

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 663 946**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/22** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61P 21/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.11.2012 PCT/US2012/064911**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.05.2013 WO13074557**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.11.2012 E 12791657 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.01.2018 EP 2780368**

54 Título: **Composiciones y métodos para aumentar la masa y la fuerza muscular antagonizando específicamente GDF8 y/o Activina A**

30 Prioridad:

**14.11.2011 US 201161559175 P**

**06.03.2012 US 201261607024 P**

**19.06.2012 US 201261661451 P**

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

**17.04.2018**

73 Titular/es:

**REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.**

**(100.0%)**

**777 Old Saw Mill River Road**

**Tarrytown, NY 10591, US**

72 Inventor/es:

**STITT, TREVOR y**

**LATRES, ESTHER**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

ES 2 663 946 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

Composiciones y métodos para aumentar la masa y la fuerza muscular antagonizando específicamente GDF8 y/o Activina A.

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a composiciones y métodos para aumentar la masa muscular y la fuerza muscular en un sujeto. Más específicamente, la invención se refiere a composiciones de anticuerpos que se unen específicamente a GDF8 y Activina A y a dichas composiciones para su uso en el tratamiento de enfermedades y trastornos caracterizados por una disminución de la masa o la fuerza muscular.

Antecedentes

- 10 El factor 8 de crecimiento y diferenciación (GDF8, también conocido como miostatina), es un ligando secretado que pertenece a la superfamilia de factores de crecimiento del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). GDF8 juega un papel central en el desarrollo y mantenimiento del músculo esquelético, actuando como un regulador negativo de la masa muscular. Aunque el fenotipo de ratón con miostatina anulada demuestra la importancia de GDF8 en el control del tamaño muscular durante el desarrollo, la hipertrofia muscular también se puede suscitar en el músculo adulto a través de la inhibición de GDF8 con anticuerpos neutralizantes, receptores señuelo u otros antagonistas. Se ha informado que la administración de anticuerpos neutralizantes de GDF8 da como resultado un aumento de la masa muscular de entre 10 y 30%. El aumento de la masa muscular que se observa se debe a un mayor diámetro de las miofibrillas y no a una hiperplasia de las miofibrillas (número de miofibrillas). En diversos estudios realizados también se informa sobre aumentos en la fuerza o el rendimiento muscular proporcionales al aumento del tamaño, incluida la fuerza de contracción y tetánica. El uso de una versión resistente a la escisión del propéptido GDF8 también conduce a un aumento del tamaño muscular.

Se han usado otros antagonistas de GDF8 en ratones adultos con efectos significativos sobre la masa muscular esquelética. Estos incluyen la parte extracelular del receptor de GDF8 de tipo II, ActRIIB, estabilizada por fusión a un dominio Fc de IgG ("ActRIIB-Fc"). La molécula clínica "ACE-031" es un ejemplo de una molécula de ActRIIB-Fc.

- 25 Aunque se ha demostrado que la molécula ActRIIB-Fc aumenta la masa muscular en animales de experimentación, en ensayos clínicos realizados con seres humanos, se demostró que esta molécula producía diversos efectos secundarios adversos. Por ejemplo, en un estudio de aumento de dosis en Fase Ib, se demostró que la administración de ACE-031 a mujeres posmenopáusicas producía aumentos no deseados en la hemoglobina y disminuía los niveles de FSH. Además, un estudio en Fase II de ACE-031 en pacientes pediátricos con distrofia muscular se suspendió debido a efectos adversos que incluían hemorragia nasal y sangrado de encías. También se observaron vasos sanguíneos dilatados en pacientes tratados con ActRIIB-Fc.

- Los experimentos han demostrado que los efectos inductores del crecimiento muscular de ActRIIB-Fc se atenúan pero no se eliminan en ratones con miostatina anulada, lo que sugiere que ActRIIB-Fc ejerce sus efectos inductores de masa muscular antagonizando otro(s) ligando(s) de ActRIIB además de GDF8. Otros ligandos que se unen a ActRIIB incluyen Activina A, Activina B, Activina AB, Inhibina A, Inhibina B, GDF3, GDF11, Nodal, BMP2, BMP4 y BMP7. El documento WO 2008/031061 A2 desvela anticuerpos anti-Activina A para el tratamiento de caquexia. El documento WO 2007/047112 desvela anticuerpos anti-GDF para su uso para aumentar la masa muscular. El documento WO2004037861 desvela anticuerpos que son capaces de unirse tanto a GDF-8 como a BMP-11 y sugiere administrar a un sujeto un anticuerpo capaz de inhibir BMP-11 o activina, solo o en combinación con otros inhibidores de TGF, tales como anticuerpos neutralizantes contra GDF-8.

Breve resumen de la invención

- Los autores de la presente invención plantearon la hipótesis de que los efectos potenciados del crecimiento muscular de la molécula ActRIIB-Fc, así como sus efectos secundarios no deseados, se debían a la unión de esta molécula con otros ligandos, además de GDF8. Por tanto, los inventores trataron de determinar si era posible antagonizar específicamente solo determinados ligandos de ActRIIB pero no otros, para producir los efectos del crecimiento muscular potenciado de ActRIIB-Fc mientras que al mismo tiempo se impedían los efectos secundarios adversos indeseados asociados a esta molécula. A través de la experimentación expuesta en los Ejemplos de la presente memoria, sorprendentemente, se descubrió que antagonizando específicamente la activina A se podía obtener un aumento significativo del crecimiento muscular. Cabe destacar que, también se determinó que los efectos terapéuticos deseados de la molécula ActRIIB-Fc (p. ej., aumento del crecimiento del músculo esquelético) podrían obtenerse sin producir efectos secundarios no deseados, antagonizando específicamente GDF8 y Activina A, pero no antagonizando otros ligandos de ActRIIB (p. ej., GDF11, BMP9, BMP10, etc.).

Por tanto, de acuerdo con un aspecto de presente invención, se proporciona una composición que comprende una proteína de unión específica de GDF8 y una proteína de unión específica de Activina A, en la que la proteína de unión específica de GDF8 es un anticuerpo anti GDF8, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que inhibe a GDF-8, y la proteína de unión específica de Activina A es un anticuerpo anti Activina A, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que inhibe a Activina A. De acuerdo con un aspecto relacionado de la invención, se proporciona una molécula de unión a antígeno que comprende un anticuerpo anti GDF8, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que inhibe a GDF-8 y un anticuerpo anti Activina A, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que inhibe a Activina A. La molécula de unión a antígeno puede ser un anticuerpo biespecífico que comprende un primer dominio variable que se une específicamente a GDF8 y un segundo dominio variable que se une específicamente a Activina A.

La presente invención proporciona métodos no terapéuticos para aumentar la masa o la fuerza muscular en un sujeto administrando al sujeto (i) una proteína de unión específica de Activina A y una proteína de unión específica de GDF8, en la que la proteína de unión específica de GDF8 es un anticuerpo anti GDF8, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que inhibe a GDF8, y en el que la proteína de unión específica de Activina A es un anticuerpo anti Activina A, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que inhibe a Activina A, o (ii) una molécula de unión a antígeno que comprende un anticuerpo específico anti GDF8, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que inhibe a GDF 8 y un anticuerpo específico anti Activina A, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que inhibe a Activina A. La presente invención también proporciona anticuerpos y composiciones, como se expone en las reivindicaciones, para su uso en métodos para tratar enfermedades o trastornos asociados a la disminución de la masa o la fuerza muscular, que incluyen, p. ej., caquexia, sarcopenia y otras afecciones relacionadas con desgaste muscular.

Otras realizaciones de la presente invención serán evidentes a partir de una revisión de la siguiente descripción detallada.

#### Descripción detallada

Antes de describir la presente invención, ha de entenderse que la presente invención no se limita a métodos y a condiciones experimentales particulares descritos, ya que dichos métodos y condiciones pueden variar. Se entenderá también que la terminología utilizada en el presente documento es con el propósito de describir solo realizaciones particulares y no se desea que sea limitante, dado que el alcance de la presente invención estará limitado únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

A menos que defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto familiarizado con la técnica a la cual pertenece la presente invención. Tal como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente", cuando se utiliza en referencia a un valor numérico particular indicado, significa que el valor puede variar desde el valor indicado en no más del 1%. Por ejemplo, tal como se usa en el presente documento, la expresión "aproximadamente 100" incluye 99 y 101, y todos los valores intermedios (p. ej., 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, etc.).

#### Proteínas de unión específicas de antígeno

La presente invención se refiere a composiciones que comprenden proteínas de unión específicas de antígeno. Más específicamente, la presente invención se refiere a una composición que comprende una proteína de unión específica de GDF8 y una proteína de unión específica de Activina A.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "proteína de unión específica de antígeno" significa una proteína que comprende al menos un dominio que se une específicamente a un antígeno particular. Los ejemplos de categorías de proteínas de unión específicas de antígeno incluyen anticuerpos, partes de unión a antígeno de los anticuerpos, péptidos que interaccionan específicamente con un antígeno particular (por ejemplo, peptidocuerpos), moléculas receptoras que interaccionan específicamente con un antígeno particular, y proteínas que comprenden una parte de unión a ligando de un receptor que se une específicamente a un antígeno particular.

En este documento, se describen proteínas de unión específicas de antígeno que se unen específicamente a GDF8, es decir, "proteínas de unión específicas de GDF8". El término "GDF8" (también denominado "factor 8 de crecimiento y diferenciación" y "miostatina") significa la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 25 (proteína madura). Las proteínas de unión específicas de GDF8 se unen específicamente a GDF8 pero no se unen a otros ligandos de ActRIIB tales como GDF3, BMP2, BMP4, BMP7, BMP9, BMP10, GDF11, Activina AB, Activina B, Activina AB, Nodal, etc.

En este documento también se describen proteínas de unión específicas de antígeno que se unen específicamente a Activina A, es decir, "proteínas de unión específicas de Activina A". Las activinas son moléculas homo y heterodiméricas que comprenden subunidades  $\beta$ A y/o  $\beta$ B. La subunidad  $\beta$ A tiene la secuencia de aminoácidos de

SEQ ID NO: 26 y la subunidad  $\beta$ B tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28. La activina A es un homodímero de dos subunidades  $\beta$ A; la activina B es un homodímero de dos subunidades  $\beta$ B; y la activina AB es un heterodímero de una subunidad  $\beta$ A y una subunidad  $\beta$ B. Una proteína de unión específica de Activina A puede ser una proteína de unión específica de antígeno que se une específicamente a la subunidad  $\beta$ A. Dado que la subunidad  $\beta$ A se encuentra en las moléculas Activina A y Activina AB, una "proteína de unión específica de Activina A" puede ser una proteína de unión específica de antígeno que se une específicamente a Activina A así como a Activina AB (en virtud de su interacción con la subunidad  $\beta$ A). Por lo tanto, una proteína de unión específica de Activina A se une específicamente a Activina A, o a Activina A y a Activina AB, pero no se une a otros ligandos de ActRIIB tales como Activina B, GDF3, GDF8, BMP2, BMP4, BMP7, BMP9, BMP10, GDF11, Nodal, etc.

