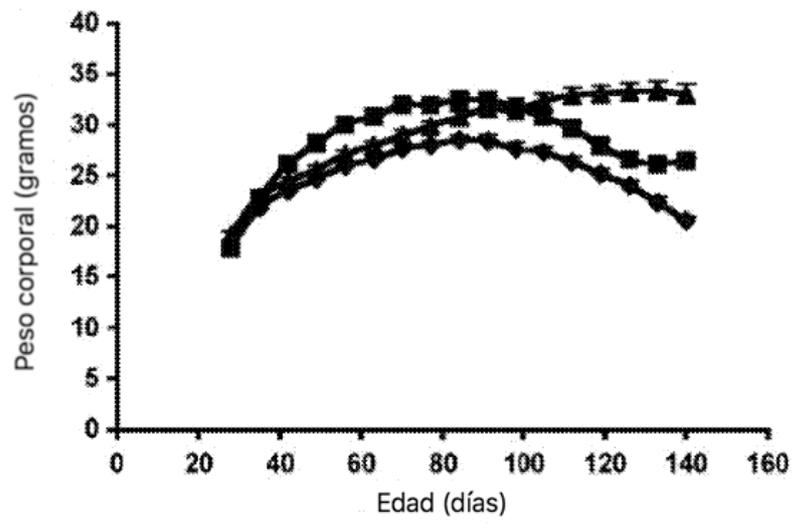


FIG. 2A

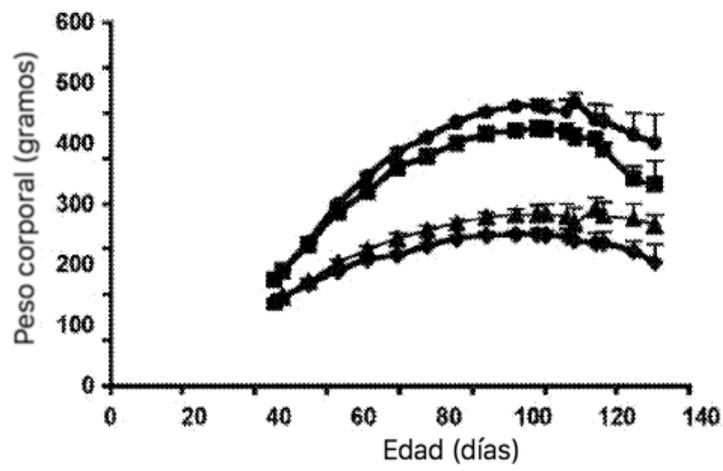


FIG. 2B

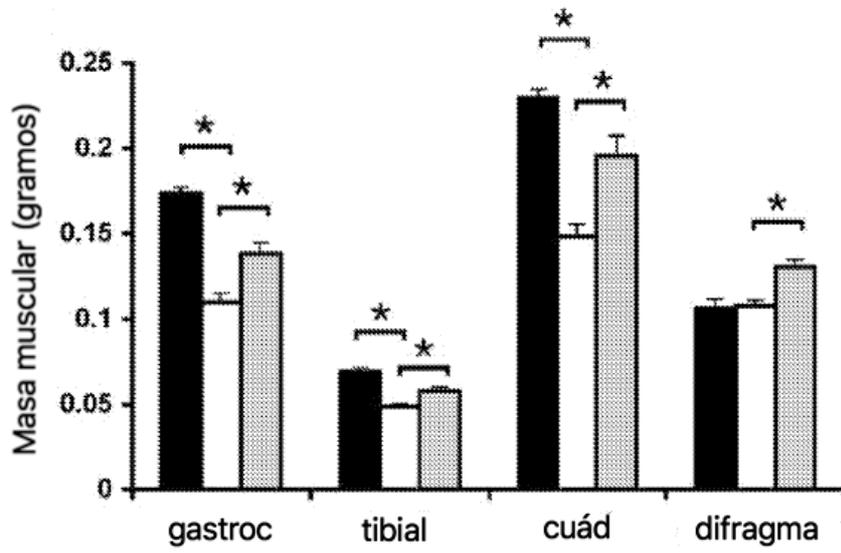


FIG. 2C

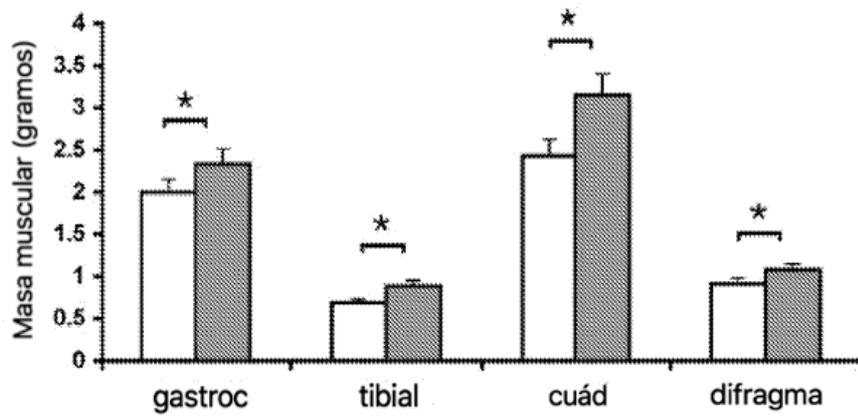


FIG. 2D