En el contexto de la presente invención, moléculas tales como ActRIIB-Fc (p. ej., "ACE-031"), que comprenden la parte de unión al ligando del receptor ActRIIB, no se consideran "proteínas de unión específicas de GDF8" o "proteínas de unión específicas de Activina A", porque dichas moléculas se unen a múltiples ligandos además de a GDF8, Activina A y Activina AB.

Moléculas de unión a antígeno con dos dominios de unión específicos de antígeno diferentes

En este documento también se describen moléculas de unión a antígeno que comprenden dos dominios de unión específicos de antígeno diferentes. En particular, las moléculas de unión a antígeno comprenden un dominio de unión específico de GDF8 y un dominio de unión específico de Activina A. La expresión "dominio de unión específico de antígeno", tal como se usa en el presente documento, incluye polipéptidos que comprenden o consisten en: (i) un fragmento de unión a antígeno de una molécula de anticuerpo, (ii) un péptido que interacciona específicamente con un antígeno particular (p. ej., un peptidocuerpo), y/o (iii) una parte de unión a ligando de un receptor que se une específicamente a un antígeno particular. La presente invención incluye anticuerpos biespecíficos con un brazo que comprende un primer par de región variable de cadena pesada/región variable de cadena ligera (HCVR/LCVR) que se une específicamente a GDF8 y otro brazo que comprende un segundo par de HCVR/LCVR que se une específicamente a Activina A.

Unión específica

La expresión "se une específicamente" o similar, tal como se usa en el presente documento, significa que una proteína de unión específica de antígeno, o un dominio de unión específico de antígeno, forma un complejo con un antígeno particular caracterizado por una constante de disociación ( $K_D$ ) de 500 pM o menor, y no se une a otros antígenos no relacionados en condiciones de ensayo normales. Los "antígenos no relacionados" son proteínas, péptidos o polipéptidos que tienen menos de 95 % de identidad de aminoácidos entre sí. En la técnica se conocen bien métodos para determinar si dos moléculas se unen específicamente entre e incluyen, por ejemplo, diálisis en equilibrio, resonancia de plasmón superficial, y métodos similares. Por ejemplo, una proteína de unión específica de antígeno, o un dominio de unión específico de antígeno, tal como se usa en el contexto de la presente invención, incluye moléculas que se unen a un antígeno particular (p. ej., GDF8, o Activina A y/o AB) o una parte de las mismas con una  $K_D$  menor de aproximadamente 500 pM, menor de aproximadamente 400 pM, menor de aproximadamente 300 pM, menor de aproximadamente 200 pM, menor de aproximadamente 100 pM, menor de aproximadamente 90 pM, menor de aproximadamente 80 pM, menor de aproximadamente 70 pM, menor de aproximadamente 60 pM, menor de aproximadamente 50 pM, menor de aproximadamente 40 pM, menor de aproximadamente 30 pM, menor de aproximadamente 20 pM, menor de aproximadamente 10 pM, menor de aproximadamente 5 pM, menor de aproximadamente 4 pM, menor de aproximadamente 2 pM, menor de aproximadamente 1 pM, menor de aproximadamente 0,5 pM, menor de aproximadamente 0,2 pM, menor de aproximadamente 0,1 nM, o menor de aproximadamente 0,05 pM, tal como se midió en un ensayo de resonancia de plasmón superficial.

Tal como se usa en el presente documento, una proteína de unión específica de antígeno o un dominio de unión específico de antígeno "no se une" a una molécula específica (por ejemplo, "no se une a GDF11", "no se une a BMP9", "no se une a BMP10", etc.) si la proteína o dominio de unión, cuando se ensaya su unión con la molécula a 25 °C en un ensayo de resonancia de plasmón superficial, presenta una  $K_D$  mayor de 1000 pM, o no presenta ninguna unión en dicho ensayo o equivalente del mismo.

La expresión "resonancia de plasmón superficial", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un fenómeno óptico que permite el análisis de interacciones en tiempo real mediante la detección de alteraciones en las concentraciones de proteínas dentro de una matriz biodetectora, por ejemplo utilizando el sistema BIAcore™ (Biacore Life Sciences división de GE Healthcare, Piscataway, NJ).

El término " $K_D$ ", tal como se usa en el presente documento, significa la constante de disociación en equilibrio de una interacción proteína-proteína particular (p. ej., interacción anticuerpo-antígeno). A menos que se indique lo contrario, los valores de  $K_D$  desvelados en el presente documento, se refieren a valores de  $K_D$  determinados por ensayo de resonancia de plasmón superficial a 25 °C.

## Anticuerpos y fragmentos de anticuerpos de unión a antígeno

Tal como se ha indicado anteriormente, una proteína de unión específica de antígeno puede comprender o consistir en un anticuerpo o fragmento de un anticuerpo de unión a antígeno. Además, en el caso de moléculas de unión a antígeno que comprenden dos dominios de unión específicos de antígeno diferentes, uno o ambos de los dominios de unión específicos de antígeno puede comprender o consistir en un fragmento de un anticuerpo de unión a antígeno.

El término "anticuerpo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a moléculas de inmunoglobulina que comprenden cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H, *heavy*) y dos cadenas ligeras (L, *light*) interconectadas por enlaces disulfuro, así como multímeros de las mismas (p. ej., IgM). Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (abreviada en este documento como HCVR o  $V_H$ ) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada comprende tres dominios,  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  y  $C_{H3}$ . Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (abreviada en este documento como LCVR o  $V_L$ ) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera comprende un dominio ( $C_{L1}$ ). Las regiones  $V_H$  y  $V_L$  se pueden subdividir adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR, del inglés *framework regions*). Cada  $V_H$  y  $V_L$  está compuesta de tres CDR y de cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino terminal hasta el extremo carboxilo terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. En diferentes realizaciones de la invención, las FR de los anticuerpos (o parte de unión a antígeno de los mismos) de la invención, pueden ser idénticas a las secuencias de la línea germinal humana, o pueden modificarse natural o artificialmente. Una secuencia consenso de aminoácidos se puede definir basándose en un análisis paralelo de dos o más CDR.

El término "anticuerpo", tal como se usa en el presente documento, también incluye fragmentos de unión a antígeno de moléculas de anticuerpo completas. La expresión "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo, "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo, y similares, tal como se usa en el presente documento, incluye cualquier polipéptido o glucoproteína de origen natural, enzimáticamente obtenible, sintético o genéticamente modificado que se una específicamente a un antígeno para formar un complejo. Los fragmentos de unión a antígeno de un anticuerpo pueden proceder, p. ej., de moléculas de anticuerpo completas usando cualquier técnica estándar adecuada tal como digestión proteolítica o técnicas de ingeniería genética recombinante que implican la manipulación y expresión de ADN que codifica dominios variables y, opcionalmente, constantes, de anticuerpos. Dicho ADN se conoce y/o está disponible fácilmente a partir de, p. ej., fuentes comerciales, bibliotecas de ADN (incluyendo, p. ej., fagotecas de anticuerpos), o pueden sintetizarse. El ADN puede secuenciarse y manipularse químicamente o usando técnicas de biología molecular, por ejemplo, para disponer uno o más dominios variables y/o constantes en una configuración adecuada, o para introducir codones, crear restos de cisteína, modificar, añadir o eliminar aminoácidos, etc.

Como ejemplos no limitantes de fragmentos de unión a antígeno se incluyen: (i) fragmentos Fab; (ii) fragmentos  $F(ab')_2$ ; (iii) fragmentos Fd; (iv) fragmentos Fv; (v) moléculas Fv de cadena sencilla (scFv, de inglés *single chain Fv*); (vi) fragmentos dAb; y (vii) unidades de reconocimiento mínimo que consisten en los restos de aminoácidos que imitan la región hipervariable de un anticuerpo (por ejemplo, una región determinante de complementariedad (CDR) aislada, tal como un péptido CDR3) o un péptido FR3-CDR3-FR4 limitado. Otras moléculas diseñadas, tales como anticuerpos específicos de dominio, anticuerpos de un solo dominio, anticuerpos cuyo dominio se ha eliminado, anticuerpos quiméricos, anticuerpos injertados con CDR, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, minicuerpos, nanocuerpos (p. ej., nanocuerpos monovalentes, nanocuerpos divalentes, etc.), los productos inmunofarmacéuticos modulares pequeños (SMIP, del inglés *small modular immunopharmaceuticals*) y los dominios variables IgNAR de tiburón, también se incluyen en la expresión "fragmentos de unión a antígeno", tal como se usa en el presente documento.

Un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo comprenderá típicamente al menos un dominio variable. El dominio variable puede tener cualquier tamaño o composición de aminoácidos y generalmente comprenderá al menos una CDR que está adyacente o en marco con una o más secuencias estructurales. En fragmentos de unión a antígeno que tienen un dominio  $V_H$  asociado a un dominio  $V_L$ , los dominios  $V_H$  y  $V_L$  pueden situarse uno con respecto al otro en cualquier disposición adecuada. Por ejemplo, la región variable puede ser dimerica y contener dímeros  $V_H$ - $V_H$ ,  $V_H$ - $V_L$  o  $V_L$ - $V_L$ . Como alternativa, el fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo puede contener un dominio  $V_H$  o  $V_L$  monomérico.

En determinadas realizaciones, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo puede contener al menos un dominio variable unido covalentemente a al menos un dominio constante. Los ejemplos, no limitativos, de configuraciones de dominios variables y constantes que se pueden encontrar dentro de un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de la presente invención incluyen: (i)  $V_H$ - $C_{H1}$ ; (ii)  $V_H$ - $C_{H2}$ ; (iii)  $V_H$ - $C_{H3}$ ; (iv)  $V_H$ - $C_{H1}$ - $C_{H2}$ ; (v)  $V_H$ - $C_{H1}$ - $C_{H2}$ - $C_{H3}$ ; (vi)  $V_H$ - $C_{H2}$ - $C_{H3}$ ; (vii)  $V_H$ - $C_L$ ; (viii)  $V_L$ - $C_{H1}$ ; (ix)  $V_L$ - $C_{H2}$ ; (x)  $V_L$ - $C_{H3}$ ; (xi)  $V_L$ - $C_{H1}$ - $C_{H2}$ ; (xii)  $V_L$ - $C_{H1}$ - $C_{H2}$ - $C_{H3}$ ; (xiii)  $V_L$ - $C_{H2}$ - $C_{H3}$ ; y (xiv)  $V_L$ - $C_L$ . En cualquier configuración de dominios variables y constantes, incluyendo cualquiera de los ejemplos de configuraciones enumerados anteriormente, los dominios variables y constantes

pueden estar unidos directamente entre sí o pueden estar unidos mediante una región enlazadora o bisagra total o parcial. Una región bisagra puede consistir en al menos 2 (p. ej., 5, 10, 15, 20, 40, 60 o más) aminoácidos que produce un enlace flexible o semiflexible entre dominios variables y/o constantes adyacentes en una sola molécula polipeptídica. Además, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de la presente invención puede comprender un homodímero o heterodímero (u otro multímero) de cualquiera de las configuraciones de dominio variable y constante enumeradas anteriormente en asociación no covalente entre sí y/o con uno o más dominios V<sub>H</sub> o V<sub>L</sub> monoméricos (por ejemplo, mediante uno o más enlaces disulfuro).

Las moléculas de la presente invención pueden comprender o consistir en anticuerpos humanos y/o anticuerpos humanos recombinantes, o fragmentos de los mismos. La expresión "anticuerpo humano", tal como se usa en el presente documento, incluye anticuerpos que tienen regiones variables y constantes procedentes de las secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. No obstante, los anticuerpos humanos pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por las secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*), por ejemplo, en las CDR y, en particular, en la CDR3. Sin embargo, la expresión "anticuerpo humano", tal como se usa en el presente documento, no pretende incluir anticuerpos en los que las secuencias de CDR procedentes de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, se han injertado en secuencias estructurales humanas.

Las moléculas de la presente invención pueden comprender o consistir en anticuerpos humanos recombinantes y/o en fragmentos de unión a antígeno de los mismos. La expresión "anticuerpo humano recombinante", tal como se usa en el presente documento, pretende incluir todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos expresados usando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula hospedadora (descrito más adelante), anticuerpos aislados de una biblioteca recombinante, combinatoria, de anticuerpos humanos (descrita más adelante), anticuerpos aislados de un animal (p. ej., un ratón) que es transgénico para genes de inmunoglobulina humana (véase, p. ej., Taylor et al., (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295) o anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique el corte y empalme de secuencias de genes de inmunoglobulina humana con otras secuencias de ADN. Dichos anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes procedentes de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Sin embargo, en determinadas realizaciones, dichos anticuerpos humanos recombinantes se someten a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humanas, mutagénesis somática *in vivo*) y, por tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque proceden de, y están relacionadas con, secuencias de V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de la línea germinal, pueden no existir de manera natural en el repertorio de la línea germinal de anticuerpos humanos *in vivo*.

#### Anticuerpos anti GDF8 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos

En la presente invención, la proteína de unión específica de GDF8, o el dominio de unión específico de GDF8, comprende o consiste en un anticuerpo anti GDF8, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que inhibe a GDF8. Se mencionan anticuerpos anti GDF8, p. ej., en las patentes de Estados Unidos n.º 6.096.506; 7.320.789; 7.261.893; 7.807.159; 7.888.486; 7.635.760; 7.632.499; en las publicaciones de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2007/0178095; 2010/0166764; 2009/0148436; y en la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 2010/070094. Los anticuerpos anti GDF8 también se describen en la solicitud de patente de Estados Unidos n.º 13/115.170, presentada el 25 de mayo de 2011, y publicada como US 2011/0293630 A1, incluidos los anticuerpos denominados 8D12, H4H1657N2 y H4H1669P. Cualquiera de los anticuerpos anti GDF8 mencionados y/o descritos en cualquiera de las patentes o publicaciones anteriores, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, puede usarse en el contexto de la presente invención, siempre que dichos anticuerpos y/o fragmentos de unión a antígeno "se unan específicamente" a GDF8, ya que esa expresión se define en este documento.

En la Tabla 1 se exponen los identificadores de secuencias de las HCVR, de las LCVR y de las CDR de determinados ejemplos, no limitativos, de anticuerpos anti GDF8 que pueden usarse en el contexto de la presente invención.

**Tabla 1**

| Anticuerpo | HCVR | HCDR1 | HCDR2 | HCDR3 | LCVR | LCDR1 | LCDR2 | LCDR3 |
|------------|------|-------|-------|-------|------|-------|-------|-------|
| 8D12       | 1    | 2     | 3     | 4     | 5    | 6     | 7     | 8     |
| H4H1657N2  | 9    | 10    | 11    | 12    | 13   | 14    | 15    | 16    |
| H4H1669P   | 17   | 18    | 19    | 20    | 21   | 22    | 23    | 24    |

## Anticuerpos anti Activina A y fragmentos de unión a antígeno de los mismos

En la presente invención, la proteína de unión específica de Activina A, o el dominio de unión específico de Activina A, comprende o consiste en un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a Activina A e inhibe a Activina A. En determinadas realizaciones, la proteína de unión específica de Activina A se une específicamente a la subunidad  $\beta A$ . Una proteína de unión específica de antígeno que se une específicamente a la subunidad  $\beta A$ , puede reconocer tanto a la Activina A (homodímero  $\beta A/\beta A$ ) como a la Activina AB (heterodímero  $\beta A/\beta B$ ). Por tanto, de acuerdo con la presente invención, una proteína de unión específica de Activina A puede unirse tanto a Activina A como a Activina AB (pero no a Activina B). Se mencionan anticuerpos anti Activina A, p. ej., en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos nº. 2009/0234106. Un anticuerpo anti Activina A particular se denomina "MAB3381" y está disponible comercialmente en R & D Systems, Inc, Mineápolis, MN. El anticuerpo MAB3381 se une específicamente a Activina A (homodímero) así como a Activina AB (heterodímero). Cualquiera de los anticuerpos anti Activina A anteriormente mencionados, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, puede usarse en el contexto de la presente invención, siempre que dichos anticuerpos y/o fragmentos de unión a antígeno "se unan específicamente" a Activina A y/o a Activina AB, como se define en el presente documento.

## Composiciones farmacéuticas y métodos de administración

La presente invención incluye composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos anti GDF8 y anti Activina A. Las composiciones farmacéuticas de la invención se formulan con vehículos, excipientes y otros agentes adecuados que proporcionan transferencia, suministro, tolerancia y propiedades similares. Se puede encontrar una multitud de formulaciones apropiadas, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Como formulaciones adecuadas se incluyen, por ejemplo, polvos, pastas, ungüentos, gelatinas, ceras, aceites, lípidos, lípidos (catiónicos o aniónicos) que contienen vesículas (tales como LIPOFECTIN™), conjugados de ADN, pastas de absorción anhidras, emulsiones de aceite en agua y de agua en aceite, emulsiones Carbowax (polietilenglicoles de diversos pesos moleculares), geles semisólidos y mezclas semisólidas que contienen Carbowax. También se describen otras formulaciones adecuadas en Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311.

Se conocen diversos sistemas de suministro y se pueden usar para administrar las composiciones farmacéuticas de la presente invención, p. ej., encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar los virus mutantes, endocitosis mediada por receptor (véase, p. ej., Wu et al., 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432). Los métodos de administración incluyen, pero sin limitación, las vías intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural y oral. Las composiciones pueden administrarse mediante cualquier vía conveniente, por ejemplo, mediante infusión o inyección en embolada, mediante absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (p. ej., mucosa oral, rectal y mucosa intestinal, etc.) y pueden administrarse junto con otros agentes biológicamente activos.

Una composición farmacéutica de la presente invención puede suministrarse por vía subcutánea o intravenosa con una aguja y una jeringa estándar. Además, con respecto al suministro subcutáneo, un dispositivo de suministro de tipo pluma tiene fácilmente aplicaciones para suministrar una composición farmacéutica de la presente invención. Dicho dispositivo de suministro de tipo pluma puede ser reutilizable o desechable. Un dispositivo de suministro de tipo de pluma reutilizable generalmente utiliza un cartucho reemplazable que contiene una composición farmacéutica. Una vez que se ha administrado toda la composición farmacéutica dentro del cartucho y que el cartucho está vacío, el cartucho vacío puede desecharse fácilmente y reemplazarse por uno nuevo que contenga la composición farmacéutica. Después, el dispositivo de suministro de tipo pluma puede reutilizarse. En un dispositivo de suministro de tipo pluma desechable, no hay un cartucho reemplazable. Más bien, el dispositivo de suministro de tipo pluma desechable ya viene cargado con la composición farmacéutica incluida en un depósito dentro del dispositivo. Una vez que el depósito se vacía de la composición farmacéutica, se desecha todo el dispositivo.

Numerosos dispositivos de suministro de tipo pluma y autoinyectores reutilizables tienen aplicaciones en el suministro subcutáneo de una composición farmacéutica de la presente invención. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK), DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Bergdorf, Suiza), pluma HUMALOG MIX 75/25™, pluma HUMALOG™, pluma HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly y Co., Indianápolis, IN), NOVOPEN™ I, II y III (Novo Nordisk, Copenhagen, Dinamarca), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhagen, Dinamarca), pluma BD™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ y OPTICLIK™ (sanofi-aventis, Frankfurt, Alemania), por nombrar solo algunos. Los ejemplos de dispositivos de suministro de tipo pluma desechables que tienen aplicaciones en el suministro subcutáneo de una composición farmacéutica de la presente invención incluyen, pero sin limitación, las plumas SOLOSTAR™ (sanofi-aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) y KWIKPEN™ (Eli Lilly), el autoinyector SURECLICK™ (Amgen, Thousand Oaks, CA), las plumas PENLET™ (Haselmeier, Stuttgart, Alemania), EPIPEN (Dey, LP) y HUMIRA™ (Abbott Labs, Abbott Park IL), por nombrar solo algunos.

En determinadas situaciones, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse en un sistema de liberación controlada. En una realización, se puede usar una bomba (véase Langer, citado anteriormente; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201). En otra realización, se pueden usar materiales poliméricos; véase, Medical Applications of Controlled Release, Langer y Wise (eds.), 1974, CRC Pres., Boca Ratón, Florida. En otra realización más, se puede colocar un sistema de liberación controlada en proximidad con la diana terapéutica, requiriendo por tanto solo una fracción de la dosis sistémica (véase, p. ej., Goodson, 1984, en Medical Applications of Controlled Release, citado anteriormente, vol. 2, págs. 115-138). En la revisión de Langer, 1990, Science 249:1527-1533, se mencionan otros sistemas de liberación controlada.

Las preparaciones inyectables pueden incluir formas de dosificación para inyecciones intravenosas, subcutáneas, intracutáneas e intramusculares, infusiones por goteo, etc. Estas preparaciones inyectables pueden prepararse por métodos conocidos. Por ejemplo, las preparaciones inyectables pueden prepararse, p. ej., disolviendo, suspendiendo o emulsionando el anticuerpo o su sal, descritos anteriormente, en un medio acuoso estéril o un medio oleaginoso convencionalmente usado para inyecciones. Como medio acuoso para inyecciones, existen, por ejemplo, solución salina fisiológica, una solución isotónica que contiene glucosa y otros agentes auxiliares, etc., que pueden usarse en combinación con un agente solubilizante apropiado tal como un alcohol (p. ej., etanol), un polialcohol (p. ej., propilenglicol, polietilenglicol), un tensioactivo no iónico [p. ej., polisorbato 80, HCO-50 (aducto de polioxi-etileno (50 mol) de aceite de ricino hidrogenado)], etc. Como medio oleaginoso, se emplea, p. ej., aceite de sésamo, aceite de soja, etc., que pueden usarse en combinación con un agente solubilizante tal como benzoato de bencilo, alcohol bencilico, etc. La inyección preparada de esta manera se carga preferentemente en una ampolla apropiada.