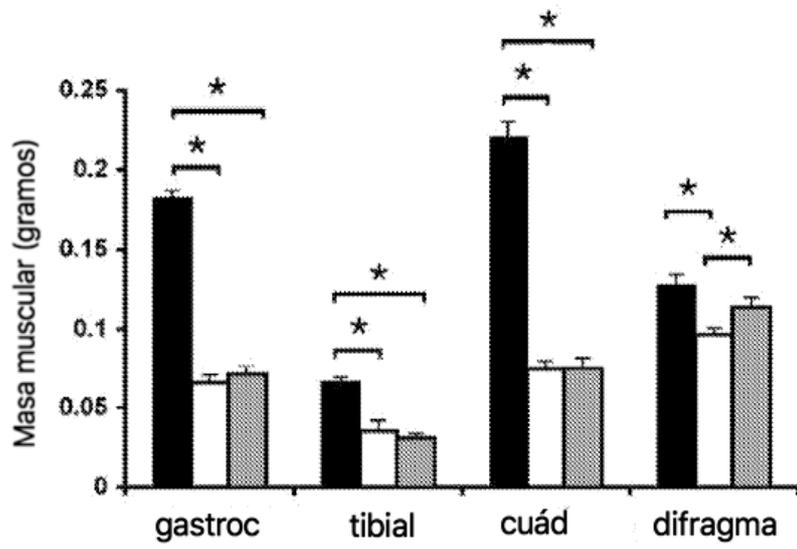


FIG. 2E

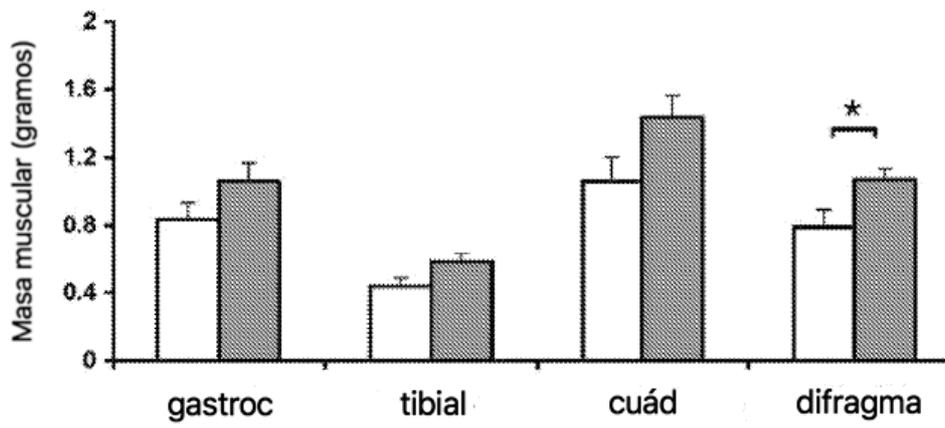


FIG. 2F

FIG. 3A

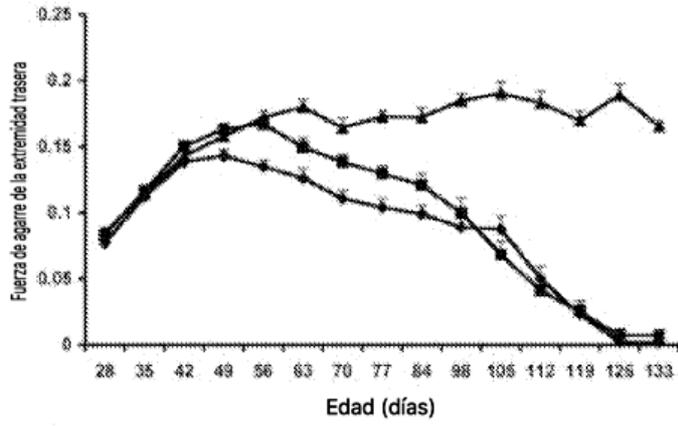


FIG. 3B

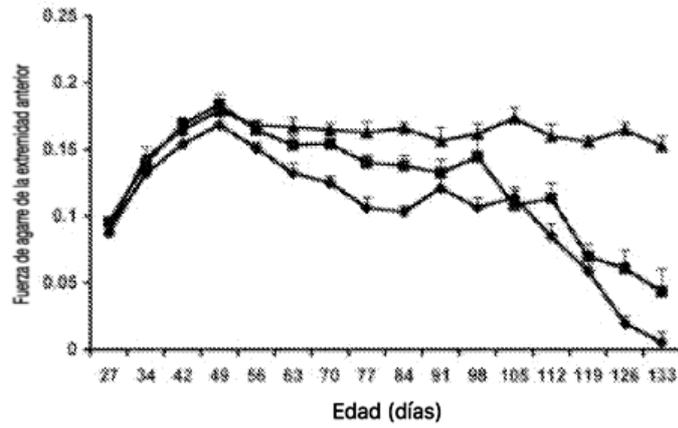
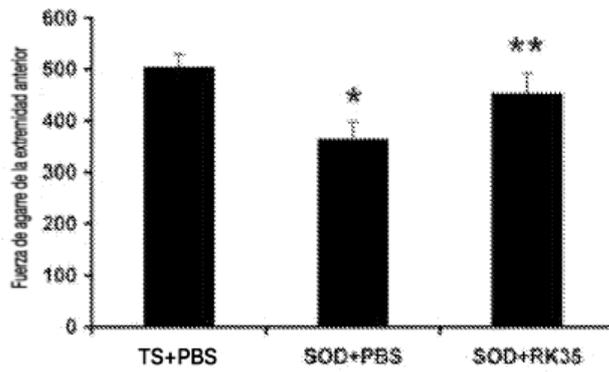