Favorablemente, las composiciones farmacéuticas para uso oral o parenteral descritas anteriormente se preparan en formas de dosificación en una dosis unitaria adecuada para ajustar una dosis de los ingredientes activos. Dichas formas de dosificación en una dosis unitaria incluyen, por ejemplo, comprimidos, píldoras, cápsulas, inyecciones (ampollas), supositorios, etc.

## 25 Dosificaciones

La cantidad de ingrediente activo (por ejemplo, anticuerpos anti GDF8 y anticuerpos anti Activina A) que se puede administrar a un sujeto es, en general, una cantidad terapéuticamente eficaz. Tal como se usa en el presente documento, la frase "cantidad terapéuticamente eficaz" significa una dosis de proteínas de unión específica de antígeno y/o moléculas de unión a antígeno, que da como resultado un aumento detectable en uno o más de los siguientes parámetros: peso corporal, masa muscular (p. ej., masa del músculo tibial anterior [TA], masa del músculo gastrocnemio [GA], masa del músculo cuádriceps [Cuad.], etc.), fuerza/potencia muscular y/o función muscular. Por ejemplo, una "cantidad terapéuticamente eficaz" de una proteína de unión específica de GDF8 y/o una proteína de unión específica de Activina A incluye, p. ej., una cantidad de proteína de unión específica de GDF8 y/o proteína de unión específica de Activina A que, cuando se administra a un sujeto, produce un aumento en la masa muscular TA o GA de al menos 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60% o más, en comparación con sujetos tratados con control, p. ej., como se ilustra en el Ejemplo 1, del presente documento.

En el caso de los anticuerpos desvelados en el presente documento (p. ej., anticuerpos anti GDF( anti-GDF8, anticuerpos anti Activina A, o anticuerpos biespecíficos que se unen específicamente a GDF8 y a Activina A), una cantidad terapéuticamente eficaz puede ser de aproximadamente 0,05 mg a aproximadamente 600 mg; p. ej., aproximadamente 0,05 mg, aproximadamente 0,1 mg, aproximadamente 1,0 mg, aproximadamente 1,5 mg, aproximadamente 2,0 mg, aproximadamente 10 mg, aproximadamente 20 mg, aproximadamente 30 mg, aproximadamente 40 mg, aproximadamente 50 mg, aproximadamente 60 mg, aproximadamente 70 mg, aproximadamente 80 mg, aproximadamente 90 mg, aproximadamente 100 mg, aproximadamente 110 mg, aproximadamente 120 mg, aproximadamente 130 mg, aproximadamente 140 mg, aproximadamente 150 mg, aproximadamente 160 mg, aproximadamente 170 mg, aproximadamente 180 mg, aproximadamente 190 mg, aproximadamente 200 mg, aproximadamente 210 mg, aproximadamente 220 mg, aproximadamente 230 mg, aproximadamente 240 mg, aproximadamente 250 mg, aproximadamente 260 mg, aproximadamente 270 mg, aproximadamente 280 mg, aproximadamente 290 mg, aproximadamente 300 mg, aproximadamente 310 mg, aproximadamente 320 mg, aproximadamente 330 mg, aproximadamente 340 mg, aproximadamente 350 mg, aproximadamente 360 mg, aproximadamente 370 mg, aproximadamente 380 mg, aproximadamente 390 mg, aproximadamente 400 mg, aproximadamente 410 mg, aproximadamente 420 mg, aproximadamente 430 mg, aproximadamente 440 mg, aproximadamente 450 mg, aproximadamente 460 mg, aproximadamente 470 mg, aproximadamente 480 mg, aproximadamente 490 mg, aproximadamente 500 mg, aproximadamente 510 mg, aproximadamente 520 mg, aproximadamente 530 mg, aproximadamente 540 mg, aproximadamente 550 mg, aproximadamente 560 mg, aproximadamente 570 mg, aproximadamente 580 mg, aproximadamente 590 mg o aproximadamente 600 mg, del anticuerpo respectivo.

La cantidad de un anticuerpo desvelado en el presente documento (p. ej., anticuerpos anti GDF8, anticuerpos anti Activina A, o anticuerpos biespecíficos que se unen específicamente a GDF8 y a Activina A), contenida en las dosis individuales puede expresarse en términos de miligramos de anticuerpo por kilogramo de peso corporal del paciente

(es decir, mg/kg). Por ejemplo, los anticuerpos anti GDF8, anti Activina A y/o anti GDF8/anti Activina A biespecíficos pueden administrarse a un paciente a una dosis de aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal del paciente (por ejemplo, 0,5 mg/kg, 1,0 mg/kg, 1,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 2,5 mg/kg, 3,0 mg/kg, 3,5 mg/kg, 4,0 mg/kg, 4,5 mg/kg, 5,0 mg/kg, 5,5 mg/kg, 6,0 mg/kg, 6,5 mg/kg, 7,0 mg/kg, 7,5 mg/kg, 8,0 mg/kg, 8,5 mg/kg, 9,0 mg/kg, 9,5 mg/kg, 10,0 mg/kg, 10,5 mg/kg, 11,0 mg/kg, 11,5 mg/kg, etc.).

Las composiciones de la presente invención pueden comprender las mismas cantidades de proteína de unión específica de GDF8 y proteína de unión específica de Activina A. Como alternativa, la cantidad de proteína de unión específica de GDF8 en la composición puede ser menor o mayor que la cantidad de proteína de unión específica de Activina A. Un experto familiarizado con la técnica, usando experimentación habitual, podrá determinar las cantidades apropiadas de los componentes individuales en las composiciones de la presente invención, que son necesarias para producir un efecto terapéutico deseado.

#### Métodos terapéuticos

En este documento se describen métodos para tratar afecciones o molestias que pueden curarse, aliviarse o mejorarse aumentando la fuerza/potencia muscular y/o la masa muscular y/o la función muscular en un individuo, o alterando favorablemente el metabolismo (procesamiento de hidratos de carbono, lípidos y proteínas) a través de la unión específica a GDF8, y/o a Activina A, y/o a Activina AB, y no a través de la unión a otros ligandos de ActRIIB. La presente invención se refiere a métodos no terapéuticos para aumentar la fuerza/potencia muscular y/o la masa muscular y/o la función muscular en un sujeto, o a composiciones para uso para tratar una enfermedad o un trastorno caracterizado por la disminución de la masa o fuerza muscular en un sujeto. Los métodos pueden comprender administrar al sujeto un anticuerpo anti GDF8, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que inhibe a GDF8 y un anticuerpo anti Activina A, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que inhibe a Activina A.

En los métodos que comprenden administrar a un sujeto un anticuerpo anti GDF8 y un anticuerpo anti Activina A, el anticuerpo anti GDF8 y el anticuerpo anti Activina A se pueden administrar al sujeto al mismo tiempo, o sustancialmente al mismo tiempo, p. ej., en una sola dosificación terapéutica, o en dos dosificaciones distintas que se administran simultáneamente o en un intervalo de tiempo menor de aproximadamente 5 minutos entre ellas. Como alternativa, el anticuerpo anti GDF8 y el anticuerpo anti Activina A se pueden administrar al sujeto de manera secuencial, p. ej., en dosificaciones terapéuticas distintas, separadas entre sí en un intervalo de tiempo mayor de aproximadamente 5 minutos.

La presente invención también incluye métodos no terapéuticos para aumentar la fuerza muscular y/o la masa muscular en un sujeto, o composiciones para tratar una enfermedad o un trastorno caracterizado por la disminución de la masa o fuerza muscular en un sujeto, administrando al sujeto una molécula de unión a antígeno que comprende un anticuerpo anti GDF8, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que inhibe a GDF8 y un anticuerpo anti Activina A, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que inhibe a Activina A. Por ejemplo, los métodos terapéuticos de la presente invención incluyen administrar a un sujeto un anticuerpo biespecífico que comprende un primer dominio variable que comprende un par de HCVR/LCVR que se une específicamente a GDF8 y un segundo dominio variable que comprende un par de HCVR/LCVR que se une específicamente a Activina A.

Las composiciones de la presente invención pueden administrarse a un sujeto junto con uno o más agentes terapéuticos adicionales, que incluyen, p. ej., inhibidores de factores de crecimiento, inmunosupresores, agentes antiinflamatorios, inhibidores metabólicos, inhibidores enzimáticos y agentes citotóxicos/citostáticos. El (los) agente(s) terapéutico(s) adicional(es) pueden administrarse antes, junto con, o después de la administración de las proteínas de unión específicas de GDF8 y Activina A de la presente invención.

Los ejemplos de enfermedades, trastornos y afecciones que pueden tratarse con las composiciones de la presente invención incluyen, pero sin limitación, sarcopenia, caquexia (idiopática o secundaria a otras afecciones, p. ej., cáncer, insuficiencia renal crónica o enfermedad pulmonar obstructiva crónica), lesión muscular, desgaste muscular y atrofia muscular, p. ej., atrofia o desgaste muscular causado por, o asociado a, inactividad (desuso), inmovilización, reposo en cama, lesión, tratamiento médico o intervención quirúrgica (p. ej., fractura de cadera, reemplazo de cadera, reemplazo de rodilla, etc.) o por necesidad de respiración mecánica. Las composiciones de la invención también se pueden usar para tratar, prevenir o mejorar enfermedades tales como cáncer, obesidad, diabetes, artritis, esclerosis múltiple, distrofia muscular, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Parkinson, osteoporosis, artrosis, osteopenia, síndromes metabólicos (incluyendo, pero sin limitación, diabetes, obesidad, trastornos nutricionales, atrofia de órganos, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y anorexia).

#### Evitación de efectos secundarios

La presente invención incluye métodos no terapéuticos para aumentar la fuerza muscular y/o la masa muscular en un sujeto, o composiciones para su uso para tratar una enfermedad o un trastorno caracterizado por la disminución de la masa o fuerza muscular en un sujeto, sin causar efectos secundarios adversos asociados a la administración

de moléculas que se unen a múltiples (por ejemplo, 3 o más) ligandos de ActRIIB. Por ejemplo, la molécula clínica denominada ACE-031 (Acceleron Pharma, Inc., Cambridge, MA) es un multímero que consiste en la parte extracelular de ActRIIB fusionada a un dominio Fc de IgG (en el presente documento esta molécula también se denomina "ActRIIB-Fc"). La molécula ActRIIB-Fc se une a GDF8, así como a otros ligandos de ActRIIB, tales como, p. ej., Activina AB, Activina B, GDF11, BMP9, BMP10 y TGF $\beta$ , y se sabe que provoca diversos efectos secundarios adversos cuando se administra a pacientes humanos. De manera significativa, los presentes inventores han descubierto inesperadamente que la inhibición específica de GDF8 y Activina A (por ejemplo, administrando un anticuerpo anti GDF8 y un anticuerpo anti Activina A), al mismo tiempo que no se inhiben otros ligandos de ActRIIB, tales como Activina B, GDF11, BMP9, BMP10 y TGF $\beta$ , produce un aumento en la masa muscular que es al menos equivalente al observado mediante la administración de ActRIIB-Fc, sin causar los efectos secundarios adversos asociados a agentes de unión no específicos de Activina, tales como ActRIIB-Fc.

#### Regímenes de administración

De acuerdo con determinadas realizaciones de la presente invención, múltiples dosis de las composiciones de la presente invención (p. ej., composiciones que comprenden proteínas de unión específicas de GDF8 y de Activina A o moléculas de unión a antígeno que comprenden un dominio de unión específico de GDF8 y un dominio de unión específico de Activina A) como se define en las reivindicaciones), se pueden administrar a un sujeto durante un ciclo de tiempo definido. Esto comprende administrar secuencialmente a un sujeto múltiples dosis de las composiciones de la presente invención. Tal como se usa en el presente documento, "administrar secuencialmente" significa que cada dosis de las composiciones de la presente invención se administra al sujeto en un punto diferente en el tiempo, p. ej., en días diferentes separados por un intervalo predeterminado (p. ej., horas, días, semanas o meses). Los métodos a los que se refiere la presente invención incluyen métodos que comprenden administrar secuencialmente al paciente una dosis inicial de una composición de la presente invención, seguida de una o más dosis secundarias de la composición, y opcionalmente seguida de una o más dosis terciarias de la composición.

Las expresiones "dosis inicial", "dosis secundarias" y "dosis terciarias", se refieren a la secuencia de administración temporal de las composiciones de la presente invención. Por tanto, la "dosis inicial" es la dosis que se administra al comienzo del régimen de tratamiento (denominada también "dosis de referencia"); las "dosis secundarias" son las dosis que se administran después de la dosis inicial; y las "dosis terciarias" son las dosis que se administran después de las dosis secundarias. Las dosis inicial, secundaria y terciaria pueden contener la misma cantidad de ingrediente(s) activo(s), pero generalmente difieren entre sí en cuanto a la frecuencia de administración. Sin embargo, en determinadas realizaciones, la cantidad de ingrediente(s) activo(s) contenido(s) en las dosis inicial, secundaria y/o terciaria variarán entre sí (p. ej., se ajustarán a una mayor o menor cantidad según sea apropiado) durante el ciclo del tratamiento.

En un ejemplo de realización de la presente invención, cada dosis secundaria y/o terciaria se administra de 1 a 30 (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, o más) días después de la dosis inmediatamente anterior. La frase "la dosis inmediatamente anterior", tal como se usa en el presente documento, significa, en una secuencia de administraciones múltiples, la(s) dosis de las composiciones de la presente invención que se administran a un sujeto antes de la administración de la siguiente dosis en la secuencia sin dosis intermedias.

Los métodos a los que se refiere este aspecto de la invención pueden comprender administrar a un paciente cualquier cantidad de dosis secundarias y/o terciarias de las composiciones de la presente invención. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, al paciente solo se le administra una única dosis secundaria. En otras realizaciones, al paciente se le administra dos o más (p. ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más) dosis secundarias. Asimismo, en determinadas realizaciones, al paciente solo se le administra una única dosis terciaria. En otras realizaciones, al paciente se le administra dos o más (p. ej., 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más) dosis terciarias.

En realizaciones que implican dosis secundarias múltiples, cada dosis secundaria se puede administrar con la misma frecuencia que las otras dosis secundarias. Por ejemplo, cada dosis secundaria se puede administrar al paciente de 1 a 29 días después de la dosis inmediatamente anterior. De forma similar, en realizaciones que implican dosis terciarias múltiples, cada dosis terciaria se puede administrar con la misma frecuencia que las otras dosis terciarias. Por ejemplo, cada dosis terciaria se puede administrar al paciente de 1 a 60 días después de la dosis inmediatamente anterior. Como alternativa, la frecuencia a la que se administran las dosis secundarias y/o terciarias a un paciente puede variar en el transcurso del régimen de tratamiento. La frecuencia de la administración también puede ajustarla un médico durante el transcurso del tratamiento, dependiendo de las necesidades del paciente individual después de la exploración clínica.

#### Ejemplos

Los siguientes ejemplos se presentan para proporcionar a los expertos en la materia una divulgación y descripción completas de cómo preparar y usar los usos y composiciones médicas de la invención, y no pretenden limitar el

alcanze de lo que los inventores consideran como su invención, que se define por las reivindicaciones adjuntas. Se han realizado esfuerzos para garantizar la exactitud con respecto a los números utilizados (p. ej., cantidades, temperatura, etc.) pero deben tenerse en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio, la temperatura está en grados centígrados y la presión es la atmosférica o próxima a esta.

### Ejemplo 1. La inhibición específica de GDF8 y de Activina A produce aumentos sinérgicos en la introducción de masa muscular esquelética

La molécula ActRIIB-Fc es un antagonista de GDF8 que consiste en la parte extracelular del receptor ActRIIB, estabilizada por fusión a un dominio Fc de IgG. Se ha demostrado que la molécula ActRIIB-Fc aumenta la masa muscular en ratones en mayor medida que los anticuerpos anti GDF8. Los presentes inventores plantearon la hipótesis de que la actividad potenciada de ActRIIB-Fc podría deberse posiblemente a su capacidad de unirse a otros ligandos de ActRIIB además de a GDF8. En particular, se propuso que el antagonismo de Activina A, además del antagonismo de GDF8, podría causar mayores aumentos en la masa muscular esquelética en comparación con lo que se había observado en animales tratados solo con anticuerpos anti GDF8. Por tanto, el presente Ejemplo se diseñó para determinar si la inhibición específica de GDF8 y de Activina A podía aumentar la masa muscular esquelética en un grado que fuese al menos equivalente al aumento observado usando la molécula ActRIIB-Fc.

#### Resultados y análisis

El grado de hipertrofia del músculo esquelético inducido por la administración de ActRIIB-Fc se comparó con el efecto de la administración de un anticuerpo específico de GDF8, un anticuerpo específico de Activina A, o una combinación de un anticuerpo anti GDF8 + anti Activina A. La construcción ActRIIB-Fc utilizada en este Ejemplo tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 27. El anticuerpo anti GDF8 usado en este Ejemplo es el anticuerpo denominado H4H1657N2 (véase la Tabla 1). El anticuerpo anti Activina A usado en este Ejemplo es el anticuerpo denominado MAB3381 (disponible en R & D Systems, Inc., Mineápolis, MN). Como control negativo se utilizó un anticuerpo (hlgG4) de isotipo compatible.

Resumiendo, De manera uniforme, 25 ratones CB17 SCID macho de aproximadamente 10 semanas de vida, se distribuyeron según el peso corporal en 5 grupos en función del tratamiento (Isotipo Control mAb, ActRIIB-Fc, H4H1657N2, MAB3381 o H4H1657N2 + MAB3381). Los reactivos se administraron por vía subcutánea a una dosis de 10 mg/kg dos veces durante la primera semana (el día 0 y el día 3) y una vez a la semana durante las siguientes tres semanas (el día 7, el día 14 y el día 21). El día 28, los ratones se sacrificaron y se pesaron, y los músculos tibial anterior (TA) y gastrocnemio (GA), se disecaron y se pesaron. Los tejidos se normalizaron a peso corporal inicial, y se calculó el cambio porcentual en peso sobre el anticuerpo de control de isotipo compatible (hlgG4). Los resultados se resumen en la Tabla 2 y se expresan como incremento porcentual sobre el control negativo  $\pm$  error típico de la media.

Tabla 2A

|                      | Control de Isotipo | ActRIIB-Fc       | H4H1657N2 (anti GDF8) | MAB3381 (Anti Activina A) | H4H1657N2 + MAB3381 |
|----------------------|--------------------|------------------|-----------------------|---------------------------|---------------------|
| <b>Dosis</b>         | 10 mg/kg           | 10 mg/kg         | 10 mg/kg              | 10 mg/kg                  | 10 mg/kg (cada una) |
| <b>Peso corporal</b> | 0,00 $\pm$ 1,18    | 14,83 $\pm$ 4,36 | 7,88 $\pm$ 2,10       | 4,52 $\pm$ 1,02           | 16,08 $\pm$ 1,91    |
| <b>Músculo TA</b>    | 0,00 $\pm$ 2,90    | 44,88 $\pm$ 5,35 | 22,42 $\pm$ 1,65      | 19,09 $\pm$ 2,04          | 55,13 $\pm$ 5,16    |
| <b>Músculo GA</b>    | 0,00 $\pm$ 2,13    | 34,25 $\pm$ 6,97 | 24,17 $\pm$ 1,84      | 14,02 $\pm$ 0,91          | 41,72 $\pm$ 3,63    |

Para confirmar que la hipertrofia muscular se debía a un aumento en el tamaño de las miofibrillas, el músculo tibial anterior (TA) se embebió en OCT y se congeló en isopentano para el examen histológico y el marcaje inmunohistoquímico. Los cortes transversales del músculo TA se tiñeron con anticuerpos anti laminina para delinear las miofibrillas, y el área media transversal (AMT) se determinó usando un sistema de análisis de obtención de imágenes. En la Tabla 2B se resumen los resultados de dos experimentos independientes (Exp#1 y Exp#2). Todos los datos se muestran como media  $\pm$  error típico de la media.

Tabla 2B

|                                  | Control de Isotipo | ActRIIB-Fc         | H4H1657N2 (anti GDF8) | MAB3381 (Anti Activina A) | H4H1657N2 + MAB3381 |
|----------------------------------|--------------------|--------------------|-----------------------|---------------------------|---------------------|
| AMT ( $\mu\text{m}^2$ )<br>Exp#1 | 1800,1 $\pm$ 78,3  | 2488,7 $\pm$ 116,6 | 1987,2 $\pm$ 72,1     | 1962,6 $\pm$ 157,1        | 2435,4 $\pm$ 119,7  |
| AMT ( $\mu\text{m}^2$ )<br>Exp#2 | 1702,7 $\pm$ 50,9  | 2571,9 $\pm$ 123,3 | 2006,3 $\pm$ 133,9    | 1690,9 $\pm$ 78,9         | 2452,6 $\pm$ 110,3  |

Como se muestra en la tabla 2A, ActRIIB-Fc indujo hipertrofia significativa en todos los músculos examinados, con aumentos de  $44,88 \pm 5,35\%$  en la masa del músculo TA y de  $34,25 \pm 6,97\%$  en la masa del músculo GA. El tratamiento solo con H4H1657N2 (anti GDF8) o MAB3381 (anti a A) también indujo una hipertrofia significativa en la masa del músculo AT ( $22,42 \pm 1,65\%$  y  $19,09 \pm 2,04\%$ , respectivamente) y en la masa del músculo GA ( $24,17 \pm 1,84\%$  y  $14,02 \pm 0,91\%$ , respectivamente) pero no tan pronunciada como con ActRIIB-Fc. Sin embargo, la combinación de H4H1657N2 y MAB3381 indujo aumentos en el músculo TA ( $55,13 \pm 5,16\%$ ) y en el músculo GA ( $41,72 \pm 3,63\%$ ), que fueron incluso mayores que los observados en animales tratados con ActRIIB-hFc. Además, se confirmó que la hipertrofia muscular observada se debía a un aumento en el tamaño de las miofibrillas (véase la Tabla 2B).