FIG. 3C



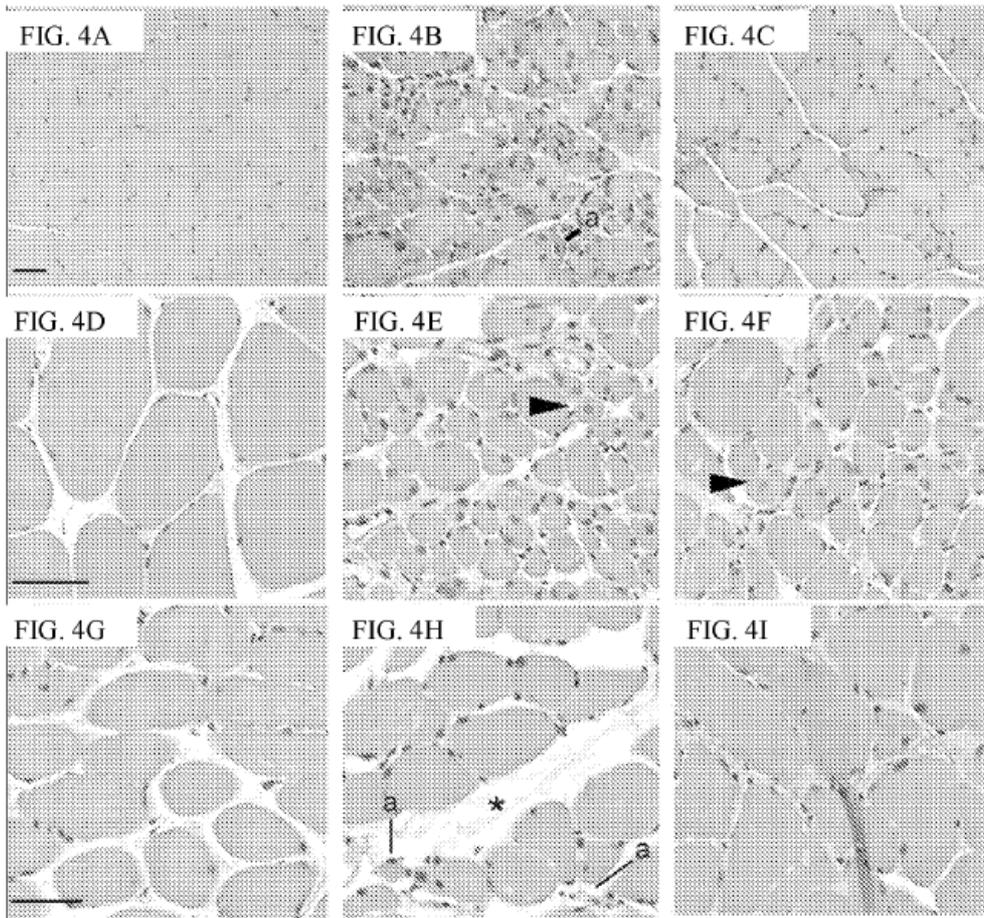


FIG. 4J

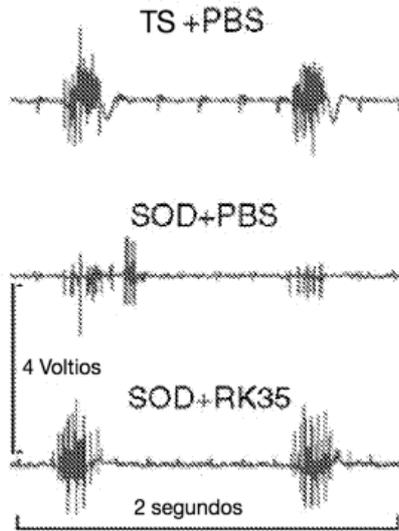


FIG. 4K

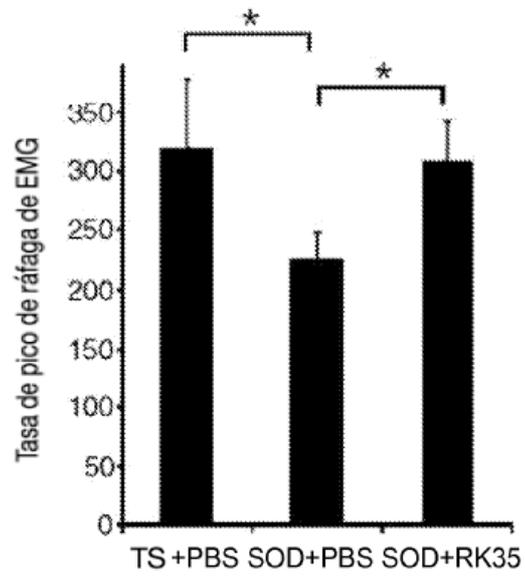


FIG. 5A

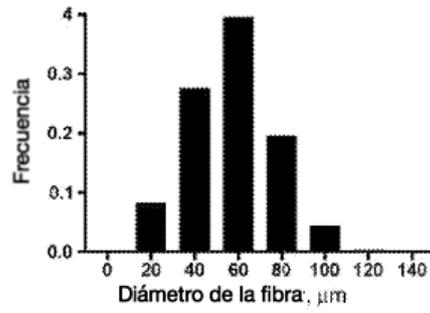


FIG. 5B

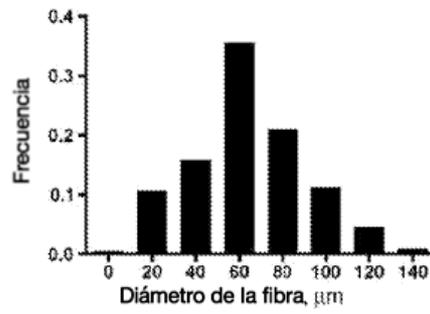


FIG. 5C

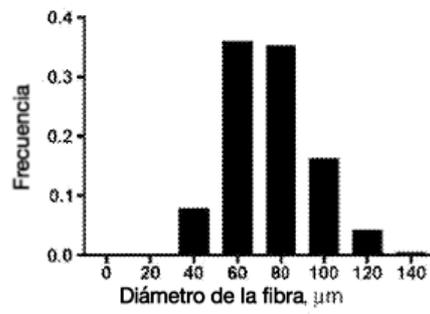


FIG. 5D

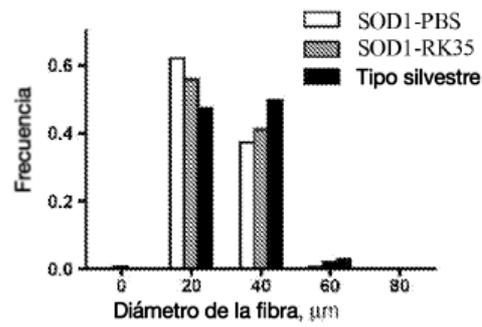


FIG. 6A

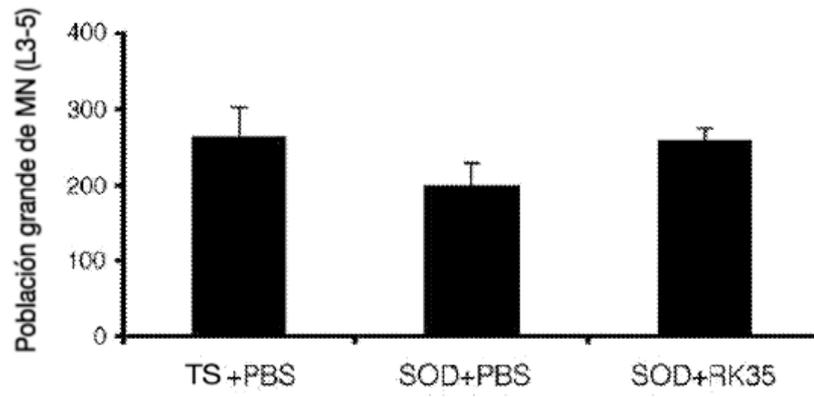


FIG. 6B