Cabe destacar que, el grado de aumento en el peso corporal, en el músculo TA y en el músculo GA para la combinación de anti GDF8 + anti Activina A, fue sustancialmente mayor que el de las sumas de los aumentos en estos parámetros observados en los sujetos tratados con monoterapia anti GDF8 y anti Activina A. Por tanto, la inhibición combinada de GDF8 y Activina A produce aumentos sinérgicos en el peso corporal y en la masa muscular esquelética, y estos aumentos son más pronunciados que lo que se observa en animales tratados con ActRIIB-Fc. Además, como se demuestra en el siguiente ejemplo, pueden obtenerse aumentos en el peso corporal y en la masa muscular esquelética en animales tratados con agentes de unión específicos de GDF8 y de Activina, sin causar los efectos secundarios adversos observados con moléculas tales como ActRIIB-Fc.

#### Ejemplo 2: El antagonismo específico de GDF8 y Activina A no produce efectos secundarios adversos asociados a agentes de unión a ligando no específicos de Activina

##### Antecedentes

La molécula ActRIIB-Fc se une a múltiples ligandos de ActRIIB y produce efectos secundarios significativos. El presente Ejemplo demuestra que los efectos secundarios adversos asociados a ActRIIB-Fc se pueden evitar antagonizando selectivamente solo determinados ligandos, concretamente GDF8 y/o Activina A. En particular, los estudios de biomarcadores, expresión proteica y las características eritrocitarias *in vivo* (es decir, niveles elevados de endogлина y aumento de la amplitud de distribución eritrocitaria), que parecen estar relacionados con los efectos secundarios de ActRIIB-Fc en seres humanos, sólo se observaron en animales tratados con ActRIIB-Fc, pero no en animales tratados con anticuerpo anti GDF8, anticuerpo anti Activina A o con una combinación de anticuerpos anti GDF8 y anti Activina A. Por tanto, considerados en su conjunto, los siguientes resultados muestran que el antagonismo específico de GDF8 y/o Activina A, sin antagonizar a otros ligandos de ActRIIB tales como Activina B, GDF11, BMP9, BMP10 y/o TGF $\beta$ , no produce los fenotipos indeseados asociados a ActRIIB-Fc.

##### Resultados y análisis

Se realizaron estudios hematológicos usando ratones tratados con ActRIIB-Fc (SEC ID N°: 27), H4H1657N2 (anti GDF8), MAB3381 (anti Activina A), o una combinación de H4H1657N2 + MAB3381, según el programa de dosificación descrito en el Ejemplo 1 (es decir, 10 mg/kg dos veces durante la primera semana [el día 0 y el día 3] y una vez a la semana durante las tres semanas siguientes [el día 7, el día 14 y el día 21]). Específicamente, se midieron los niveles de hemoglobina y la amplitud de distribución eritrocitaria (ADE) (un indicador de determinados trastornos sanguíneos tales como anemia) de muestras de sangre extraídas de ratones tratados con los diversos agentes. En la Tabla 3 se resumen los resultados de ADE (normalizados a valores de control de isotipo).

Tabla 3

|       | Control de Isotipo | ActRIIB-Fc     | H4H1657N2 (anti GDF8) | MAB3381 (Anti Activina A) | H4H1657N2 + MAB3381 |
|-------|--------------------|----------------|-----------------------|---------------------------|---------------------|
| Dosis | 10 mg/kg           | 10 mg/kg       | 10 mg/kg              | 10 mg/kg                  | 10 mg/kg (cada una) |
| % ADE | 0,0 $\pm$ 1,8      | 19,1 $\pm$ 2,1 | -1,6 $\pm$ 0,7        | 4,4 $\pm$ 0,5             | -1,9 $\pm$ 1,2      |

Después de 28 días de tratamiento, ninguno de los grupos tuvo un aumento significativo en los niveles de Hb. Sin embargo, tal como se muestra en la Tabla 3, los ratones tratados con ActRIIB-Fc mostraron un aumento significativo en la amplitud de distribución eritrocitaria (ADE), que refleja el grado de variación de tamaño de los eritrocitos en una muestra. Sorprendentemente, los ratones tratados con anticuerpo anti GDF8, anticuerpo anti Activina A, o con la

combinación de anticuerpos anti GDF8 + anti Activina A, no mostraron un grado apreciable de aumento en el % de ADE en comparación con los ratones tratados con control de isotipo. Por lo tanto, estos experimentos demuestran que el antagonismo de GDF8 o Activina A solo, o la combinación de anticuerpos anti GDF8 + anticuerpos anti Activina A, no produce los fenotipos hematológicos que se observan con el tratamiento con ActRIIB-Fc.

- 5 Para investigar adicionalmente las diferencias en los efectos secundarios entre los sujetos tratados con ActRIIB-Fc y los sujetos tratados con la combinación anti GDF8 + anti Activina A, se realizaron estudios de expresión de proteínas y micromatriz.

10 El análisis de micromatriz se realizó en muestras de músculo esquelético de ratones tratados con control de isotipo, ActRIIB-Fc y H4H1657N2 (anti GDF8). A partir de estos experimentos, se identificó un conjunto de genes que únicamente se veía afectado por ActRIIB-Fc. De particular interés fue la regulación positiva de los niveles de ARNm de endoglina en músculo esquelético en muestras de sujetos tratados con ActRIIB-Fc. La endoglina es una proteína transmembrana expresada principalmente en células endoteliales e interacciona y promueve la señalización a través de receptores de la familia TGFβ (ALK1) en respuesta a TGFβ, BMP9 o BMP10. La señalización mediada por Alk1 y endoglina en células endoteliales es necesaria para el mantenimiento de estructuras vasculares normales. Las mutaciones en los genes Alk1 y endoglina en seres humanos producen Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria (THH). Los pacientes que padecen THH muestran un fenotipo vascular que incluye dilatación de los vasos sanguíneos y sangrado en la mucosa nasal, bucal y gastrointestinal. Por tanto, los niveles elevados de endoglina, producidos por ActRIIB-Fc, posiblemente reflejan al menos algunos de los efectos secundarios adversos observados en pacientes tratados con este agente terapéutico.

20 A continuación, se realizaron experimentos para confirmar que los cambios observados en los niveles de ARNm de endoglina también se reflejaban a nivel de expresión de la proteína, utilizando muestras de músculo del experimento anterior. El análisis de transferencia de Western cuantitativo de los niveles de la proteína endoglina se realizó en muestras de ratones tratados con control de isotipo, ActRIIB-Fc, H4H1657N2 (anti GDF8), MAB3381 (anti Activina A) y la combinación H4H1657N2 + MAB3381. La expresión de endoglina se normalizó mediante el marcador de células endoteliales CD31 para confirmar que el tratamiento con ActRIIB-hFc no aumenta el compartimento endotelial. En la  
25 Tabla 4 se resumen los resultados (normalizados a valores de control de isotipo).

**Tabla 4**

|                          | <b>Control de Isotipo</b> | <b>ActRIIB-Fc</b> | <b>H4H1657N2 (anti GDF8)</b> | <b>MAB3381 (Anti Activina A)</b> | <b>H4H1657N2 + MAB3381</b> |
|--------------------------|---------------------------|-------------------|------------------------------|----------------------------------|----------------------------|
| <b>Dosis</b>             | 10 mg/kg                  | 10 mg/kg          | 10 mg/kg                     | 10 mg/kg                         | 10 mg/kg (cada una)        |
| <b>D.O. de Endoglina</b> | 0,0 ± 1,4                 | 88,4 ± 2,9        | 5,5 ± 2,1                    | 4,7 ± 5,0                        | 1,4 ± 7,6                  |
| <b>D.O. de CD31</b>      | 0,0 ± 4,2                 | 2,2 ± 6,2         | -6,8 ± 4,0                   | -2,1 ± 9,3                       | -19,3 ± 6,7                |
| <b>D.O. Relación</b>     | 0,0 ± 5,6                 | 84,5 ± 8,3        | 13,1 ± 2,6                   | 7,1 ± 5,1                        | 25,5 ± 1,0                 |

30 Como se muestra en la Tabla 4, los niveles de la proteína endoglina se elevaron significativamente en el grupo tratado con ActRIIB-hFc, pero no en los grupos tratados con anti GDF8 o anti Activina A. Cabe destacar que, los niveles de endoglina tampoco fueron elevados en el grupo tratado con la combinación anti GDF8 + anti Activina A.

**Resumen y conclusiones**

35 Los resultados presentados en el Ejemplo anterior (Ejemplo 1) muestran que el tratamiento con la combinación de anti GDF8 + anti Activina A puede producir efectos de hipertrofia muscular que son al menos equivalentes a los observados con el tratamiento con ActRIIB-Fc. El presente Ejemplo 2 muestra que los indicadores de los efectos secundarios adversos del tratamiento con ActRIIB-Fc, tales como un aumento de ADE y la expresión elevada de endoglina, no se observan con tratamiento de anti GDF8, anti Activina A o combinación de anti GDF8 + anti Activina A. Por tanto, los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que el tratamiento con una proteína de unión específica de GDF8, o una proteína de unión específica de Activina A, o una combinación de una proteína de unión específica de GDF8 y una proteína de unión específica de Activina A, proporciona métodos sumamente  
40 eficaces para aumentar la masa y la fuerza muscular que impide que se produzcan los efectos secundarios adversos producidos por ActRIIB-Fc.

**Ejemplo 3: Efectos de los antagonistas de GDF8 y Activina A sobre la cicatrización de heridas**

Los agentes farmacéuticos que actúan aumentando la masa y la fuerza muscular, tales como los antagonistas de GDF8 y de Activina A, tienen utilidad en situaciones en las que los pacientes se han sometido a cirugía (o se

someterán a cirugía), p. ej., para reemplazo o reparación de articulaciones, etc. Como tales, los agentes que se administran para promover el rescate de la masa muscular idealmente no interferirían con otros aspectos de recuperación quirúrgica, tales como la cicatrización de heridas.