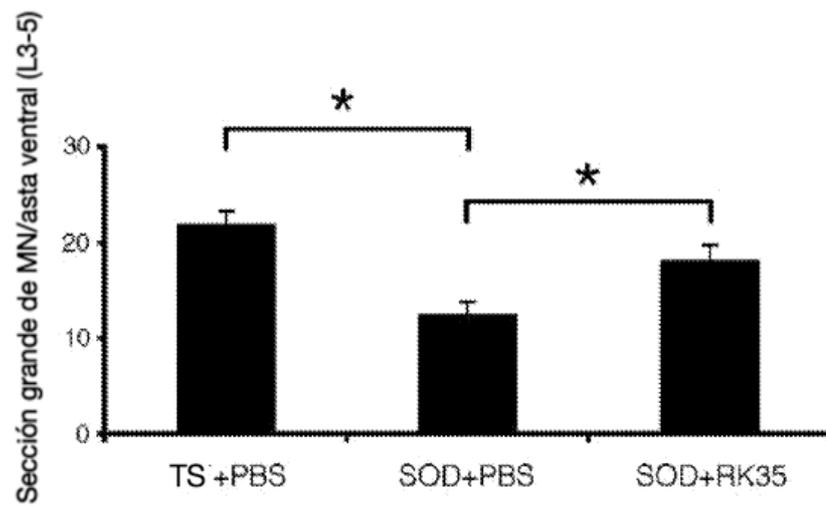


FIG. 6C

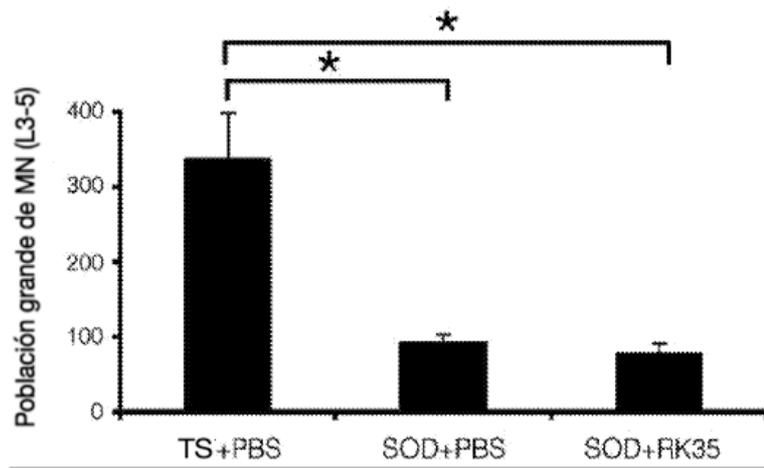
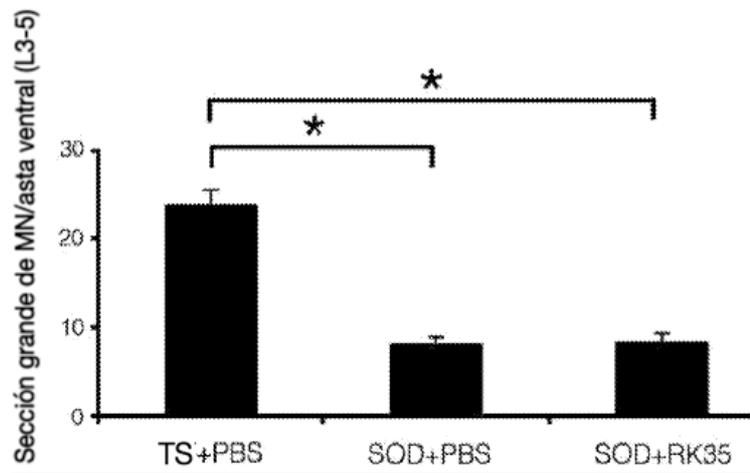
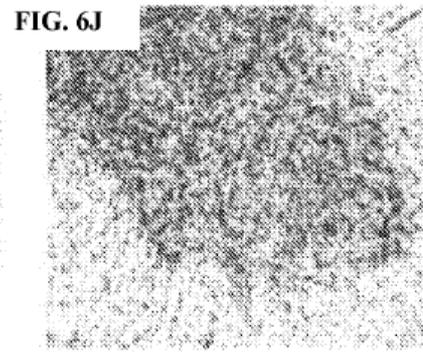
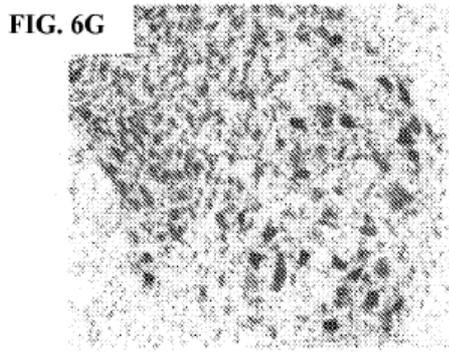
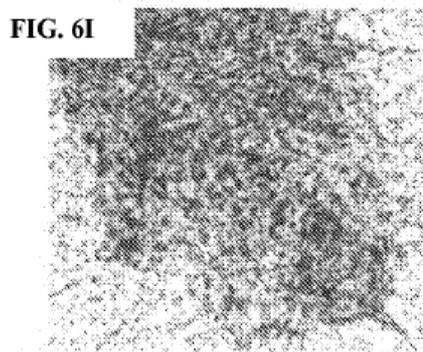
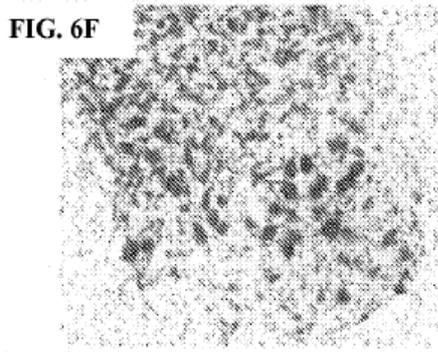
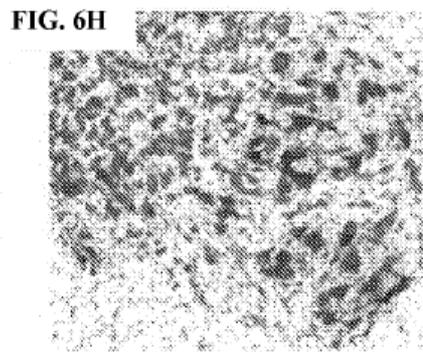
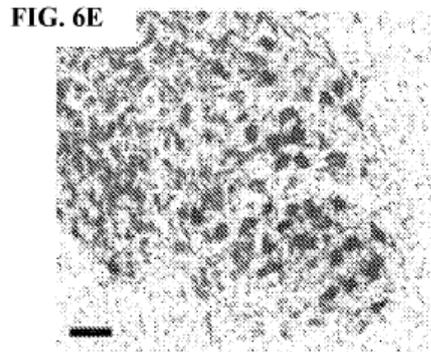
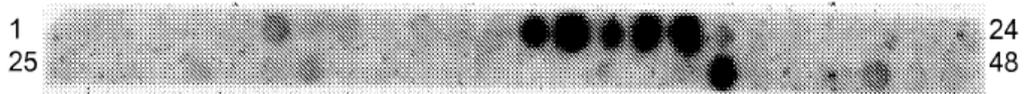