5 Por consiguiente, se realizaron experimentos para determinar los efectos del bloqueo de GDF8, el bloqueo de Activina A, y combinaciones de los mismos, sobre la cicatrización de heridas, en comparación con los efectos del tratamiento con ActRIIB-Fc. Estos estudios se realizaron en ratones SCID. En particular, los efectos de la administración de H4H1657N2 (anti GDF8) y MAB3381 (anti Activina A) sobre la cicatrización de heridas, como tratamientos únicos o en combinación entre sí, se compararon con los efectos de cicatrización de heridas del receptor señuelo de acción más amplia ActRIIB-hFc (SEQ ID NO: 27). Resumiendo, se realizaron heridas escisionales circulares de la piel en el costado abdominal izquierdo de 30 ratones SCID macho de aproximadamente 7-8 semanas. Los animales se dividieron en cinco grupos de tratamiento (n = 6 por grupo) recibiendo cada uno de ellos cinco inyecciones subcutáneas de un anticuerpo de control de isotipo, ActRIIB-hFc, H4H1657N2, MAB3381 o H4H1657N2 + MAB3381. Todos los reactivos se administraron a una dosis de 10 mg/kg cada 3-4 días. La primera dosis se administró el día antes de lesionar a los animales, y la última se administró dos días antes de finalizar el estudio el día 14. Se tomaron imágenes digitales los días 0 (día en el que se realizaron las lesiones), 6, 9, 12 y 14, se midió el cambio del tamaño de la herida de escisión y se comparó con el grupo de control de isotipo. Los resultados se presentan en la Tabla 5. Todos los datos se expresan como tamaño medio total de la herida ± error típico de la media.

**Tabla 5**

| Tratamiento (10 mg/kg cada 3-4 días) | Días después de la herida (tamaño total de la herida mm <sup>2</sup> ) |              |              |              |              |
|--------------------------------------|--|--------------|--------------|--------------|--------------|
|                                      | Día 0  | Día 6        | Día 9        | Día 12       | Día 14       |
| Control de Isotipo                   | 59,95 ± 2,25   | 31,92 ± 3,43 | 18,75 ± 3,67 | 9,46 ± 2,25  | 7,66 ± 1,51  |
| ActRIIB-hFc                          | 61,30 ± 1,78   | 49,07 ± 2,74 | 30,50 ± 2,74 | 17,60 ± 1,53 | 14,90 ± 1,25 |
| H4H1657N2 (anti GDF8)                | 64,98 ± 2,56   | 30,69 ± 5,3  | 16,36 ± 3,27 | 7,71 ± 1,93  | 6,98 ± 1,32  |
| MAB3381 (anti Activina A)            | 62,07 ± 2,94   | 35,58 ± 4,96 | 23,38 ± 3,3  | 13,67 ± 2,19 | 11,01 ± 1,45 |
| H4H1657N2 + MAB3381                  | 61,08 ± 2,54   | 31,85 ± 2,83 | 17,68 ± 2,17 | 10,89 ± 1,74 | 9,09 ± 1,4   |

20 Un análisis del tamaño de la herida al final del experimento, tal como se muestra en la Tabla 5, reveló que el tratamiento con H4H1657N2, MAB3381 o H4H1657N2 + MAB3381 no produjo una diferencia significativa en el tamaño de la herida en ningún momento después de la escisión inicial en comparación con el grupo de control de isotipo. Por el contrario, ActRIIB-hFc retrasó significativamente el cierre de la herida según lo indicado por el mayor tamaño de la herida los días 6, 9, 12 y 14 en comparación con el tamaño de la herida en ratones tratados con H4H1657N2, MAB3381, H4H1657N2 + MAB3381, o el control de Isotipo.

Este experimento demuestra que los tratamientos terapéuticos que implican antagonismo de GDF8, antagonismo de Activina A o antagonismo doble de GDF8 + Activina A, no alteran significativamente la cicatrización de heridas, mientras que el antagonista menos específico, ActRIIB-hFc, altera significativamente la cicatrización de heridas. Por consiguiente, el presente Ejemplo proporciona confirmación adicional de la idea de que el antagonismo específico de GDF8 y Activina A puede producir una masa y función muscular mejorada, similar a la observada con el tratamiento con ActRIIB-hFc, pero sin los efectos secundarios adversos asociados al tratamiento con ActRIIB-hFc.

El alcance de la presente invención no debe limitarse a las realizaciones específicas descritas en el presente documento. De hecho, a partir de la descripción anterior y de las figuras adjuntas, diversas modificaciones de la invención, además de las descritas en este documento, serán obvias para los expertos en la técnica. Dichas modificaciones pretenden incluirse dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.

<120> Composiciones y métodos para aumentar la masa y la fuerza muscular antagonizando específicamente GDF8 y/o Activina A

40 <130> 6074A-WO

<140> Por asignar

<141> Presentado en este documento

ES 2 663 946 T3

<150> 61/559.175  
<151> 14/11/2011

<150> 61/607.024  
<151> 06/03/2012

5 <150> 61/661.451  
<151> 19/06/2012

<160> 28

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

10 <210> 1  
<211> 118  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Sintética

15 <400> 1

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

20 <210> 2  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Sintética

<400> 2

Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr Gly

1

5

25 <210> 3  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> Sintética

ES 2 663 946 T3

<400> 3

Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asp Glu  
1 5

5 <210> 4  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Sintética

<400> 4

10 Val Lys Gly Asp Leu Glu Leu Gly Phe Asp Tyr  
1 5 10

<210> 5  
<211> 112  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Sintética

<400> 5

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

20 <210> 6  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Sintética

25 <400> 6

Lys Ser Leu Leu Tyr Ser Asn Gly His Thr Tyr  
1 5 10

30 <210> 7  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Sintética

<400> 7

Arg Met Ser  
1

5 <210> 8  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Sintética  
  
<400> 8

Met Gln Asn Leu Glu Phe Pro Leu Thr  
1 5

15 <210> 9  
<211> 120  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Sintética

<400> 9

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Glu | Val | Gln | Val | Leu | Glu | Ser | Gly | Gly | Asp | Leu | Val | Gln | Pro | Gly | Gly |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Ser | Leu | Arg | Leu | Ser | Cys | Ala | Ala | Ser | Gly | Phe | Thr | Phe | Ser | Ala | Tyr |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Ala | Met | Thr | Trp | Val | Arg | Gln | Ala | Pro | Gly | Lys | Gly | Leu | Glu | Trp | Val |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| Ser | Ala | Ile | Ser | Gly | Ser | Gly | Gly | Ser | Ala | Tyr | Tyr | Ala | Asp | Ser | Val |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |
| Lys | Gly | Arg | Phe | Thr | Ile | Ser | Arg | Asp | Asn | Ser | Lys | Asn | Thr | Val | 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 | Asp | Gly | Ala | Trp | Lys | Met | Ser | Gly | Leu | Asp | Val | Trp | Gly | Gln |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
| Gly | Thr | Thr | Val | Ile | Val | Ser | Ser |     |     |     |     |     |     |     |     |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     |     |     |     |     |

20 <210> 10  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

25 <220>  
<223> Sintética  
  
<400> 10

Gly Phe Thr Phe Ser Ala Tyr Ala  
1 5

<210> 11

ES 2 663 946 T3

<211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Sintética

<400> 11

Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Ala  
 1 5

10 <210> 12  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintética

<400> 12

15 Ala Lys Asp Gly Ala Trp Lys Met Ser Gly Leu Asp Val  
 1 5 10

<210> 13  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Sintética

<400> 13

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Ile | Gln | Met | Thr | Gln | Ser | Pro | Ala | Ser | Leu | Ser | Ala | Ser | Val | Gly |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Asp | Arg | Val | Thr | Ile | Thr | Cys | Arg | Ala | Ser | Gln | Asp | Ile | Ser | Asp | Tyr |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Leu | Ala | Trp | Tyr | Gln | Gln | Lys | Pro | Gly | Lys | Ile | Pro | Arg | Leu | Leu | Ile |
|     |     | 35  |     |     |     | 40  |     |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| Tyr | Thr | Thr | Ser | Thr | Leu | Gln | Ser | Gly | Val | Pro | Ser | Arg | Phe | Arg | 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 | Val | Ala | Thr | Tyr | Tyr | Cys | Gln | Lys | Tyr | Asp | Ser | Ala | Pro | Leu |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| Thr | Phe | Gly | Gly | Gly | Thr | Lys | Val | Glu | Ile | Lys |     |     |     |     |     |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     |     |     |     |

25 <210> 14  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintética

30 <400> 14

ES 2 663 946 T3

Gln Asp Ile Ser Asp Tyr  
1 5

5 <210> 15  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Sintética

<400> 15

Thr Thr Ser  
1

10 <210> 16  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Sintética

<400> 16

Gln Lys Tyr Asp Ser Ala Pro Leu Thr  
1 5

20 <210> 17  
<211> 121  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Sintética

<400> 17

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

25 <210> 18  
<211> 8

ES 2 663 946 T3

<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Sintética

5 <400> 18

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly  
1 5

<210> 19  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10

<220>  
<223> Sintética

<400> 19

Ile Gly Tyr Asp Gly Gly Asn Glu  
1 5

<210> 20  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

15

<220>  
<223> Sintética

20

<400> 20

Ser Thr Ile Ser His Tyr Asp Ile Leu Ser Gly Met Asp Val  
1 5 10

<210> 21  
<211> 108  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

25

<220>  
<223> Sintética

<400> 21

ES 2 663 946 T3

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

5 <210> 22  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintética

<400> 22

Gln Gly Ile Ser Asn Trp  
 1 5

10 <210> 23  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Sintética

<400> 23

Ala Ala Ser  
 1

20 <210> 24  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintética

<400> 24

Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Leu Thr  
 1 5

25 <210> 25  
 <211> 109  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 663 946 T3

<400> 25

```

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

```

<210> 26

<211> 426

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 26

ES 2 663 946 T3

```

Met Pro Leu Leu Trp Leu Arg Gly Phe Leu Leu Ala Ser Cys Trp Ile
 1          5          10          15
Ile Val Arg Ser Ser Pro Thr Pro Gly Ser Glu Gly His Ser Ala Ala
 20          25          30
Pro Asp Cys Pro Ser Cys Ala Leu Ala Ala Leu Pro Lys Asp Val Pro
 35          40          45
Asn Ser Gln Pro Glu Met Val Glu Ala Val Lys Lys His Ile Leu Asn
 50          55          60
Met Leu His Leu Lys Lys Arg Pro Asp Val Thr Gln Pro Val Pro Lys
 65          70          75          80
Ala Ala Leu Leu Asn Ala Ile Arg Lys Leu His Val Gly Lys Val Gly
 85          90          95
Glu Asn Gly Tyr Val Glu Ile Glu Asp Asp Ile Gly Arg Arg Ala Glu
 100         105         110
Met Asn Glu Leu Met Glu Gln Thr Ser Glu Ile Ile Thr Phe Ala Glu
 115         120         125
Ser Gly Thr Ala Arg Lys Thr Leu His Phe Glu Ile Ser Lys Glu Gly
 130         135         140
Ser Asp Leu Ser Val Val Glu Arg Ala Glu Val Trp Leu Phe Leu Lys
 145         150         155         160
Val Pro Lys Ala Asn Arg Thr Arg Thr Lys Val Thr Ile Arg Leu Phe
 165         170         175
Gln Gln Gln Lys His Pro Gln Gly Ser Leu Asp Thr Gly Glu Glu Ala
 180         185         190
Glu Glu Val Gly Leu Lys Gly Glu Arg Ser Glu Leu Leu Leu Ser Glu
 195         200         205
Lys Val Val Asp Ala Arg Lys Ser Thr Trp His Val Phe Pro Val Ser
 210         215         220
Ser Ser Ile Gln Arg Leu Leu Asp Gln Gly Lys Ser Ser Leu Asp Val
 225         230         235         240
Arg Ile Ala Cys Glu Gln Cys Gln Glu Ser Gly Ala Ser Leu Val Leu
 245         250         255
Leu Gly Lys Lys Lys Lys Glu Glu Gly Glu Gly Lys Glu Lys Lys
 260         265         270
Gly Gly Gly Glu Gly Gly Ala Gly Ala Asp Glu Glu Lys Glu Gln Ser
 275         280         285
His Arg Pro Phe Leu Met Leu Gln Ala Arg Gln Ser Glu Asp His Pro
 290         295         300
His Arg Arg Arg Arg Arg Gly Leu Glu Cys Asp Gly Lys Val Asn Ile
 305         310         315         320
Cys Cys Lys Lys Gln Phe Phe Val Ser Phe Lys Asp Ile Gly Trp Asn
 325         330         335
Asp Trp Ile Ile Ala Pro Ser Gly Tyr His Ala Asn Tyr Cys Glu Gly
 340         345         350
Glu Cys Pro Ser His Ile Ala Gly Thr Ser Gly Ser Ser Leu Ser Phe
 355         360         365
His Ser Thr Val Ile Asn His Tyr Arg Met Arg Gly His Ser Pro Phe
 370         375         380
Ala Asn Leu Lys Ser Cys Cys Val Pro Thr Lys Leu Arg Pro Met Ser
 385         390         395         400
Met Leu Tyr Tyr Asp Asp Gly Gln Asn Ile Ile Lys Lys Asp Ile Gln
 405         410         415
Asn Met Ile Val Glu Glu Cys Gly Cys Ser
 420         425

```

<210> 27  
 <211> 340  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Sintética

ES 2 663 946 T3

<400> 27

Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu Gln Asp  
 20 25 30  
 Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Ala Asn Ser Ser Gly Thr Ile  
 35 40 45  
 Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp  
 50 55 60  
 Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr Phe Cys  
 65 70 75 80  
 Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu Pro Glu  
 85 90 95  
 Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr Ala Pro Ser  
 100 105 110  
 Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu  
 115 120 125  
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu  
 130 135 140  
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser  
 145 150 155 160  
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu  
 165 170 175  
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr  
 180 185 190  
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn  
 195 200 205  
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro  
 210 215 220  
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln  
 225 230 235 240  
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val  
 245 250 255  
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val  
 260 265 270  
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro  
 275 280 285  
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr  
 290 295 300  
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val  
 305 310 315 320  
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu  
 325 330 335  
 Ser Pro Gly Lys  
 340

<210> 28

<211> 407

5

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 28

ES 2 663 946 T3

Met Asp Gly Leu Pro Gly Arg Ala Leu Gly Ala Ala Cys Leu Leu Leu  
 1 5 10 15  
 Leu Ala Ala Gly Trp Leu Gly Pro Glu Ala Trp Gly Ser Pro Thr Pro  
 20 25 30  
 Pro Pro Thr Pro Ala Ala Gln Pro Pro Pro Pro Pro Gly Ser Pro  
 35 40 45  
  
 Gly Gly Ser Gln Asp Thr Cys Thr Ser Cys Gly Gly Phe Arg Arg Pro  
 50 55 60  
 Glu Glu Leu Gly Arg Val Asp Gly Asp Phe Leu Glu Ala Val Lys Arg  
 65 70 75 80  
 His Ile Leu Ser Arg Leu Gln Met Arg Gly Arg Pro Asn Ile Thr His  
 85 90 95  
 Ala Val Pro Lys Ala Ala Met Val Thr Ala Leu Arg Lys Leu His Ala  
 100 105 110  
 Gly Lys Val Arg Glu Asp Gly Arg Val Glu Ile Pro His Leu Asp Gly  
 115 120 125  
 His Ala Ser Pro Gly Ala Asp Gly Gln Glu Arg Val Ser Glu Ile Ile  
 130 135 140  
 Ser Phe Ala Glu Thr Asp Gly Leu Ala Ser Ser Arg Val Arg Leu Tyr  
 145 150 155 160  
 Phe Phe Ile Ser Asn Glu Gly Asn Gln Asn Leu Phe Val Val Gln Ala  
 165 170 175  
 Ser Leu Trp Leu Tyr Leu Lys Leu Leu Pro Tyr Val Leu Glu Lys Gly  
 180 185 190  
 Ser Arg Arg Lys Val Arg Val Lys Val Tyr Phe Gln Glu Gln Gly His  
 195 200 205  
 Gly Asp Arg Trp Asn Met Val Glu Lys Arg Val Asp Leu Lys Arg Ser  
 210 215 220  
 Gly Trp His Thr Phe Pro Leu Thr Glu Ala Ile Gln Ala Leu Phe Glu  
 225 230 235 240  
 Arg Gly Glu Arg Arg Leu Asn Leu Asp Val Gln Cys Asp Ser Cys Gln  
 245 250 255  
 Glu Leu Ala Val Val Pro Val Phe Val Asp Pro Gly Glu Glu Ser His  
 260 265 270  
 Arg Pro Phe Val Val Val Gln Ala Arg Leu Gly Asp Ser Arg His Arg  
 275 280 285  
 Ile Arg Lys Arg Gly Leu Glu Cys Asp Gly Arg Thr Asn Leu Cys Cys  
 290 295 300  
 Arg Gln Gln Phe Phe Ile Asp Phe Arg Leu Ile Gly Trp Asn Asp Trp  
 305 310 315 320  
 Ile Ile Ala Pro Thr Ser Tyr Tyr Gly Asn Tyr Cys Glu Gly Ser Cys  
 325 330 335  
 Pro Ala Tyr Leu Ala Gly Val Pro Gly Ser Ala Ser Ser Phe His Thr  
 340 345 350  
 Ala Val Val Asn Gln Tyr Arg Met Arg Gly Leu Asn Pro Gly Thr Val  
 355 360 365  
 Asn Ser Cys Cys Ile Pro Thr Lys Leu Ser Thr Met Ser Met Leu Tyr  
 370 375 380  
 Phe Asp Asp Glu Tyr Asn Ile Val Lys Arg Asp Val Pro Asn Met Ile  
 385 390 395 400  
 Val Glu Glu Cys Gly Cys Ala  
 405

## REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende una proteína de unión específica de GDF8 y una proteína de unión específica de Activina A, en la que la proteína de unión específica de GDF8 es un anticuerpo anti GDF8, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que inhibe a GDF8, y en la que la proteína de unión específica de Activina A es un anticuerpo anti Activina A, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que inhibe a Activina A.
2. Una composición que comprende una proteína de unión específica de GDF8 y una proteína de unión específica de Activina A para su uso en un método para tratar una enfermedad o un trastorno caracterizado por una disminución de la masa o la fuerza muscular, en la que la proteína de unión específica de GDF8 es un anticuerpo anti GDF8, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que inhibe a GDF8, y en la que la proteína de unión específica de Activina A es un anticuerpo anti Activina A, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que inhibe a activina A.
3. Una proteína de unión específica de GDF8 para su uso en un método para tratar una enfermedad o trastorno caracterizado por una disminución de la masa o la fuerza muscular, en el que el método comprende administrar a un sujeto la proteína de unión específica de GDF8 y una proteína de unión específica de Activina A y en el que la proteína de unión específica de GDF8 es un anticuerpo anti GDF8, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que inhibe a GDF8, y en el que la proteína de unión específica de Activina A es un anticuerpo anti Activina A, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que inhibe a Activina A.
4. Una proteína de unión específica de Activina A para su uso en un método para tratar una enfermedad o un trastorno caracterizado por una disminución de la masa o la fuerza muscular, en el que el método comprende administrar a un sujeto la proteína de unión específica de Activina A y una proteína de unión específica de GDF8 y en el que la proteína de unión específica de GDF8 es un anticuerpo anti GDF8, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que inhibe a GDF8, y en el que la proteína de unión específica de Activina A es un anticuerpo anti Activina A, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que inhibe a Activina A.
5. Un método no terapéutico para aumentar la masa o la fuerza muscular en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto (i) una proteína de unión específica de Activina A y una proteína de unión específica de GDF8, en el que la proteína de unión específica de GDF8 es un anticuerpo anti-GDF8, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que inhibe a GDF8, y en el que la proteína de unión específica de Activina A es un anticuerpo anti Activina A, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que inhibe a Activina A, o (ii) una molécula de unión a antígeno que comprende un anticuerpo específico anti GDF8, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que inhibe a GDF8 y un anticuerpo anti Activina A específico, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que inhibe a Activina A.
6. La composición, el método, la proteína de unión específica de GDF8 para su uso y/o la proteína de unión específica de Activina A para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, comprendiendo el anticuerpo anti GDF8, o fragmento de unión a antígeno del mismo, tres HCDR que comprenden la SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO:11 y SEQ ID NO:12, y tres LCDR que comprenden la SEQ ID NO:14, SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16.
7. Una molécula de unión a antígeno que comprende un anticuerpo anti GDF8, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que inhibe a GDF-8 y un anticuerpo anti Activina, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que inhibe a Activina A.
8. Una molécula de unión a antígeno que comprende un anticuerpo anti GDF8, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que inhibe a GDF8 y un anticuerpo anti Activina A, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que inhibe a Activina A, para su uso en un método para tratar una enfermedad o un trastorno caracterizado por una disminución de la masa o la fuerza muscular.
9. La molécula de unión a antígeno de la reivindicación 7, o la molécula de unión a antígeno para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en la que el anticuerpo anti GDF8, o fragmento de unión a antígeno, comprende una región variable de cadena pesada (HCVR) y una región variable de cadena ligera (LCVR) y/o el anticuerpo anti Activina A, o fragmento de unión a antígeno, comprende una región variable de cadena pesada (HCVR) y una región variable de cadena ligera (LCVR).
10. La molécula de unión a antígeno, o molécula de unión a antígeno para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en la que la HCVR del anticuerpo anti GDF8, o fragmento de unión a antígeno, comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDR) que comprenden la SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO:11 y SEQ ID NO:12, y en la que la LCVR del anticuerpo anti DF8, o fragmento de unión a antígeno, comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDR) que comprenden la SEQ ID NO:14, SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16.

11. La molécula de unión a antígeno, o molécula de unión a antígeno para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en la que la molécula de unión a antígeno es un anticuerpo biespecífico.