FIG. 6D







DFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYKANYCSGECEF  
VFLQKY  
PHTHLVHQANPRGSAGPCCTPTKMSPINMLYFNGKEQIIYGKIPAMVVDR  
CGCS

FIG. 7

**Alineación de la región variable de cadena ligera de RK35 con DPK9**

Identities = 65/95 (68%)

```

      *      * * * * *      *      * *      *
MRK35 VL 1  DIEMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVSTAVAWYQQKPGQSPKLLLYSASRYRTVGVPD 60
HuRK35 VL 1  DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSTAVAWYQQKPKAPKLLIYSASRYRTVGVPS 60
DPK-9      1  DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPKAPKLLIYAASSLQSGVPS 60

      *      *      * * * *      *      *
MRK35 VL 61  RFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQOHYSTEPWTFGGGTKLEIK 107
HuRK35 VL 61  RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQOHYSTEPWTFGGGTKVEIK 107
DPK-9      61  RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQOQSYSTE 95
    
```

20 sustituciones de aminoácidos

Retromutaciones potenciales : P80A

**Alineación de la región variable de cadena pesada de RK35 con DP-47**

Identities = 79/98 (80%)

```

      *      *      *      * * * *      *
mRK35 VH 1  EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQTPEKRLEWVATISSGGSYTSY 60
HuRK35 VH 1  EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISSGGSYTSY 60
DP -47      1  EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSALSGGGSTYY 60

      *      *      *      *      *      *
RK35 VH 61  PDSVKGRFRTISRDNAKNTLYLQMSSLRSEDTAMYYCARQDYAMNYWGQGTSVTVSS 116
HuRK35 VH 61  PDSVKGRFRTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQDYAMNYWGQGTMVTVSS 116
DP-47      61  ADSVKGRFRTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK 98
    
```

13 sustituciones de aminoácidos en las regiones marco

Retromutaciones potenciales : L5V; G42E, G44R; S49A; V93M

**FIG. 8**